

СЕКЦИЯ «БОТАНИКА, ГЕНЕТИКА И ЭКОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ»

Генетическая и эколого-физиологическая характеристика бактерий рода *Salinisphaera* (класс *Gammaproteobacteria*), выделенных из рудника Верхнекамского месторождения солей

В.С. Алеев

ПГНИУ

Научный руководитель: д.б.н., профессор Е.Г. Плотникова, ПГНИУ

Аннотация. Из глинистых отложений рассолоотводящих выработок и рассолосборников рудника Верхнекамского месторождения солей (г. Соликамск, Пермский край) было выделено 5 штаммов галофильных бактерий. В результате филогенетического анализа, проведенного на основе сравнения последовательностей гена 16S рРНК, было установлено, что выделенные культуры являются представителями семейства *Salinisphaeraceae*. Три галофильных штамма SHV2, RV14 и SWV1 имели сходство с ближайшим типовым штаммом вида *Salinisphaera hydrothermalis* на уровне 95.94-96.62% (ген 16S рРНК), что указывает на принадлежность этих штаммов к новому таксону. Все выделенные бактерии являются галофилами: растут при высокой солености среды (до 270-300 г/л NaCl).

Ключевые слова: Верхнекамское месторождение солей, галофильные бактерии, *Salinisphaera*, гены 16S рРНК.

Верхнекамское месторождение калийно-магниевых и натриевых солей (ВМКМС) является одним из крупнейших месторождений солей в мире. В результате воздействия огромного количества отходов калийных предприятий происходит засоление почв, поверхностных и подземных вод, что способствует формированию на территории солеразработок специфических условий для выживания растений и микроорганизмов.

Ранее штаммы рода *Salinisphaera* были изолированы из воды, донных отложений, отходов производства калийных солей (г. Соликамск) [1].

Цель работы – выделение галофильных микроорганизмов из глинистых отложений рассолоотводящих выработок и рассолосборников рудника ВМКМС (г. Соликамск, Пермский край), их таксономическая и эколого-физиологическая характеристика.

Для выделения микроорганизмов были использованы образцы глинистых отложений, отобранные из рассолоотводящих выработок и рассолосборников в одном из рудников ВМКМС (г. Соликамск, Пермский край). Для выделения галофилов использован метод накопительного культивирования в богатой среде Раймонда (БСР) [2] с добавлением триптона (5 г/л), дрожжевого экстракта (2.5 г/л) и хлорида натрия (100, 150 и 200 г/л). Для получения накопительных культур в колбы со 100 мл БСР и разной концентрацией соли, добавляли 1 г глины. Культивирование проводили в течение 3 недель, затем осуществляли высеv суспензии на агаризованную БСР (15 г/л агара) с содержанием 150 г/л NaCl.

ДНК-типирование чистых культур бактерий проводили методом ВОХ-ПЦР [3]. Идентификацию бактерий осуществляли на основе анализа гена 16S рРНК. Для выделения ДНК из чистых культур бактерий использовали метод «щелочного лизиса». Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК проводили с универсальными бактериальными праймерами 27F и 1492R [4]. Определение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК осуществляли на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL («Applied Biosystem», США) на кафедре ботаники и генетики растений ПГНИУ. Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программ Sequence Scanner v. 2.0., MEGA 7.0 [<http://megasoftware.net>]. В базе данных EzBioCloud осуществлялся поиск гомологичных последовательностей [<http://ezbiocloud.net>]. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA 7.0.

Рост бактерий при различных концентрациях хлорида натрия оценивали на агаризованной БСР с содержанием соли 10-300 г/л. Рост при разных значениях pH определяли при концентрации 70 г/л NaCl в буферных системах, приготовленных на основе БСР с pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0. Оценку роста проводили через две недели культивирования [5].

Из полученных накопительных культур были выделены 5 бактериальных штаммов. Изоляты являлись галофильными бактериями: росли при содержании 10-270/300 г/л NaCl в среде культивирования; росли

при pH среды 6.0-7.0 и температуре до 40°C (оптимум роста при +28°C), но не росли при +4°C.

Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК показал, что штаммы SHV1 и SHV6 имели наибольший уровень сходства 99.89% с *Salinisphaera hydrothermalis* EPR70^T (класс *Gammaproteobacteria*, порядок *Nevskiales*, семейство *Salinisphaeraceae*). Штаммы SHV2 и RV14 при анализе фрагмента гена 16S рРНК имели сходство с типовым штаммом вида *Salinisphaera hydrothermalis* на уровне 96.62%, а сходство почти полного гена 16S рРНК штамма SWV1 – на уровне 95.94% (таблица).

Анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК
изолированных бактерий

Штамм	Сходство, %	Типовой штамм ближай- шего родствен- ного вида	Номер в базе данных GenBank	Кол-во нуклеоти- дов
SWV 1	95,94	<i>Salinisphaera hydrothermalis</i> EPR70 ^T	EU740416	1,411
SHV1	99,89		EU740416	929
SHV2	96,62		EU740416	920
SHV6	99,89		EU740416	895
RV14	96,63		EU740416	923

Полученные данные позволяют предположить, что штаммы SHV2, RV14 и SWV1 представляю новые таксономические единицы, поэтому дальнейшее их исследование вызывает несомненный интерес.

Библиографический список

1. Корсакова Е.С. Культивируемые аэробные бактерии из района промышленных разработок Верхнекамского месторождения солей: дис...канд. биол. наук. Пермь, 2014. 150 с.
2. Raymond, R.L. Microbial oxidation of n-paraffinichydrocarbons // Develop. Ind. Microbiol. 1961. V. 2. № 1. P. 23-32.
3. Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J., Lupski J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction // Meth. Cell. Mol. Biol. 1994. V. 5. P. 25-40.
4. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics / Eds Stackebrandt E., Goodfellow M. New York.: John Wiley and Sons. 1991. P. 115-175.

5. Методы общей бактериологии: Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта с соавторами. М.: Мир. 1983. Т. 1-3.

Микроклональное размножение видов и сортов рода Крокус (*Crocus* L.)

В.В. Алексеева

ПГНИУ

Научный руководитель: к.б.н, доц. *Н.Л. Шибанова*, ПГНИУ

Аннотация. Представлены результаты по микроклональному размножению одного сорта и трех видов крокусов. Использовались два режима стерилизации и два варианта питательной среды Мурасиге и Скута (МС). Выход стерильной культуры оказался низким и не превысил 58%. Жизнеспособность эксплантов на варианте среды МС+ БАП 2 мг/л + 2,4-Д 0,5 мг/л достигла 100%, на варианте среды МС+ БАП 1 мг/л + НУК 5 мг/л не превысила 69%. Образование каллуса происходило на обоих вариантах среды, на среде с добавлением БАП 1 мг/л и НУК 5 мг/л наблюдалось образование микропобегов и эмбриогенез.

Ключевые слова: *Crocus* L., микроклональное размножение

Необходимость применения метода культуры тканей *in vitro* обусловлена особенностями дикорастущих видов крокуса: ранними сроками цветения, коротким сроком вегетации, низкой всхожестью семян, а также высокой степенью пораженности клубнелуковиц патогенной инфекцией и трудностями введения в условия интродукции [1]. Технология микроклонального размножения позволяет массово получить заведомо безвирусный материал для быстрого размножения видов и сортов, в течение нескольких месяцев, вместо нескольких лет стандартными методами, а также для сохранения редких видов и выведения новых сортов [2, 3].

Цель данной работы – микроклональное размножение видов и сортов рода *Crocus* L.

В качестве объектов исследования были выбраны: *C. autumnalis* Mill., *C. sativus* L., *C. vernus* (L.) A.J.Hill, *C. chrysanthus* сорт «Prins Claus».

В качестве эксплантов для введения в культуру *in vitro* были использованы части клубнелуковиц размером 0,5-0,8 см с пазушными почками