

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ГЕНЕТИКИ,
БИОТЕХНОЛОГИИ И ИНЖЕНЕРИИ ИМЕНИ Н. И. ВАВИЛОВА»

На правах рукописи

ТКАЧЕНКО ОКСАНА ВИКТОРОВНА

ПРИМЕНЕНИЕ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM* И
ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ИХ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК ДЛЯ
СТИМУЛИРОВАНИЯ МОРФОГЕНЕЗА ПШЕНИЦЫ И КАРТОФЕЛЯ В
КУЛЬТУРЕ СОМАТИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

IN VITRO

1.5.6 – биотехнология

Диссертация

на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук

Научный консультант:
доктор сельскохозяйственных наук, профессор
Лобачев Юрий Викторович

Саратов, 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
Введение.....	6
Глава 1. Обзор литературы.....	18
1.1 Применение метода культуры соматических тканей <i>in vitro</i> в агробиотехнологии растений	18
1.2 Морфогенез в культуре клеток и тканей растений <i>in vitro</i>	19
1.3 Химические факторы регуляции морфогенеза в культуре клеток и тканей растений <i>in vitro</i>	21
1.4 Эксплант и физические факторы регуляции морфогенеза в культуре клеток и тканей растений <i>in vitro</i>	32
1.5 Влияние генотипа донорных растений на эффективность морфогенеза в культуре клеток и тканей растений <i>in vitro</i>	37
1.6 Биологические факторы регуляции морфогенеза в культуре клеток и тканей растений <i>in vitro</i>	46
1.6.1 Ризосферные рост-стимулирующие бактерии и их влияние на растения	46
1.6.2 Применение ризосферных бактерий для стимулирования морфогенеза в культуре соматических каллусов <i>in vitro</i>	50
1.6.3 Применение ризосферных бактерий для стимулирования морфогенеза в культуре соматических тканей при микреклональном размножении <i>in vitro</i>	56
1.6.4 Полисахариды и компоненты бактериальных клеток: связь с морфогенезом в культуре клеток и тканей растений <i>in vitro</i>	66
Собственные исследования	74
Глава 2. Материалы и методы исследований	74
2.1 Материалы исследований.....	74
2.2 Методика изучения влияния бактериальных клеток и их липополисахаридов на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы <i>in vitro</i>	77

2.3 Методика изучения влияния бактериальных клеток и их липополисахаридов на микроклоны картофеля в культуре <i>in vitro</i> и <i>ex vitro</i>	80
2.4 Статистический анализ данных экспериментов	85
Глава 3. Генетическая модель для изучения влияния морфогенеза в культуре соматических тканей пшеницы <i>in vitro</i>	87
3.1 Изучение эффектов генов короткостебельности в культуре соматических тканей пшеницы <i>in vitro</i>	87
3.2 ПАИ – молекулярный маркер морфогенеза в культуре соматических тканей пшеницы <i>in vitro</i>	93
3.3 Использование генетической модели на основе почти изогенных линий для оптимизации метода культивирования клеток пшеницы <i>in vitro</i>	96
Глава 4. Изучение влияния бактериальных клеток и их липополисахаридов на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы <i>in vitro</i>	99
4.1 Изучение влияния бактериальных клеток на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы <i>in vitro</i>	99
4.2 Изучение влияния липополисахаридов на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы <i>in vitro</i>	105
4.2.1 Изучение влияния липополисахаридов <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245	105
4.2.2 Анатомо-морфологический анализ влияния липополисахаридов <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245	112
4.2.3 Сравнительное изучение влияния липополисахаридов <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245 и <i>Escherichia coli</i> K12	120
4.2.4 Изучение влияния липополисахаридов бактерий рода <i>Azospirillum</i>	125
Глава 5. Изучение влияния бактериальных клеток и их липополисахаридов на микроклоны картофеля в культуре <i>in vitro</i> и <i>ex vitro</i>	147
5.1 Изучение влияния ризосферных бактерий на микроклоны картофеля в культуре <i>in vitro</i>	147

5.1.1 Создание растительно-микробных ассоциаций в культуре <i>in vitro</i> ..	147
5.1.2 Подбор оптимальных условий инокуляции для создания растительно-микробных ассоциаций при микроклональном размножении	154
5.1.3 Зависимость времени инокуляции микрорастений в культуре <i>in vitro</i> от свойств бактериального штамма	167
5.1.4 Влияние состава питательной среды на создание и функционирование растительно-микробных ассоциаций при микроклональном размножении	171
5.1.5 Сохранность бактерий рода <i>Azospirillum</i> на микроклонах картофеля при микроклональном размножении	175
5.1.6 Влияние <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245 на микроклоны картофеля различных генотипов при микроклональном размножении	178
5.1.7 Изучение ответных реакций растений на инокуляцию чистыми культурами бактерий и ко-инокуляцию двумя штаммами бактерий различных таксономических групп	193
5.1.8 Механизмы влияния азоспирилл на микроклоны картофеля при инокулировании <i>in vitro</i>	198
5.1.8.1 Изменение гормонального статуса.....	198
5.1.8.2 Экспрессия ауксин-зависимых генов.....	204
5.1.8.3 Индукция системной устойчивости (стимулирование синтеза каллозы).....	206
5.2 Изучение влияния липополисахаридов ризосферных бактерий на микроклоны картофеля в культуре <i>in vitro</i>	208
Заключение	214
Выводы	224
Практические предложения	226
Перспективы дальнейшей разработки темы	226
Список сокращений и условных обозначений	227
Словарь терминов	228

Список литературы	229
Приложения	299

Введение

Актуальность темы исследования

Биотехнологии на основе культуры клеток и тканей растений *in vitro* широко применяются в современных фундаментальных и прикладных исследованиях [156, 490]. Культура соматических каллусов *in vitro* является важным этапом многих биотехнологических подходов, применяемых в изучении физиологии растений, а также в практической селекции и семеноводстве растений. Совокупность морфогенетических процессов в растительных клетках и тканях *in vitro* влияет на соматический эмбриогенез и регенерацию растений, что определяет эффективность методов клеточной и геномной селекции [605]. Важнейшим направлением практического применения методов культуры клеток и тканей растений *in vitro* является производство оздоровленного посадочного материала, в том числе на оздоровленной основе, с использованием метода клonalного микроразмножения (микроклонального размножения) *in vitro* [81]. Для многих вегетативно размножаемых сельскохозяйственных культур, в первую очередь для картофеля, этот метод стал основой современного семеноводства [32, 33].

Метод культивирования клеток и тканей растений *in vitro* постоянно совершенствуется в отношении различных видов растений и задач культивирования [102, 292, 467]. Для успешного культивирования растительных клеток и тканей *in vitro* требуется создать оптимальные условия, обеспечивающие реализацию клетками растений их морфогенетического потенциала. Для многих важнейших сельскохозяйственных культур, в первую очередь злаков (в том числе мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.), использование биотехнологических приемов сдерживается низкой морфогенетической активностью клеток и тканей в культуре *in vitro* у различных сортов и селекционных линий. Эмбриоидогенез и органогенез в культуре соматических клеток, базирующиеся на свойстве totипотентности, индуцируются различными стрессовыми факторами культивирования. Важнейшее влияние на эффективность культивирования кле-

ток и тканей растений *in vitro* имеет генотип растения и тип экспланта [158, 458, 641]. Огромное внимание исследователей привлечено к изучению закономерностей генетического регулирования процессов морфогенеза и поиску маркерных генов [64].

С целью повышения эффективности методов культивирования клеток и тканей растений *in vitro* чаще всего исследуется влияние физических и химических факторов воздействия на клеточные и тканевые культуры. Для стимуляции процессов морфогенеза активно используются, в частности, синтетические аналоги фитогормонов, некоторые аминокислоты, нитрат серебра, ацетон и другие вещества [58, 71, 117, 651]. В качестве физических факторов воздействия используют температуру, освещенность, некоторые виды излучений [100, 305, 413, 595, 633].

К числу мало изученных факторов воздействия на растительные клетки в культуре *in vitro* можно отнести влияние внешних биологических факторов, например, микроорганизмов, в том числе бактерий. Традиционно метод *in vitro* рассматривается как культура асептических клеток и тканей растений. Огромные усилия исследователей прилагаются для создания и поддержания условий стерильности в культуральных сосудах и предотвращения контаминации культур [41]. При этом способность ризосферных бактерий (plant growth-promoting bacteria, PGPB) стимулировать рост растений в естественных условиях хорошо известна [509]. В последние годы внимание физиологов и биотехнологов растений приковано к изучению механизмов растительно-микробных взаимодействий и созданию агробиотехнологий на этой основе.

Степень разработанности темы исследований

В литературе встречаются единичные работы, описывающие положительное влияние бактерий на клеточные культуры растений *in vitro*. Было установлено, что суспензии некоторых штаммов бактерий стимулируют морфогенную активность клеток разных видов растений [21, 74, 103, 167, 447] и повышают способность к адаптации регенерантов к условиям *ex vitro* [251]. При этом опыт бактеризации соматических клеток растений *in vitro* живыми бакте-

риями чаще неуспешен, так как вызывает контаминацию культуры и/или фитотоксический эффект [51]. Сообщалось, что инокуляция *in vitro* бактериями рода *Azospirillum* приводит в условиях *in vitro* к усилению роста и развития растений картофеля [638], базилика [162] и к улучшению акклиматизации фруктовых растений в условиях *ex vitro* [344].

Имеются сведения о том, что отдельные компоненты микробных клеток, такие как хитин, пептидогликан (PGN), липополисахарид (ЛПС) и метаболит бактерий ризобиальный фактор клубнеобразования (Nod-factor), способны выступать в роли сигнальных молекул, вызывающих иммунные или симбиотические ответные реакции растений [278, 521]. Установлено, что ЛПС наружной мембранны ассоциативных бактерий рода *Azospirillum*, являющийся одним из мажорных компонентов клеточной поверхности грамотрицательных бактерий, проявляет высокую активность в контактных взаимодействиях с корнями растений [369] и принимает участие в процессах, индуцирующих ответные реакции растений на эти взаимодействия [224]. При этом, бактерии данного рода хорошо известны как стимулирующие рост растений ризобактерии и являются модельными при изучении растительно-микробных взаимодействий [489]. Однако крайне мало известно о роли ЛПС ассоциативных бактерий в процессах их совместного культивирования с растительными клетками и тканями *in vitro*.

В целом, анализ литературы показал, что для таких важнейших сельскохозяйственных культур, как пшеница и картофель, имеются лишь единичные работы по инокуляции клеточных и тканевых культур *in vitro*. Недостаточно данных о создании эффективных растительно-микробных ассоциаций *in vitro* способных оказывать положительное влияние на морфогенез и регенерацию растений.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – разработка нового подхода к повышению эффективности культуры клеток и тканей *in vitro* на основе использования ассоциативных ризосферных бактерий и компонентов их клеток для стимулирования мор-

фогенеза однодольных (пшеница) и двудольных (картофель) растений на разных уровнях организации (клетки, ткани и органы растений).

Для достижения поставленной цели определены следующие задачи:

1. Создать генетическую модель для изучения морфогенеза соматических тканей яровой мягкой пшеницы в культуре *in vitro* на основе почти изогенных линий.

2. Оценить возможность повышения морфогенной (в том числе регенерационной) способности каллусов яровой мягкой пшеницы путем воздействия ризосферными бактериями рода *Azospirillum* и других таксономических групп на соматические клетки в культуре *in vitro*.

3. Изучить влияние липополисахаридов клеточных стенок бактерий рода *Azospirillum* на морфогенетический потенциал соматических тканей яровой мягкой пшеницы в культуре *in vitro*.

4. Исследовать возможность повышения эффективности роста и адаптационной способности мериклонов картофеля путем создания активно функционирующих ассоциаций растений с ризосферными бактериями рода *Azospirillum* и других таксономических групп в культуре *in vitro*.

5. Определить механизмы воздействия ризосферных бактерий на культуры клеток и тканей растений, их рост в культуре *in vitro* и адаптационный потенциал в условиях *ex vitro*.

6. Изучить влияние липополисахаридов клеточных стенок бактерий рода *Azospirillum* на рост мериклонов картофеля в культуре *in vitro*.

7. Разработать рекомендации по повышению эффективности методов культивирования клеток и тканей растений *in vitro* с использованием растительно-микробных ассоциаций с ризосферными бактериями.

Научная новизна исследований

Впервые проведено всестороннее исследование по переходу от гнатобионтного к голобионтному способу культивирования клеток и тканей растений *in vitro*. Показана возможность и условия создания и активного функционирова-

ния растительно-микробных ассоциаций на основе культур соматических клеток и тканей однодольных (пшеница) и двудольных (картофель) растений с ризосферными рост-стимулирующими бактериями рода *Azospirillum* и других таксономических групп в культуре *in vitro*. На основе изучения почти изогенных линий мягкой пшеницы, созданных в генофоне сорта Саратовская 29 и альтернативных по генам короткостебельности, отобрана модельная пара сестринских линий, различающихся по гену *Rht-B1c* и обладающих разной морфогенетической активностью в культуре соматических тканей, для изучения процессов морфогенеза в культуре соматических каллусов *in vitro*. Подобраны оптимальные условия инокулирования тканей мягкой пшеницы и картофеля живыми ризосферными бактериями в зависимости от их свойств. Изучено влияние как живых клеток ризосферных бактерий, так и компонентов их клеточных стенок – липополисахаридов (ЛПС) на морфогенез соматических тканей пшеницы и картофеля *in vitro*. Установлены механизмы влияния микросимбионтов ассоциаций на гормональный статус культивируемых клеток, экспрессию некоторых генов, синтез отдельных компонентов системной устойчивости.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы определяется возможностью создания растительно-микробных ассоциаций ризосферных бактерий с культурами клеток и тканей растений пшеницы мягкой и картофеля в культуре *in vitro* и стимулирования морфогенетических процессов на этой основе. Определены условия создания растительно-микробных ассоциаций в культуре *in vitro*. Определены механизмы взаимодействия PGPR и компонентов их клеточных стенок (ЛПС) с клетками растений пшеницы мягкой и картофеля. Изучены способы повышения эффективности культивирования соматических каллусных тканей и клonalного микроразмножения на основе применения ризосферных бактерий и их липополисахаридов на примере важных сельскохозяйственных культур (пшеницы и картофеля). Подобраны оптимальные варианты стимулирования морфогенеза (в том числе регенерационной способности) соматических каллусов пшеницы бактериальными липополисахаридами на примере генотипов с

различной отзывчивостью к культивированию *in vitro*. Определены ассоциативные микропартнера для культур соматических тканей картофеля *in vitro* и оптимальные условия инокуляции.

По результатам исследований, проведенных на предложенной модели, состоящей из почти изогенных линий, альтернативных по генам *Rht-B1c*, получен патент на изобретение «Тетрагидрат (+) гидротартрата (+) цис-[2S, 5R-1,5-диметил-2-(1-окси-3-пропил)]-пирролидиния, проявляющий морфогенетическую и росторегулирующую активность» (№ 2186768 от 10.08.2002 г.). Разработаны методические рекомендации «Применение ризосферных бактерий при микроклональном размножении картофеля» (в соавторстве с Н.В. Евсеевой, М.В. Загоруйко и Г.Л. Бурыгиным, 2021 г.). Результаты исследований внедрены в научную и практическую деятельность в ИБФРМ ФИЦ СНЦ РАН (акт внедрения от 07.10.2025 г.), ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока» (акт внедрения от 09.10.2025 г.), ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ (акт внедрения от 01.10.2025 г.), а также ИП К(Ф)Х Щеренко П.Ю. (акт внедрения от 16.11.2020 г.). Результаты диссертации используются в учебном процессе ФГБОУ ВО Вавиловский университет при чтении лекций по направлениям подготовки: 35.03.04 Агрономия и 35.04.04 Агрономия.

Методология и методы исследования

В процессе исследований использовано сочетание классических биотехнологических методов культивирования соматических клеток, тканей (культуры соматических каллусов) и органов растений (cloningное микроразмножение) *in vitro* с созданием активных растительно-микробных ассоциаций с ризосферными рост-стимулирующими бактериями. Эффективность растительно-микробных ассоциаций оценивалась по комплексу морфологических, физиолого-биохимических, анатомо-гистологических признаков растений в условиях *in vitro* и *ex vitro*. Для идентификации штаммов ризосферных бактерий на растениях в созданных ассоциациях применялись иммунохимические методы. Оценка механизмов воздействия ризосферных бактерий на культуры клеток и тканей растений изучалась на основании биохимических анализов содержания в тка-

нях гормонов, компонентов системной устойчивости и уровня относительной транскрипции генов.

Все эксперименты проводились в соответствии с требованием соблюдения принципа единственного различия и рандомизированных повторностей, а данные исследований подвергались статистической обработке.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Генетическая модель на основе почти изогенных линий в генотипе сорта Саратовская 29, альтернативных по гену *Rht-B1c*, различающихся по способности к морфогенезу и регенерации в культуре каллусов, является перспективной для изучения морфогенеза соматических тканей яровой мягкой пшеницы в культуре *in vitro*.

2. В культуре соматических клеток, тканей и органов растений *in vitro* возможно создание активных растительно-микробных ассоциаций с ризосферными рост-стимулирующими бактериями рода *Azospirillum* и штаммами *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2, *Enterobacter cloacae* K7, *Kocuria rosea* T1Ks19.

3. Повышение морфогенетической (в том числе регенерационной) способности соматических каллусов яровой мягкой пшеницы и темпов роста мериклонов картофеля *in vitro* достигается путем введения в состав питательной среды липополисахаридов клеточных стенок ризосферных бактерий рода *Azospirillum*.

4. Эффективность роста *in vitro* и адаптационная способность *ex vitro* мериклонов картофеля повышается за счет создания активно функционирующих ассоциаций растений со штаммами ризосферных бактерий рода *Azospirillum*, а также родов *Kocuria* и *Ochrobactrum* в культуре *in vitro*.

5. Ризосферные рост-стимулирующие бактерии, не использующие сахарозу в качестве источника углерода, применимы для инокуляции микрорастений в культуре *in vitro*. На активность растительно-микробной ассоциации в данных условиях положительно влияет способность бактерий к синтезу индолил-3-уксусной кислоты, способность к азотфиксации не оказывает существенного влияния.

6. Механизмы воздействия ризосферных бактерий на культуры клеток и тканей растений, их рост в культуре *in vitro* и адаптационный потенциал в условиях *ex vitro* основаны на изменении гормонального статуса растительных клеток, изменении в экспрессии их ауксин-зависимых генов и синтезе элементов системной устойчивости.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность исследований определяется методологией исследования, использованием апробированных методов исследования, сертифицированных приборов и статистическим анализом результатов экспериментов.

Результаты исследований были представлены на конференциях различного уровня: Ежегодной научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава и аспирантов ФГБОУ ВО Вавиловский университет по итогам научно-исследовательской, учебно-методической и воспитательной работы (Саратов, 2001-2025); Международной научно-практической конференции «Вавиловские чтения» (Саратов, 2001-2024); научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения А.Р. Жербака и 70-летию образования кафедры генетики в Московской сельскохозяйственной академии имени К.А. Тимирязева (Москва, 2002); Второй международной конференции «Современные проблемы генетики, биотехнологии и селекции растений» (Харьков, 2003); VIII, IX, X, IX Международной конференции «Биология клеток в культуре *in vitro* и биотехнологии» (Саратов, 2003; Звенигород, 2008; Казань, 2013; Минск, 2018); Всероссийской научной конференции «Стressовые белки растений» (Иркутск, 2004); 9-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2005); Всероссийской конференции «Молекулярные механизмы взаимодействия микроорганизмов и растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (Саратов, 2005); VI, VIII, IX, X Съездах общества физиологов растений России (Сыктывкар, 2007; Петрозаводск, 2015; Казань, 2019; Уфа, 2023); III Международной школе молодых ученых «Эмбриология, генетика и биотехнология» (Саратов, 2009); Всероссийской молодежной выставке-конкурсе прикладных исследований, изобретений и

инноваций (Саратов, 2009); X Молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2010); Всероссийской научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения С.С. Хохлова «Апомиксис и репродуктивная биология» (Саратов, 2010); Международной конференции «Биология – наука XXI века» (Москва, 2012); Международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве» (к 100-летию СГАУ им. Н.И. Вавилова) (Саратов, 2013); VII, IX Московских международных конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2013, 2017); Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений» (Москва, 2013); Международной научно-практической конференции «Инновационные технологии исследований в области сельского хозяйства» (Краснодар, 2013); Годичных собраниях Общества физиологов растений России (Калининград, 2014; Санкт-Петербург, 2016; Судак, 2017; Иркутск, 2018; Москва, 2021; Нижний Новгород, 2022); Международной научно-практической интернет-конференции «Микробиологические аспекты оптимизации производственного процесса культурных растений» (Черников, 2015); Международной конференции «Генетическая интеграция прокариот и эукариот: фундаментальные исследования и современные агротехнологии», посвященной 85-летию Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (Санкт-Петербург, 2015); XVI Международной научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований» (Москва, 2015); II Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы (к 50-летию ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларусь»)» (Минск, 2015); Международной научно-практической конференции «Биотехнологии в комплексном развитии регионов» (Москва, 2016); Международной научно-практической конференции «Развитие новых технологий селекции и создание отечественного конкурентоспособного семенного фонда картофеля» (Москва, 2016); X, XI

Международных научных конференциях «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2017, 2018); V, VIII, IX Международных научно-практических конференциях «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2017, 2020, 2021); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы картофелеводства: фундаментальные и прикладные аспекты» (Томск, 2018); Международных научных конференциях «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего (PLAMIC)» (Уфа, 2018; Саратов, 2020; Санкт-Петербург, 2022); XIV Международной научно-практической конференции «Биологически активные препараты для растениеводства. Научное обоснование – рекомендации – практические результаты» (Минск, 2018); IV, V Всероссийских конференциях «Фундаментальная гликобиология» (Киров, 2018; Гатчина, 2021); Международном конгрессе «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (Санкт-Петербург, 2019); II Международной научно-практической конференции «Современные подходы и методы в защите растений» (Екатеринбург, 2020); VII Всероссийской конференции с международным участием «Экобиотех 2021» (Уфа, 2021); 3-ем Российском микробиологическом конгрессе (Псков, 2021); Второй Международной научно-практической конференции «Геномика и современные биотехнологии в размножении, селекции и сохранении растений» (Ялта, 2021); IV Национальной научно-практической конференции, посвященной 150-летию со дня рождения Г.К. Мейстера «Инновационные технологии создания и возделывания сельскохозяйственных растений» (Саратов, 2023); VI Всероссийской научной конференции с международным участием «Устойчивость растений и микроорганизмов к неблагоприятным факторам среды» (Иркутск, Большое Голоустное, 2023); VII Международной научной конференции «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (PLANTGEN 2023) (Казань, 2023).

Работа выполнена с 2001 по 2024 гг. на кафедре «Растениеводство, селекция и генетика» ФГБОУ ВО Вавиловский университет. Исследования про-

водились в рамках приоритетного научного направления ФГБОУ ВО Вавиловский университет «Ресурсосберегающее экологически безопасное земледелие» (регистрационный номер 01201151791), по программе «Проведение исследований по разработке организационно-технологического проекта выращивания высококачественных семян отечественных сортов картофеля» Министерства сельского хозяйства Саратовской области и ассоциации «Аграрное образование и наука» (договор № 13 от 14 сентября 2016 г.), в рамках договоров о творческом сотрудничестве с Институтом биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (г. Саратов, Россия) по теме «Закономерности формирования и функционирования ассоциаций растений с микросимбионтами в модельных и природных симбиотических системах» (2013, 2015 гг.) и при частичной финансовой поддержке грантов: Министерства образования и науки Российской Федерации (проект №14.579.21.0012 от 05 июня 2014 г., ID RFMEFI57914X0012; РФФИ № 16-34-00720 «Изучение закономерностей функционирования ассоциаций растений с микросимбионтами в модельных (*in vitro*) и природных (*ex vitro* и *in vivo*) симбиотических системах с целью развития экологически чистых агробиотехнологий»; РФФИ № 19-016-00116/21 «Создание высокопродуктивных растительно-микробных сообществ при коинокуляции картофеля ризосферными бактериями»; РНФ № 22-26-00087 «Растительно-микробные ассоциации в системе семеноводства оздоровленного посадочного материала в условиях аэропоники».

Публикации по результатам исследования

По теме диссертации опубликовано 96 работ, в том числе 8 статей в рецензируемых научных изданиях ВАК Минобрнауки РФ, 9 статей в журналах, индексируемых в международных базах данных WoS, Scopus и 1 патент.

Личный вклад автора

Автором лично проведены все этапы исследования: изучение литературных источников, планирование экспериментов, статистическая обработка и анализ полученных результатов, подготовка текста диссертации, публикация

результатов в научных журналах и апробация на конференциях различного уровня.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 5 глав: обзора литературы, собственные исследования, включающей материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, а также заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка терминов и списка литературы. Текст изложен на 305 страницах, содержащих 60 таблиц и 45 рисунков. Список литературы включает 656 источников, в том числе 549 иностранных.

Глава 1 Обзор литературы)

1.1 Применение метода культуры соматических тканей *in vitro* в агробиотехнологии растений

Метод культуры соматических клеток и тканей растений *in vitro* является базовой составляющей современных агробиотехнологий, в том числе селекции и семеноводства растений [263, 305, 502]. Классическая монография по культуре тканей, написанная Готре в 1959 году, включала 142 вида высших растений [12]. К настоящему времени по разным оценкам около 1000 видов растений могут культивироваться *in vitro*, из них более 100 видов вегетативно размножаемых культур находятся в коммерческом производстве, среди них сельскохозяйственные, декоративные, плодово-ягодные, древесные и другие виды растений, в том числе мягкая пшеница и картофель.

Метод культуры соматических клеток и тканей растений *in vitro* развился в целый ряд методических приемов, направленных на изучение фундаментальных процессов развития растений [6, 294], функционирования генов [347] эпигенетических изменений [156, 322, 329], изменении в экспрессии генов [377] и функционировании малых РНК [612], а также практических технологий производства вторичных метаболитов [263], микроразмножения [130, 395] и селекции растений [314], в том числе на основе клеточной селекции [10, 30], гаплоидии [237] и создания трансгенных растений со специфическими промышленными и агрономическими признаками [418]. Современная агробиотехнология активно использует методы элиминации вирусов для оздоровления посадочного материала [491, 632], клонирования вегетативно размноженных сельскохозяйственных культур [518] и спасения находящихся под угрозой исчезновения культурных и дикорастущих видов растений [69, 210]. Культуры каллусных тканей *in vitro* широко используют для производства вторичных метаболитов, представляющих коммерческий интерес [418]. Растения, полученные с помощью культуры соматических тканей, были использованы в генетических исследованиях для картирования популяции методом анализа QTLs, связанных с аг-

рономическими признаками [622] и в исследованиях мобильных элементов [553]. Долгое время методы культивирования *in vitro* рассматривались исключительно как способ получения растений, которые идентичны растениям-донорам [433]. Они также использовались для получения генетически однородного материала, например, в селекционных целях [645]. Однако другие исследования [320, 398] показали, что культуры тканей *in vitro* склонны к мутациям [378] и были описаны многие фенотипические изменения у растений-регенерантов [26, 653], что стало основой клеточной селекции для получения растений с устойчивостью к болезням (например, рис, пшеница, яблоко, томат), к абиотическому стрессу (например, толерантность к алюминию у моркови, толерантность к соли у табака и кукурузы, устойчивость к высоким температурам у картофеля), к гербицидам (например, табак, устойчивый к сульфонилмочевине) и получения растений с улучшенным качеством семян [30, 160, 385].

1.2 Морфогенез в культуре клеток и тканей растений *in vitro*

Все биотехнологии на основе культуры клеток и тканей *in vitro* основаны на уникальном свойстве растительных клеток – totipotентности, открытой еще в начале прошлого века Г. Хаберландом [12]. Морфогенез в культуре клеток и тканей растений *in vitro* – совокупность процессов дедифференцировки и дифференцировки клеток экспланта, приводящих к формированию тканей, органов и в конечном итоге к регенерации растений. С середины прошлого века началось активное изучение путей клеточной дифференцировки и способов управления морфогенезом [12, 13, 14]. В течение последних нескольких десятилетий генетики и молекулярные биологи заинтересовались морфогенезом растений, и проводится обширная работа по пониманию регуляции экспрессии генов во время морфогенеза и того, как продукты генетической информации контролируют процесс развития [29, 64, 65, 444].

Основные процессы дифференцировки в процессе морфогенеза, приводящие к регенерации растений [12, 13, 14]: органогенез (побегообразование) через формирование меристем побегов и корней, и соматический эмбриогенез

(эбриоидогенез) [65]. Инициация побегов и эмбриоидов возможны как напрямую из тканей экспланта, так и опосредованно, через формирование каллуса. Изучение этих процессов представляет не только академический интерес, но и значительную практическую значимость для развития экономически оправданных процедур клонального микроразмножения растений в семеноводстве и генетического совершенствования растений в селекции сельскохозяйственных культур. Массовое производство генетически идентичных растений путем регенерации из вегетативных тканей путем органогенеза представляет значительный интерес в семеноводстве для ускоренного размножения и оздоровления посадочного материала. Регенерация из соматических каллусных тканей с помощью органогенеза и эмбриогенеза представляет особый интерес для селекции растений.

Несмотря на то, что, предположительно, все клетки растений обладают totипотентностью, реализация морфогенетических процессов, приводящих к регенерации растений наблюдается далеко не всегда. Эффективность культивирования клеток и тканей растений зависит от целого ряда факторов: генотипа донорных растений, типа экспланта, условий культивирования *in vitro*. Традиционно для управления морфогенетическими процессами основное внимание уделялось физическим и химическим факторам культивирования [12].

Известно, что у покрытосеменных растений (пионовые, цитрусовые, луковые, злаковые и др.) в условиях, когда половое воспроизведение невозможно, семенное размножение заменяется вегетативным [93]. Культивирование клеток и тканей в условиях *in vitro* радикально отличается от положения клеток в интактном растении (*in situ*) и является стрессовым [292]. Реакция на стрессовые условия зависит от двух основных параметров: уровня стресса и физиологического состояния клеток. Если уровень стресса превышает клеточную толерантность, клетки погибают. Напротив, более низкие уровни стресса усиливают метаболизм и индуцируют механизмы адаптации [411]. Условия культивирования тканей *in vitro* подвергают экспланты значительным стрессам, так как они удаляются из окружающей среды и помещаются на синтетические среды, содер-

жащие нефизиологические концентрации регуляторов роста, солей и органических компонентов. Стрессы не только способствуют дедифференцировке, но и могут быть использованы для индуцирования образования соматических эмбрионов [292].

Микроразмножение (микроклональное размножение, клональное микроразмножение) в отличии от соматического эмбриоидогенеза и органогенеза в большинстве случаев не предусматривает этапа дедифференциации клеток, так как главной целью метода является сохранение генетической идентичности исходных донорных растений. Исключение составляют, например, злаки, для которых клонирование растений возможно только через формирование каллусной культуры. Тем не менее, размножение исходного экспланта в пробирке на основе существующих или адвентивных меристем также является морфогенезом, так как включает изменение морфологии размножаемого материала еще в пробирке, формирование новых тканей и органов и, в определенной степени, затрагивает адаптацию в период переноса от *in vitro* к *in vivo* (этап *ex vitro*) [498].

Сейчас технологии микроклонального размножения *in vitro* на лабораторном уровне разработаны более чем для 2400 видов растений. Однако коммерческих лабораторий, использующих эти приемы, относительно немного. Это объясняется отчасти тем, что не все разработанные в сугубо лабораторных условиях методики применимы непосредственно в производстве. Часто требуется решение отдельных узловых моментов для конкретных видов растений. Немаловажным является и вопрос экономической эффективности метода [60].

1.3 Химические факторы регуляции морфогенеза в культуре клеток и тканей растений *in vitro*

Для успешного протекания морфогенетических процессов и регенерации растений соматические клетки должны обладать определенным уровнем «компетентности». Для этого дифференцированные соматические ткани должны изначально содержать меристематически активные клетки [459] или приобрести способность к делению и последующей смене дифференциации через дедиффе-

ренциацию. Это важное условие должно соблюдаться и в случае прямой регенерации из тканей экспланта, и в случае предшествующего формирования каллуса [292].

Вопрос о морфогенетической компетентности и связанные с этим вопросы репрограммирования и дифференциации/дедифференциации инициальных клеток эксплантов *in vivo*, дающих начало каллусу *in vitro*, по-прежнему остается дискуссионным [102]. Для реализации морфогенетических процессов необходимо сочетание эндогенных и экзогенных факторов [46, 190, 291, 298, 337, 394, 580]. С одной стороны, в тканях экспланта должны присутствовать компетентные клетки, способные воспринимать индуцирующий сигнал («инициальные клетки каллусов», «стволовые клетки»), с другой стороны, необходимы специфические индицирующие сигналы [102].

Гормоны являются наиболее вероятными и часто используемыми регуляторами переключения состояния дифференциации клеток. Ауксины и цитокинины являются основными регуляторами роста растений, участвующими в регуляции деления и дифференцировки клеток. Для определения судьбы клетки во время органогенеза важны как концентрация, так и соотношение экзогенных гормонов [139, 188].

Влияние экзогенно применяемых ауксинов, преимущественно 2,4-дихлорфеноксиусной кислоты (2,4-Д), на индукцию соматического эмбриогенеза не вызывает сомнения [236, 650]. Однако известно, что эмбриоиды могут развиваться в соматических тканях в отсутствии регуляторов роста [527], а также в присутствии других регуляторов роста, таких как цитокинин [214] или абсцизовая кислота [565]. Негормональные индукторы также могут быть использованы для перехода соматических клеток к формированию меристематических очагов или эмбриоидов. Такими индукторами могут выступать концентрация сахарозы или осмотический стресс [355], ионы тяжелых металлов [354, 603] и высокая температура [571]. Чаще всего в этом случае соматические эмбриоиды формировались непосредственно на поверхности эксплантов без существенного каллусообразования.

Не существует универсального индуктора, который мог бы вызывать гарантированный специфический ответ у всех генотипов растений и гарантировать получение той или иной морфогенетической реакции. Поэтому биотехнология получения фертильных растений-регенерантов у многих видов, в том числе у пшеницы, путем эмбриоидогенеза в каллусной культуре *in vitro* разработана недостаточно [56]. Однако уровни эндогенных гормонов могут рассматриваться в качестве основных факторов, определяющих специфичность клеточных реакций.

Кроме ведущего влияния экзогенных ауксинов для устойчивого роста тканей в культурах *in vitro* растительные клетки могут производить значительное количество эндогенного ауксина индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). Было показано, что более высокая концентрация эндогенной ИУК способствует повышенному эмбриогенному ответу у различных видов растений и эксплантов [31, 266, 284, 437]. В клетках моркови экзогенная 2,4-Д стимулировала накопление большого количества эндогенной ИУК [436, 528]. Эти авторы выдвинули гипотезу о том, что эмбриогенная компетентность клеток моркови тесно связана с многократным увеличением уровня эндогенной ИУК из-за присутствия 2,4-Д. В культуре незрелых зиготических зародышей подсолнечника показано, что простое изменение концентрации сахарозы может приводить к формированию соматических эмбриоидов или каллуса. При этом в формирующихся эмбриоидах уровень содержания эндогенной ИУК был в 4 раза выше, чем в каллусах. Было обнаружено, что полярный транспорт эндогенного ауксина является важным фактором формирования соматических эмбриоидов на семядольных эксплантах женьшеня, которые не требовали применения экзогенных регуляторов роста [227]. По данным Fischer с соавторами [356] определяющее влияние на дифференцировку эмбриональной оси и щитка оказывает полярный транспорт ауксина.

Индолилуксусную кислоту в составе питательной среды часто заменяют на более активные синтетические аналоги: 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту, пиклорам, дикамбра [444, 253, 257] и другие. Среди различных аналогов

ауксина, используемых для индуцирования морфогенеза в соматических тканях, 2,4-Д на сегодняшний день является наиболее эффективным. Этот синтетический аналог ауксинов используется в большинстве систем культивирования клеток и тканей *in vitro*. Предположительно, 2,4-Д, превышающий определенную концентрацию, оказывает двойное действие в этих культурах, как ауксин (непосредственно или через эндогенный метаболизм ИУК) и как стрессор [235, 352]. Для злаков чаще всего используют концентрацию 2,4-Д от 0,5 до 5 мг/л, но для других растений, например, для пальмы масличной может быть использована и более высокая концентрация до 150-200 мг/л [327]. Было также показано, что ауксиновый гербицид влияет на синтез этилена и абсцизовой кислоты (АБК), повышая их содержание в клетках [313, 642]. Высокое остаточное содержание 2,4-Д в каллусных тканях на этапе индукции соматических эмбриоидов ведет к накоплению АБК и этилена и ингибированию процесса соматического эмбриоидогенеза [510].

Изменение уровня экзогенных фитогормонов, в первую очередь ИУК, приводит к изменению экспрессии генов. На протопластах табака было показано, что в течение 20 мин после применения ауксина наблюдалась сверхэкспрессия генов *parA*, *parB* и *parC*, кодирующих S-трансфераз-глутатионы растений. Данные белки отвечают за трансмембранный транспорт и защиту от окислительного стресса. Также было показано, они могут связывать и, вероятно, переносить и хранить природный ауксин (ИУК) [425]. После того, как протопласты табака начинали делиться (к 48 ч культивирования), экспрессия генов прекращалась [584]. Аналогично, ген *parA* экспрессировался в гипокотильных клетках моркови, индуцированных для формирования соматических эмбриоидов 2-часовой обработкой высокими концентрациями 2,4-Д [375].

Дедифференцировка и последующий соматический эмбриоидогенез связаны со сложными изменениями в структуре белков клетки [28, 451, 621]. Было показано, что действие экзогенных ауксинов, по крайней мере частично, основано на деградации специфических белков [409, 534]. Многие ранние реакции растений на ауксин вызваны ауксинчувствительными белками AUX/IAA, кото-

рые димеризуются с членами семейства транскрипционных факторов ответа ауксина (ARF) и, таким образом, ингибируют их [640]. Белки AUX/IAA нестабильны, и их деградация инициируется комплексом убиквитин–белковой лигазы (тип SCF), который регулируется модификацией с помощью белка, связанного с убиквитином [311, 335]. Ауксин ускоряет деградацию короткоживущих белков AUX/IAA для прекращения транскрипции белками ARF [136]. Данный путь деградации белка отвечает за деградацию большинства клеточных белков; не только регуляторов и короткоживущих белков, но и тех, которые выполняют структурные роли и являются долгоживущими [360].

Действие ауксина на культуру тканей также объясняется установлением полярного транспорта. Ауксин транспортируется полярным образом вдоль оси побег–корни, что требует носителей для оттока, таких как белок PIN1 [480]. Асимметричная локализация PIN1 развивается у арабидопсиса в раннем эмбриогенезе в результате актин-зависимого циклирования между плазматической мембраной и эндосомальными компартментами [137]. У *Arabidopsis* PIN белки являются асимметрично локализованными на плазматической мембране, которой приписывается создание локальных градиентов ауксина [566]. PIN 1, один из белков, которые создают и поддерживают градиент концентрации ауксина [261, 487]. Анализ визуализации экспрессии белков pPIN1::PIN1-GFP показал, что градиенты ауксина устанавливаются в тех клетках, которые перерастут в соматические проэмбриоиды [188]. При этом, развитие соматических эмбриоидов можно ингибировать применением нафтилфталаминовой кислоты (NPA) – ингибитора транспорта ауксина. Таким образом, полярный транспорт ауксина происходит во время индукции соматического эмбриоидогенеза, и асимметричное распределение ауксина необходимо для инициации *de novo* первичных органов.

Цитокинин-зависимая экспрессия регуляторных генов также существенно меняется в процессе инициации соматического эмбриоидогенеза. Анализ мРНК цитокинин-чувствительного белка ARR5 (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 5) показал, что его содержание увеличивается в каллусах ини-

цированных из корневых эксплантов и на ранних стациях (на 6 сутки) инкубации на среде для регенерации побегов. После этого, примерно с момента начала формирования примордиев побега, его содержание снижается [486].

На этапе формирования морфогенных зон и регенерации растений из каллусов важное значение имеют цитокинины в сочетании с ауксинами. Причем, добавление в индукционную питательную среду 2,4-Д в дозе 3 мг/л в сочетании с зеатином даже в дозе 0,5 мг/л было полезным для образования морфогенного каллуса [238]. Ahmed с соавторами [554] получили соматические эмбриоиды из апикальной меристемы побега пшеницы на средах, содержащих 6-бензиламинопурин (6-БАП) и 2,4-Д (0,5 мг л/л). Для некоторых генотипов ячменя и пшеницы высокую эффективность показывает тиодиазурон (TDZ) [444, 550]. В целом снижение концентрации ауксинов приводит к органогенезу и регенерации растений (индукции корней и побегов) после переноса каллуса либо на среду, содержащую определенную комбинацию регуляторов роста растений, либо вообще без регулятора [147, 179, 223, 264, 387, 478, 552].

В большинстве случаев, клетки, непосредственно участвующие в регенерации органов, не контактируют напрямую с гормонами в индукционной среде. Поэтому, передача гормонального сигнала через клетки может играть важную роль в реакции эксплантов клетки на гормоны. Обнаружено, что на первом этапе инкубации на среде активируются гены IAA1 (например, IAA5, IAA9 и IAA10), но далее, при переходе на среду для соматического морфогенеза они ингибируются. Предполагается, что эти гены участвуют в транспорте ауксина в ходе образования эмбриоидов и почек.

Белки не только являются хорошо известными ранними маркерами индукции соматического эмбриоида в различных системах [112, 189, [613], но и могут применяться для управления морфогенезом. Белки арабиногалактана (AGPs) - это класс протеогликанов, широко распространенных в растительном царстве, которые вовлечены в различные процессы роста и развития растений [555], включая соматический эмбриоидогенез [639]. О промоторных и ингибирующих эффектах некоторых экзогенных фракций белка арабиногалактана в

культурах моркови сообщили Toonen с соавторами [512]. Фракция AGP, содержащая эпитетоп ЛМ8, оказывала ингибирующее влияние на соматический эмбриогенез у моркови [512]. Добавление изолированных AGP семян моркови к старым, неэмбриогенным клеточным линиям повторно индуцировало их эмбриогенный потенциал [393]. AGP семян способствовали созреванию соматических эмбриоидов у ели норвежской [262].

Эмбриогенные культуры способны секретировать белки, идентифицированные как хитиназы, глюканазы и осмотиноподобный белок. Предположительно, модифицированные хитиназой AGP являются внеклеточными молекулами, способными контролировать или поддерживать эмбриогенное состояние компетентных клеток [457]. Было показано, что эмбриогенная компетентность протопластов может быть восстановлена и усиlena применением AGP, причем более эффективными были формы, расщепленные эндохитиназой [457].

Ряд авторов отмечает важную роль АБК в формировании эмбриоидов в каллусах. В каллусах пшеницы эмбриоидогенез стимулировался привнесении АБК в питательную среду в концентрации от 1 до 3 мг/л. При этом оптимальная концентрация составляла 2 мг/л [56]. Для моркови было показано, что простое нанесение АБК на проростки эффективно индуцировало образование соматических эмбриоидов [565], но только в присутствии эндогенного запаса ауксина. Относительно более высокий уровень эндогенной АБК может привести к снижению морфогенетической реакции. Положительная роль АБК в соматическом эмбриогенезе Дугласовой пихты (*Pseudotsuga menziesii*) отмечают Walther с соавторами [117].

Усиление регенерации растений в культуре, полученной из зрелых зародышей озимой пшеницы, обнаружили в результате дополнения среды MS-B AgNO₃ (20 мг/л) [177]. Нитрат серебра в составе питательной среды также предлагают использовать и другие авторы [253, 275, 348]. По данным Yadav с соавторами [209] добавление AgNO₃ 2,0 мг/л и CuSO₄ 2,5 мг/л в среду для регенерации улучшило частоту регенерации, а также количество побегов. Tung с соавторами [557] предлагают использовать нитрат серебра в качестве альтерна-

тивного способа создания асептической культуры тканей хризантемы. Leon с соавторами [407] изучали влияние различных компонентов среды, таких как аммоний, кальций, сахароза и различных питательных сред [542] на регенерацию культуры зрелых зародышей. Манипулируя концентрацией ионов меди и серебра в составе питательной среды и временем культивирования тканей, можно регенерировать растения, которые либо близки к исходному экспланту, либо наоборот, накапливают изменения, вызываемые культурой тканей [473].

Переход клеток к дедифференцированному состоянию сопровождается изменением внутриклеточного pH. Культивирование клеток моркови в присутствии 1M NH₄Cl [562, 563], приводящее к снижению pH до 4 позволило создать непрерывную культуру проэмбрионов преглобулярной стадии. Развитие эмбрионов было получено при повышении pH до 5,7.

Важное значение для дифференцировки клеток имеет концентрация ионов кальция. Было показано, что повышенная концентрация кальция противодействовала ингибирующему влиянию 2,4-Д на развитие эмбриоидов [176]. Overvoorde и Grimes [477] сообщили, что экзогенная концентрация ионов Ca выше 200 М необходима для оптимального формирования эмбриоидов.

Многие авторы отмечают важную роль типа и концентрации сахаров в составе питательной среды. Для культуры соматических тканей ячменя и пшеницы рекомендуется замена сахарозы на мальтозу в концентрации 30 г/л [47, 282]. По другим данным, сахароза, мальтоза и глюкоза в составе питательной среды в равной степени влияют на морфогенез каллусов пшеницы [68].

В исследовании Aydin с соавторами [250] было оценено влияние трех типов полиаминов (Putrescine, Spermidine, Spermine и их смесь) в дополнение к 12 мг/л дикамбра и 0,5 мг/л ИУК на соматический эмбриоидогенез в культуре зрелых зародышей и регенерацию растений пшеницы. Хотя влияние полиаминов на морфогенный каллус не было значительным, их влияние на скорость его формирования и эффективность регенерации растений были очень значительными. Самая высокая эффективность регенерации были получены на среде MS, содержащей путресцин. Rakesh с соавторами [519], основываясь на известной

роли полиаминов в физиологических процессах растений (дифференцировке, индуцировании totipotentности, увеличении деления клеток, молекулярной передаче сигналов) делают вывод о возможности их применения в культуре клеток и тканей растений *in vitro* в разных направлениях, начиная от образования каллуса и заканчивая активацией вторичных метаболитов.

Модификация исходной питательной среды (чаще всего Мурасиге и Скуга (МС)) [455] может затрагивать сразу несколько компонентов [495], например, для культивирования тропических трав и злаковых были изменены концентрации солей добавлением сульфата магния, фосфата калия, сульфата меди, а также пролина и глутамина [2015]. По мнению автора, модификация, названная средой WPBS, улучшала все аспекты культивирования *in vitro* по сравнению со средой на основе МС.

При микроклональном размножении эффективность получения растений также в сильной степени зависит от типа и химического состава питательной среды. Использование агаризованных сред уменьшает риск витрификации побегов [522], хотя разработаны эффективные системы выращивания органов на жидких средах в биореакторах [305] и методом периодического погружения в жидкую питательную среду [585].

Состав макро и микросолей в питательной среде имеет решающее влияние для скорости размножения и качестве микrorастений. По-прежнему наиболее распространенным составом макро- и микросолей в питательной среде для микроклонального размножения большинства видов растений является пропись Мурасиге и Скуга [455], но количество вариантов модификации или полного изменения состава постоянно растет [76, 305, 432]. Например, был разработан протокол микроразмножения грецкого ореха, основанный на последовательном использовании 0,4 и 0,2 mM флороглюцина во время размножения побегов и показано, что замена FeEDTA на FeEDDHA уменьшает симптомы хлороза и значительно улучшает способность к укоренению генотипов [342]. Добавление кобальта в низкой концентрации (50 mM) в оптимизированную среду при микроклональном размножении древесного бобового растения *Erythrina variegata*

значительно улучшало параметры роста (количество побегов и длину побега) и содержание хлорофилла в листьях, а также ризогенез микрорастений, в то время как более высокие концентрации были вредными.

Углеводы в составе питательной среды играют важную роль не только в регулировании морфогенного поведения культивируемых растительных тканей, а также в изменении скорости размножения [644] и укоренения [539]. Сахароза может заменяться частично или полностью на глюкозу [84, 342], мальтозу, фруктозу, сорбит, маннит [36] и, в редких случаях, лактозу [305].

Установлено, что сигналы фитогормонов могут влиять на метаболизм сахарозы, вызывая инициацию каллуса и дальнейшую регенерацию побегов *de novo* в культуре риса [404]. Анализ способности к регенерации каллусов риса двух сортов Ai-Nan-Tsao 39 и Tainan 11 показал, что повышенная скорость роста и способность к регенерации побегов каллусов сорта Ai-Nan-Tsao 39 могут быть обусловлены более высокой активностью поглощения и метаболизма сахарозы, связанными с возрастанием экспрессии генов *ORYZA SATIVA RESPONSE REGULATOR 1 (ORR1)*, *PIN-formed 1* и *Late embryogenesis-abundant 1*, отвечающих за перенос сигналов соответственно от цитокинина, ауксина и абсцизовой кислоты.

Аминокислоты (глутамин, аланин, аспарагиновая кислота и др.) или их смеси в виде гидролизатов белков (казеина) могут оказывать существенное влияние на повышение качества культур и скорость размножения [305]. Кроме того, среды, содержащие аминокислоты или гидролизат казеина позволяют быстрее выявить инфицирование тканей.

Фитогормоны имеют решающее значение для управления морфогенезом при микроклональном размножении растений. Классическая формула соотношения ауксинов и цитокининов Скуга и Миллера [561] является «центральной догмой» в культуре тканей, но современные представления о гормональном регулировании больше базируются на соотношении эндогенных и экзогенных регуляторов роста. Ауксины обычно рассматривают как основные факторы ризогенеза. При том ИУК часто замещают на аналоги: индолилмасляную (ИМК),

нафтилуксусную (НУК), индолилбутировую кислоты (IBA) [513]. Современные синтетические цитокинины позволяют пластично регулировать морфогенез. Наиболее активными замещенными мочевинами являются тидиазурон (TDZ) [449] и N-(2-хлор-4-пиридинил)N'-фенилмочевина (CPPU) (Fellman et al., 1987). Считается, что TDZ является наиболее мощным регулятором [449], и его основным морфогенным эффектом при микроразмножении является сильное стимулирование пролиферации побегов (превосходящее любой обычный цитокинин), что особенно важно для видов с плохой реакцией на обычные цитокинины [331]. Однако, несмотря на свой благотворный эффект, TDZ может стимулировать индукцию каллуса, что в конечном итоге может угрожать однородности микроразмножаемых растений и приводить к сомаклональной вариабельности. В качестве цитокининов часто используют 6-бензиламинопурин (6-БАП), но повышение концентрации и использование 6-БАП в ряде пассажей может приводить к нарушениям морфологии побегов (витрификации, многовершинности). Гибереллины часто используются на этапе введения в культуру и перед высадкой для стимулирования размера микроклонов [84].

Кроме стимуляторов роста в состав питательной среды могут быть введены и замедлители (ингибиторы) роста для предотвращения аномальных морфогенных паттернов, наблюдавшихся в жидких средах в биореакторах [655], ингибиторы биосинтеза гиберреллина, предотвращающие аномальное развитие листьев и других органов в растениях и тканевых культурах [310, 656].

Предпринято много попыток включения в состав среды новых типов биорегуляторов, таких как полиамины, брацциностероиды, жасмоновая кислота и тургорины [541]. Выявлено, что салициловая кислота в составе питательной среды способствует лучшей приживаемости меристем, улучшает новообразование узлов и побегов [39].

Мета-тополин (мТ) использовался в качестве альтернативного цитокинина в исследованиях по микреклональному размножению растений [125, 434, 471, 616]. Положительное влияние мТ обнаружено при использовании в сочетании с цитокининами и ауксинами [582]. Показано, что мТ обладает потенциа-

лом не только индуцировать образование побегов, но и помогать в укоренении и акклиматизации растений [125, 128, 248, 579, 587]. По сравнению с БАП, мТ метаболизируется гораздо быстрее и транспортируется во все части растения во время акклиматизации [434, 616].

На инициальном этапе добавление в среду аскорбиновой кислоты (750 – 100 мкМ) или глутатиона восстановленного (100 – 250 мкМ) снижает вредное влияние продуктов окисления фенолов на экспланты [84].

1.4 Эксплант и физические факторы регуляции морфогенеза в культуре клеток и тканей растений *in vitro*

В культуре соматических тканей важное значение имеет тип экспланта. Для злаков, в том числе для пшеницы каллусогенез и регенерация могут быть получены из различных эксплантов, таких как зрелый зародыш [282, 505], незрелый зародыш [150, 258, 318], сегмент листа [326], пыльник [524], незрелый колос [158, 384] и микроспоры [259], но эффективность регенерации *in vitro* в большинстве случаев остается низкой и зависит от генотипа [592]. Для пшеницы, как и для многих других культур, удобным и отзывчивым к культивированию *in vitro* эксплантом часто является зародыш. Большинство авторов сходится в том, что наиболее эффективным является использование незрелых зародышей, в случае с пшеницей обычно выделенные на 14 сутки после опыления [218]. Многие исследователи пытались использовать зрелые зародыши, так как этот тип экспланта доступен в любое время года без дополнительных усилий [209, 505]. Как правило, авторы указывают на получение каллуса и возможность регенерации из них, но с низкой частотой и высокой зависимостью от генотипа донорных растений [80, 178, 216, 517]. Предпринимаются попытки использовать не только зрелые зародыши, но и вместе с эндоспермом, для чего предлагается использовать питательную среду с 12 мг/л дикамбы и 0,5 мг/л ИУК [139]. Также могут быть использованы апикальные меристемы из побегов пророщенных зерновок [253].

Eapen и Rao [240] изучали влияние ориентации зародышей на индукцию каллуса. Зародыши помещали на среду тремя различными способами: (а) щитком вверх, (б) щитком в контакте со средой и (в) одной стороной щитка и осью зародыша в контакте со средой. Частота и интенсивность развития каллуса оказались лучшими в ориентации (а) и наименьшими в ориентации (в). Chang с соавторами [325] показали влияние размера зародыша на формирование эмбриогенного каллуса у сорта ячменя (*Hordeum vulgare* L cv. Morex).

Ранение во время вычленения экспланта само по себе является важным сигналом в индукции дедифференциации [454].

В интактных растениях важное значение для развития клеток имеет формирование полярности внутри клетки и ткани. Поляризованное развитие зиготы и эмбриона включает формирование меристем побегов и корней, которые поддерживают апикально–базальную полярность на протяжении всего развития растения [376]. Вероятно, поляризация играет важную роль для определения способности клеток к соматическому эмбриоидогенезу. Доказательством служат опыты по применению электрического поля к протопластам люцерны, которое усиливало прямой эмбриоидогенез [229].

Каллусные культуры как правило культивируются в темноте, но регенерация соматических эмбриоидов и почек чаще проводятся на свету [305]. Сравнительное исследование эффективности освещения тканевых культур сахарного тростника источниками двух типов (люминесцентными и светодиодными) показало, что фаза индукции соматических эмбриоидов должна проводиться под флуоресцентными светильниками, а оставшийся процесс микроразмножения и адаптация растений к естественным условиям лучше протекают с использованием светодиодного освещения [633].

Для некоторых генотипов пшеницы обнаружен эффект низкотемпературной обработки [316] и комбинированный эффект применения колхицина, L-пролина и низкой температуры на этапе инокуляции [559], влиявшие на увеличение скорости дифференцировки тканей пшеницы. Стимулирующий эффект кратковременного воздействия (2 сут.) низкой температуры (4°C) на частоту

индукции морфогенетического каллуса был показан для различных генотипов мягкой пшеницы [100].

Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения (632,8 нм, 12 МВт) на морфогенетические и регенерационные процессы в каллусной культуре пшеницы (cv. Skala) исследовали Salyaev с соавторами [595]. Они наблюдали заметное увеличение числа регенерированных растений, когда каллус подвергался облучению. Конечный выход регенерированных растений составил 38% в облученных образцах по сравнению с 25% в контрольных.

В культуре тканей и органов при микроклональном размножении тип и качество экспланта также имеют большое значение [498] и влияют на способность формировать новые почки и побеги, увеличиваться в размере и укореняться, а также адаптироваться в дальнейшем к условиям *ex vitro*. Основной подход к выбору экспланта заключается в предпочтении ранних этапов онтогенетического развития тканей экспланта. Этот фактор влияет не только на простоту получения асептического материала для введения в культуру и интенсивностью новообразования органов, но и поддержание исходной генотипической идентичности [424].

Одной из основных проблем культивирования растительных тканей *in vitro* является плохая вентиляция в культуральных сосудах [453]. В закрытых сосудах при микроразмножении создается особая газовая среда, состав которой отличается от окружающего. Накопление газов может быть ответственно за потери при микроразмножении [219, 220]. Интенсивность газообмена зависит от типа культурального сосуда и способа запаковки сосуда (пробки) [288]. Чрезмерное накопление CO₂ (до 20%) [219, 220] может вызывать карликовость или появление альбинизма в побегах (например, *Cordyline terminalis*, *Ficus benjamina*) [221]. Культивируемые растительные ткани генерируют CO₂ во время дыхания, и поглощается в значительных количествах он только фотосинтетически активными клетками или тканями. Показано, что принудительное обогащение атмосферы культуральных сосудов CO₂ для фотосинтезирующих культур приводит к повышению эффективности фотосинтеза и усилении

накопления биомассы, в том числе за счет формирования клеточных стенок [207].

Этилен влияет на различные морфогенные реакции в культурах растительных тканей. Как и в условиях *in vivo*, этилен может ингибировать рост и ускорять старение *in vitro*, например, стимулировать клубнеобразование картофеля *in vitro* [332], ингибировать рост эксплантов гвоздики [431] и удлинение побегов у роз [599]. В то же время было описано несколько положительных эффектов этилена. К ним относятся подавление апикального доминирования и увеличение продукции пазушных побегов у бромелиевых [219, 220], усиление развития луковичных примордий в регенерированных побегах тюльпанов [583], стимуляция роста протокормов орхидей, мини-черенков картофеля и побегов гербера [108]. Использование ингибиторов биосинтеза и действия этилена [618] часто оказывалось полезным при разработке надежных систем микроразмножения. Содержание кислорода обычно определяется газообменом сосудов. Имеются некоторые сообщения о стимуляции пролиферации побегов гипоксией [338, 463].

Свет оказывает сильное влияние на морфологию развития растений и может изменять ее двумя способами: через фотосинтез и через фотоморфогенез. Обычно фотосинтез обеспечивает зеленые растения достаточным запасом энергии. В тканевых культурах условия чаще всего недостаточны для поддержания автотрофного развития; преобладает миксотрофия [221]. Увеличивая освещенность и содержание CO₂ можно достичь более высокого уровня автотрофии [391]. Интенсивность света влияет на рост и пролиферацию побегов, а также на ризогенез [456]. При микроразмножении дневной свет полностью заменяется искусственными источниками света с другим спектром, который обусловливает фотоморфогенез *in vitro*. Люминесцентные лампы являются наиболее часто используемым источником света в лабораториях по культивированию тканей растений. Лампы могут различаться по спектральному составу [448, 564]. Можно считать, что спектральный баланс лампы, а не интенсивность потока света (фотонов), является определяющим фактором в фотоморфогенезе

микрорастений. Большинство фотоморфогеных реакций индуцируется либо красными, либо синими длинами волн. Синий свет часто отвечает за карликовые растения, в то время как красный свет вызывает удлинение [126, 408]. Спектральный эффект света может быть подавлен биорегуляторами [305]. Из исследований *in vivo* видно, что влияние света обусловлены не цветом спектра света как таковым, а соотношением R (красного):FR (инфракрасного), B (синего):R (красного) и B (синего):FR (инфракрасного) цветов [366]. Качество света может влиять на доступность ингредиентов среды (например, железа) для растительного материала. С появлением технологии светодиодов (LED) был достигнут впечатляющий прогресс в контроле окружающей среды и морфогенетических реакциях в соответствии со светом, используемым для освещения культур [413].

Продолжительность освещения в течении суток (фотопериод) оказывает значительное влияние как на развитие побегов, так и на развитие корней *in vitro*. Обычно используется 18-16-часовая продолжительность освещения в сутки. Такой фотопериод обеспечивает индукцию побегов у многих видов, в то время как более короткий фотопериод необходим для стимуляции укоренения или клубнеобразования у картофеля [305]. Существенное влияние продолжительность фотопериода оказывает на цветение растений *in vitro* [461]. Интенсивность света в условиях *in vitro* намного ниже, чем солнечный свет, и может вызвать стресс при переносе растений в условия естественного освещения на этапе адаптации. В сочетании с водным стрессом и высокими или низкими температурами (сочетание факторов, которые могут возникать на любых стадиях переноса *ex vitro*) эти факторы могут привести к фотоингибиции в хлоропластах [412].

Чтобы ускорить рост и морфогенез *in vitro*, культуры, как правило, поддерживаются при средних температурах, которые обычно выше, чем те, в которых произрастают те же растения в условиях *in vivo*. Средняя температура в помещениях в большинстве случаев составляет 25°C (в диапазоне от 17 до 32°C). В освещенных помещениях температура внутри культурных сосудов

обычно на несколько градусов выше комнатной из-за парникового эффекта [222]. Перегрев культур чаще всего приводит к ингибированию их роста [305]. При этом, в ряде случаев индуцирование органогенеза может проходить при более низких (12-15 °C) [127, 295, 319] или более высоких температурах (28, 35 °C) [124]. Для многих видов растений снижение температуры (до 18-22 °C) стимулирует ризогенез. Значительные видоспецифичные колебания температур стимулируют формирование и прорастание микроклубней и микролуковиц [305].

1.5 Влияние генотипа донорных растений на эффективность морфогенеза в культуре клеток и тканей растений *in vitro*

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в области культивирования клеток и тканей растений *in vitro*, на практике при изучении широкого спектра генотипов частота регенерации в культуре соматических тканей разных видов, особенно злаков, к которым относится пшеница, колеблется по сортам от 0 до 60 % [226, 503]. Эффект генотипа донорного растения является определяющим в успешности культивирования клеток и тканей растений *in vitro* по мнению большинства исследователей [458, 158]. Скрининг большого количества сортов пшеницы показал, что способность к регенерации варьирует от 0 до 100 %, и позволил выделить генотипы с частотой регенерации до 70-100 % [49, 96, 349, 401, 426]. Было отмечено, что индукция каллуса у всех генотипов высокая, на уровне 90-100 %, и межсортовые различия на этом этапе незначительные [401, 547]. Именно генотипические особенности экспланта не позволяют создать универсальную технологию получения морфогенных каллусов и растений-регенерантов, пригодную для надежного использования в специальных методах селекции и экспериментальной биологии, таких как получение гаплоидов, генетическая трансформация, клеточная селекция, клонирование однодольных растений. Многие исследования проводятся на, так называемых, модельных сортах, обладающих высокой эффективностью каллусогенеза и регенерации растений. Например, для пшеницы модельными являются сорта

Bobwhite и Fielder [443]. Из зародышей мягкой пшеницы сорта Glennos после 8 месяцев культивирования можно получать до 65 растений на грамм эмбриогенного каллуса [419]. Но данные сорта часто имеют недостаточно хорошие хозяйствственно-биологические признаки и не могут быть использованы в селекционном процессе.

На основе анализа способности к индукции морфогенного каллуса и регенерации растений в культуре *in vitro* зародышевых тканей 48 коммерческих сортов и 10 видов ди-, тетра- и гексапloidных форм пшеницы было установлено, что тетрапloidные ВА-геномные растения пшеницы *Triticum carthlicum* Nevski, *T. turgidum* L. и *T. polonicum* L. превосходят А-геномные диплоидные формы *T. monococcum* L., *T. sinskajae* A. Filat. et Kurk. и BAD-геномные гексапloidные формы *T. compactum* Host., *T. shaerococcum* Perciv. по эффективности формирования морфогенного каллуса в культуре незрелых зародышевых тканей. G-геномные виды пшеницы *T. timopheevii* Zhuk. (4n, GA-геном) и *T. kiharae* Dorof. et Migusch (6n, GAD-геном) в культуре незрелых зародышей характеризовались формированием большой доли альбиносных растений-регенерантов при невысоком морфогенном потенциале. Исследования показали, что тетрапloidные (*T. durum* Desf., *T. dicoccum* (Schrank)) и гексапloidные (*T. aestivum* L., *T. shaerococcum* Perciv.) коммерческие сорта делятся на три группы по уровню морфогенного ответа в культуре незрелых зародышей: низко-, средне- и высокоморфогенные. Последние характеризуются большой долей морфогенного каллуса (более 65%) и способностью регенерировать 10-20 побегов из каждого каллуса [80, 444]. При сравнении видов по способности к образованию каллуса из зародышей можно построить следующий убывающий ряд *T. aestivum* L. (ABD) > *T. durum* Desf. (AB) > *T. timopheevii* Zhuk. (AG) > *Aegilops cylindrica* (CD), по приросту каллусной массы на начальных этапах культивирования – *T. durum* Desf. (AB) > *T. aestivum* L. (ABD) > *T. timopheevii* Zhuk. (AG) > *Aegilops cylindrica* (CD), по проценту выхода гетерогенных каллусов – *T. aestivum* L. (ABD) (65 %) > *T. timopheevii* Zhuk. (AG) (40 %) > *A. cylindrica* (CD) (30 %) > *T. durum* Desf. (AB) (20 %) [49].

Перспективным подходом к исследованию регуляции ранних этапов морфогенеза является выявление генов, специфически транскрибуемых в момент перепрограммирования, и изучение их влияния на регенерацию растений [218]. В настоящее время выделен и изучен ряд генов, контролирующих развитие зародышей, формирование побегов и цветков [44, 93, 205, 296, 301, 333, 381].

Поиск маркерных генов, указывающих на переход соматической клетки в эмбриогенную, привел к идентификации генов *SERK* (Рецепторная киназа соматического эмбриогенеза) [112, 114]. Schmidt et al. [112] впервые наблюдали транзиторную экспрессию *SERK* в небольшой субпопуляции увеличенных и вакуолизированных клеток в эмбриогенной культуре, полученной из гипокотильного экспланта *Daucus carota* (морковь) в присутствии 2,4-дихлорфеноксиусной кислоты (2,4-Д). Аналогичные гены были выявлены у самых разных видов растений. Было сообщено, что первоначального высокий уровень экспрессии генов *SERK* постепенно снижаются на последующих стадиях развития соматического эмбриоидогенеза [112, 206, 586].

Гены *LEC* играют центральную роль в контроле эмбриогенеза и кодировании транскрипционных факторов. Было установлено, что эктопическая экспрессия только *LEC1* и *LEC2* достаточна для запуска развития эмбриона в вегетативных клетках [129, 172, 403, 608], причем даже в отсутствии ауксинов [129, 403].

Гены *YUC*, продукты которых являются важными ферментами, участвующими в пути биосинтеза ауксина [402, 403] стимулируют активность *LEC2* и накопление ауксина, вызывающего индукцию соматического эмбриогенеза [328].

Ген *WUSCHEL* (*WUS*) - это homebox-ген, который кодирует фактор транскрипции, регулирующий пул стволовых клеток в апикальной меристеме побега (SAM) в недифференцированном состоянии [538, 606]. Экспрессия *WUS* ограничена небольшой группой клеток в нижней части центральной зоны SAM; однако он может передавать сигналы через клеточные слои [538].

Ген *CLV3 (CLAVATA)* [643], который экспрессируется в нижележащих клеточных слоях, контролирует размер стволовой клетки, подавляя *WUS* на транскрипционном уровне [171, 589]. Было обнаружено, что размер SAM мутантов *CLV1*, *CLV2* и *CLV3* увеличивается с экспрессией *WUS* [112].

Показана роль семейства транскрипционных факторов *WOX* (*WUS homeobox*) в регуляции эмбриогенеза растений [388, 481, 609, 649]. Сверхэкспрессия гена арабидопсиса *PGA6*, который идентичен *WUS*, резко увеличивала инициацию соматического эмбриогенеза во всех культивируемых эксплантах [609]. Zheng с соавторами [135] сообщили о AtWus как о возможном кандидате на ген, способствующий переходу неэмбриогенного каллуса в эмбриогенный во время соматического эмбриогенеза у хлопчатника (*Gossypium hirsutum*). Однако, экспрессия *WUS* коррелирует с уровнем экзогенного ауксина, применяемого в среде для индукции соматического эмбриоидогенеза у арабидопсиса.

Основная масса данных о генетической регуляции процессов соматического эмбриогенеза получена на двудольных растениях, в первую очередь на *Arabidopsis thaliana*. Данные об аналогичных процессах у злаков не столь многочисленны и отрывочны. Тем не менее, у пшеницы [195] и *Aegilops tauschii* [194] также изолированы и охарактеризованы гены семейства *WOX*, играющие роль координаторов транскрипции в ходе раннего эмбриогенеза этих злаков.

Белки GLPs являются маркерами прорастания полового зародыша [611] и часто экспрессируются на ранних стадиях прорастания в зародышах пшеницы. Гены этой группы обнаруживаются в соматических эмбриоидах [187, 196].

Таким образом, гены *LEC* и *WUS* надежны с точки зрения их высокой экспрессии прежде всего на ранней стадии клеточной дифференцировки, а также являются эмбриоспецифичными. *SERK* может быть менее надежным маркером из-за его экспрессии на всех стадиях соматического эмбриогенеза, а также в неэмбриогенных тканях. Функция продуктов GLP-кодирующих (*GLP*) генов в качестве белковых маркеров так же высока, как и экспрессия этих генов особенно на самых ранних стадиях соматического эмбриоидогенеза и их можно считать потенциальными генными маркерами. Эти гены обладают двумя при-

знаками, необходимыми (но недостаточными) для того, чтобы быть кандидатами в качестве маркеров: они необходимы для индукции соматического эмбриогенеза, а также обнаруживаются в тканях. Поиск маркеров соматического эмбриогенеза продолжается [420].

В процессе дедифференцировки и дифференцировки соматических клеток, обеспечивающих восстановление целого растения, могут быть задействованы эпигенетические механизмы, ведущие к модуляции экспрессии генов [442]. Исследования арабидопсиса выявили роль микроРНК в регуляции генов транскрипционных факторов, таких как *LEC2*, *LEC3* и *FUS3* в раннем соматическом эмбриогенезе [441]. Метилирование ДНК и ремоделирование хроматина также были идентифицированы как эпигенетические механизмы регуляции индукции соматического эмбриогенеза [410, 543].

Поскольку сигналинг ауксина играет ключевую роль в молекулярном механизме, контролирующем переход соматических клеток растений к эмбриоидогенезу, была проанализирована экспрессия генов *AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF)* в эмбриогенной культуре арабидопсиса. Исследование показало, что 14 из 22 ARF транскрибировались во время соматического эмбриоидогенеза. Анализ РВ-ПЦР показал, что экспрессия шести генов *ARF* (*ARF5*, *ARF6*, *ARF8*, *ARF10*, *ARF16* и *ARF17*) была значительно выше, тогда как пять других генов (*ARF1*, *ARF2*, *ARF3*, *ARF11* и *ARF18*) была существенно подавлена у эксплантов, образующих соматические эмбриоиды. Это свидетельствует о роли генов ARF, которые являются ключевыми регуляторами передачи сигналов ауксина, в соматическом эмбриогенезе в культуре клеток растений [647].

У разных видов растений выявлены сотни последовательностей, транскрибируемых в процессе соматического эмбриогенеза или органогенеза [236, 300, 551]. Однако не много генов, играющих непосредственную и мажорную роль в индукции морфогенеза. Среди генов, функции которых связаны именно с ранними этапами дифференциации, можно назвать гены *EMB30/GNOM* [308], *Babyboom (BBM)* [243, 274] и *SEPK* [112]. В последнее время предлагаются способы увеличения регенерационной активности эксплантов и каллусов путем

трансформации конструкциями, содержащими факторы транскрипции *Babyboom (Bbm)* and *Wuschel2 (Wus2)*, называемыми морфогенными генами, например, в культуре соматических тканей из зародышей кукурузы [629].

В позднем эмбриогенезе риса выявлена индуцируемая АБК экспрессия гена *OSGH3-2* из семейства *GH3*, определяющего уровни ауксинов и АБК.

Была выделена последовательность ДНК, специфически транскрибируемая в микроспорах растений табака, индуцированных к соматическому эмбриогенезу холодовым стрессом [619]. Первичный анализ функции исследуемого гена *ntsm10* с помощью инактивации антисмысловой конструкцией (RNAi) показал необходимость этого гена для образования и развития эмбриоидов из микроспор. Было изучено влияние гена *ntsm10* на индукцию органогенеза у тканей табака [18, 92]. При сравнении морфогенетических реакций линий табака *in vitro* установили, что инактивация гена *NtDCN1* вызывала усиление побегообразования и ослабление ризогенеза, а восстановление работы гена возвращало процессы органогенеза к контролльному уровню. Разница между линиями проявлялась только при определенном соотношении экзогенных гормональных добавок.

Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в сочетании с обратной транскрипцией был обнаружен ген-кандидат, обозначенный как *TaCAT1*, который кодирует каталазу и существенно коррелирует с признаком высокой регенерационной способности незрелых зародышей пшеницы [260]. Установлено, что между сортами пшеницы с высокой и низкой регенерационной способностью различия по данному белку заключались в трех аминокислотных заменах.

Для регуляции экспрессии целевых генов, детерминирующих этапы соматического эмбриоидогенеза предлагается использовать микроРНК [567]. Десять микроРНК и их гены-мишени были изучены в культуре соматических каллусов апельсина на этапах соматического эмбриоидогенеза. Поскольку микроРНК действуют путем подавления экспрессии мишней, ожидались взаимные паттерны экспрессии между микроРНК и мишениями. В большинстве случаев тенденции экспрессии мишней были точно противоположны тенденциям экспрессии

прессии микроРНК, но иногда они казались нерегулярными. МикроРНК способны не только направлять расщепление мишени микроРНК, но также способны опосредовать трансляционную репрессию или метилирование ДНК. Кроме того, вероятно, существуют неизвестные факторы, участвующие в системе взаимодействия микроРНК–мишени. Были обнаружены некоторые микроРНК, характерные для определенных этапов соматического эмбриоидогенеза. Sinha с соавторами [560] на основании своих исследований предлагают использовать miR167d-5p для скрининга регенерационной способности каллусов различных генотипов риса. Они установили, что экспрессия данной РНК в 30 раз выше в каллусах, содержащих зоны регенерации, по сравнению с неморфогенными каллусами.

Было выявлено, что множество ядерных и цитоплазматических генов у различных культур может оказывать влияние на способность тканей к морфогенезу в культуре тканей *in vitro* [321]. Также была установлена локализация ядерных генов на хромосомах, обнаружены реципрокный и гетерозисный эффекты у гибридов F1 [49, 101, 379, 380, 426]. При этом отмечалось, что данные гены не являются собственно «генами культуры тканей».

В селекционной или семеноводческой работе выбор генотипов осуществляется по агрономическим критериям, а не на основе совместимости с используемым методом культивирования тканей. Использование специальных генетических систем, способных оказать положительное влияние на морфогенез в культуре соматических тканей или при гаплопродукции, приведет к увеличению времени создания сорта и повышению затрат. Поэтому ценно заранее знать реакцию селекционных линий и сортов на возможность биотехнологических манипуляций в культуре *in vitro*. С этой точки зрения важно установить влияние на морфогенез основных генетических систем, детерминирующих ценные агрономические свойства и обладающие четким фенотипическим проявлением. Сведений о влиянии индивидуальных генов на проявление тотипотентности клеток *in vitro* у объектов с трудной регенерацией, к которым относятся злаки, недостаточно. Для определения эффектов генов необходимо созда-

ние генетических моделей, включающих в себя изогенные линии, где известна функциональная связь между экспрессией гена и его фенотипическим проявлением.

Аллели гена *RG3C*, *RG7H* и *RG8F* дикого родственника томата *Solanum pennellii*, способные существенно повысить эффективность формирования побегов и корней в каллусной ткани, были перенесены с помощью генетической трансформации в культурный томат (*Solanum lycopersicum*) и созданы почти изогенные линии [302]. Установлено, что данные аллели стимулировали морфогенез, в том числе образование почек и корней в каллусах почти изогенных линий. При этом, аллели *Rg7H* и *Rg8F* не индуцировали усиленного ветвления, что открывает возможность для выведения сортов и гибридов томатов с улучшенной способностью к регенерации *in vitro* и производству трансгенных растений без нежелательного изменения архитектоники растений. Предварительная оценка агрономических признаков, показала, что они не приведут к снижению урожайности в полевых условиях при введении в коммерческие сорта или гибриды [302].

Процессы индукции каллусогенеза изучали у изогенных по генам контроля типа *Vrn* и темпов *Ppd* развития линий озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum L.*) в генотипе сорта Мироновская 808 [2]. Изолинии *Vrn* B1a и *Ppd* B1a отставали по темпам роста на уровне *in vivo*, но проявляли максимальные показатели частоты формирования каллуса и скорости его роста в условиях *in vitro*.

Положительная роль генов *Rht*, расположенных на хромосоме 4B, в регуляции морфогенеза пшеницы в культуре клеток и тканей отмечался в связи с их влиянием на метаболизм гормонов (Hermsen, 1963, цитировано по 426, 428]. Влияние *Rht*-генов на регенерацию в культуре незрелых зародышей также изогенных по *Rht*-генам линий в генофонде сорта Новосибирская 67 обнаружили Омельянчук Н. А. и Гвоздев А. В. [70]. По их данным, ген *Rht-D1b* обладает большим положительным эффектом по признаку способности к регенерации, а также по способности к образованию пассируемых каллусов, чем ген *Rht-B1c*.

Изучение изогенных линий, несущих другие гены (*Lr-Tr*, *Pm4b*, *Pm*, *b1*, *Hg*) и сочетания генов (*B1Hd*, *Q*, *Ppd1Ppd2Ppd3*) не выявило прямых корреляций их с регенерационной способностью каллусов. Позднее ими было обнаружено влияние гена, контролирующего опущенность листьев [504].

В ФГБОУ ВО Вавиловский университет проводились исследования по изучению влияния генов короткостебельности системы *Rht* на морфогенез в культуре соматических тканей и андроклинию мягкой и твердой пшеницы [95]. С этой целью проводится скрининг набора изогенных сестринских линий, альтернативных по генам короткостебельности *Rht-B1b*, *Rht-B1c*, *Rht-14*, *s1*, *Q* в культуре пыльников и соматических тканей *in vitro* мягкой и твердой пшеницы.

В культуре пыльников *in vitro* [614] попарное сравнение линий, содержащих гены короткостебельности, и их высокорослых сибов показало, что среди взятых в изучение линий во все годы изучения достоверное превышение изучаемых показателей отмечалось у линий с генами *Rht-B1c* и *Q*. У линии с геном *s1* отмечалось снижение выхода морфогенных пыльников и новообразований. В то же время, сравнительное изучение влияния гена *Rht-B1b* на этапы культивирования пыльников трех сортов твердой пшеницы показало достоверное снижение эффективности культивирования гаплоидных структур в генофоне двух из них.

В культуре соматических тканей [615] выявлены гены *Rht-B1c* и *Rht14*, обладающие сильным положительным эффектом на формирование морфогенных каллусов и сохранение регенерационной способности в процессе пассиривания. При этом гены *s1* и *Q* достоверно тормозили морфогенетические процессы в каллусах. Ген *Rht-B1b* также снижал эффективность закладки меристематических очагов и регенерации растений.

Достоверный положительный эффект на процессы каллусогенеза и регенерации на среде для инициации в культуре тканей *in vitro* отмечен у линий подсолнечника, несущих гены короткостебельности *dw1*, *dw3*, *dw5*, *dw6*, *dw7* и *dw10* [59], а также гены, связанные с окраской язычковых лепестков *pa*, *la* и *l* [62].

Исследование генов вели не только с точки зрения их влияния на параметры культивирования клеток и тканей пшеницы *in vitro*, но и также на биохимические процессы, сопряженные с морфо-анатомическими явлениями [95]. Совместно с учеными ИБФРМ ФИЦ СНЦ РАН методом иммуноферментного анализа была установлена связь между морфогенетическими процессами в каллусе и накоплением молекулярного маркера меристематических клеток – пролиферативного антигена инициалей (ПАИ) [7, 25, 86]. Установлено, что клеточные культуры, несущие ген *Rht-B1c*, накапливают ПАИ интенсивнее, что отражает повышенную морфогенетическую активность этих линий. Кроме того, была установлена общая закономерность динамики содержания ПАИ в соматических каллусах пшеницы, заключающаяся в снижении уровня его содержания в процессе каллусогенеза и повышении уровня его содержания при вторичной дифференциации клеток до определенного максимального уровня в процессе регенерации растений.

1.6 Биологические факторы регуляции морфогенеза в культуре клеток и тканей растений *in vitro*

1.6.1 Ризосферные рост-стимулирующие бактерии и их влияние на растения

Сопряженное развитие микробиологии, физиологии и биохимии растений, в том числе в рамках сельскохозяйственной биотехнологии привело к пониманию растения как голобионтной системы [315, 597]. Растения тесно связаны с микроорганизмами. Практически невозможно выделить орган или ткань растения, которые не находились бы в контакте с бактериями или грибами. Это позволило многим авторам говорить о «микробиоме хозяина» [620], «втором геноме» [626] и характеризовать растения как суперорганизмы [435], метаорганизмы [626] или пангеномы [620], и даже говорить о «расширенных фенотипах» [430].

Бактерии взаимодействуют с растениями на протяжении всей эволюции [597]. Взаимодействия бактерий с растением-хозяином классифицируются как комменсалистские, мутуалистические и антагонистические [272, 353, 501]. Наибольший контакт растений с бактериями происходит в корневой зоне, но также они могут проникать в растения через листья, цветы, стебли и семядоли, и колонизировать все растение [273]. Бактерии могут передаваться через семена или вегетативные органы [484].

Эндофитные микроорганизмы живут на протяжении всего жизненного цикла или части жизненного цикла в живой ткани растения, не вызывая симптомов заболевания [646]. Некоторые эндофиты очень специфичны для генотипа хозяина, но у других более широкий спектр потенциальных хозяев [533]. Эндофиты могут оказывать положительное действие на растения за счет различных механизмов. Выделяют три направления положительного воздействия эндофитов на растения: улучшение условий питания (азотфиксация, повышение доступности фосфора и микроэлементов), синтез стимуляторов роста (гормонов, ферментов и других органических соединений), подавление патогенов (производство сидерофоров, антибиотиков, ферментов, повышение системной устойчивости растений) [509].

Важнейший механизм воздействия микроорганизмов заключается в синтезе гормонов, стимулирующих морфогенез растений [529, 439]. Ауксины, которые вырабатываются многими бактериями, влияют на развитие корневой системы, тем самым усиливая поглощение питательных веществ и воды из почвы [485]. Цитокинины продлевают период способности листьев ассимилировать, увеличивая количество продуктов фотосинтеза, и замещают растительные цитокинины, теряемые в условиях засухи [213]. Бактериальные гиббереллины поддерживают рост элонгацией [169], а уровень этилена может быть уменьшен с помощью бактериальной дезаминазы 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (ACC), что снижает восприимчивость растений к стрессу [493, 544].

Защита от абиотического стресса может быть вызвана воздействием веществ, которые модифицируют реакции на стресс или стимулируют растение

активировать метаболические реакции, связанные с толерантностью к стрессу, такие как осмопротекторы, например, глицин-бетаин или пролин [230, 536, 604]. Примером бактерий, которые могут повышать толерантность растений к стрессу засухи и засоления могут служить *Azospirillum brasilense*, *Achromobacter piechaudii*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus safensis*, *Variovorax paradoxus* и *Pseudomonas polymyxa*, *Pseudomonas oryzihabitans* [11, 140, 255, 277, 530, 536]. Эндофитные бактерии могут также участвовать в защите фотосистемы растений от экстремальных условий окружающей среды посредством активации гормонозависимой системы и улучшения транспорта электронов [514].

Известна способность эндофитных микроорганизмов защищать растения от воздействия патогенных микроорганизмов за счет прямого воздействия на патогены, а также стимулирования защитных систем растений-хозяев [3, 297, 362, 570, 602].

Микроорганизмы могут заселять различные органы растений, но наибольший интерес представляют бактерии, обитающие на поверхности и в тканях корней. Населяющие ризосферу и ризоплану бактерии образуют с корневой системой растений прочные ассоциации и формируют специфические ризосферные бактериальные сообщества. Такие взаимоотношения характеризуются терминами «ассоциативные бактерии», «ассоциативные взаимоотношения», «ассоциативный симбиоз» [98, 148, 233]. В отличии от симбиотических бактерий бобовых растений, ассоциативные ризосферные бактерии не образуют специфических структур на корнях. В качестве ассоциантов могут выступать представители различных родов бактерий: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Xantomonas*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Burkholderia* и др. [75, 197, 228, 281, 283, 371, 389, 440, 546, 607]. Ризосферные бактерии, обладающие совокупностью полезных для растений свойств, получили название PGPR (от Plant Growth Promoting Rhizobacteria – ризобактерии, способствующие росту растений) [343, 390, 452]. Положитель-

ное действие ризосферных ассоциативных азотфиксацирующих бактерий на растения основано на комплексе взаимосвязанных свойств: азотфиксации, выделении физиологически активных веществ стимуляторов роста, антагонизме по отношению к фитопатогенным грибам и бактериям [38, 97, 145, 180, 249, 330, 382, 593]. Полезные свойства ризосферных бактерий и механизмы их влияния подробно рассмотрены в ряде обзоров и книг отечественных и зарубежных авторов [16, 277, 330, 374, 397, 466, 488, 492, 500, 523, 604, 636, 652].

Эффективность растительно-микробных взаимодействий зависит от множества факторов, в том числе от генотипа растения-хозяина, условий инокуляции и окружающей среды [246, 256, 545], а также взаимодействия микроассоциантов разных видов между собой [241, 558].

Бактерии рода *Azospirillum* являются грамотрицательными диазотрофными ризобактериями. Большинство видов азоспириллы выделено из ризосферы злаковых трав, риса, пшеницы и сахарного тростника [144, 153, 306, 350]. В настоящее время описано 17 видов *Azospirillum*, из которых *A. balandianum* (до 2020 года *A. brasiliense*) и *A. lipoferum* наиболее изучены (<http://www.bacterio.net/azospirillum.html>). Основным внешним эффектом воздействия *Azospirillum* на растения является увеличение длины и количества боковых и придаточных корней и удлинение корневых волосков, что позволяет растению увеличить потребление воды и минеральных веществ [109, 140, 151]. *Azospirillum* помогают растениям выживать в стрессовых ситуациях благодаря изменениям в клеточной стенке, коррекции осмотического потенциала и выработке специфических веществ [20, 88, 115, 121, 212, 312, 548]. Они также участвуют в конкурентном биорегулировании микробных ассоциаций в почве [546]. Кроме того, азоспириллы эффективно фиксируют атмосферный азот, способствуют повышению доступности для растений фосфора, синтезируют все классы гормонов – стимуляторов роста [252, 590], а также стимулируют иммунные ответы растений [617], что в целом позволяет отнести их к эффективным рост-стимулирующим ризобактериям [142]. Взаимодействие азоспирилл с растениями в процессе создания растительно-микробной ассоциации

осуществляется с помощью компонентов клеточной стенки бактерий: флагеллинов полярного жгутика [334], капсулных полисахаридов [494], лектинов [141], экзополисахаридов (ЭПС) [143] и липополисахаридов (ЛПС) [339, 574], причем последние определяют иммunoспецифичность бактериальной клетки и, таким образом, участвуют в непосредственном взаимодействии с растениями. *Azospirillum* активно применяются для производства биоудобрений и способствуют повышению урожайности зерновых [142] и других сельскохозяйственных культур [254, 489].

Понимание возможностей положительного воздействия PGPR на сельскохозяйственные растения привело к их применению в качестве биоудобрений [122, 475, 482, 500] и биопестицидов [570] для устойчивого сельского хозяйства. В настоящее время наблюдается все более широкое коммерческое применение биоудобрений на основе PGPR, особенно в свете развития экологического (органического) и почвоохранного земледелия. Повышение эффективности ассоциативного взаимодействия ведется в том числе с использованием селекционных методов [94].

1.6.2 Применение ризосферных бактерий для стимулирования морфогенеза в культуре соматических каллусов *in vitro*

Метод культуры клеток, тканей и органов растений *in vitro* определяется, как выращивание отдельных клеток, а также тканей и органов на искусственной питательной среде в асептических условиях. [12, 37]. Масса усилий прикладывается исследователями для получения культур свободных от любых видов эндогенной и экзогенной микрофлоры [1, 12, 405]. Странятся освободиться не только от активно растущих грибов и бактерий, контактирующих культуру и питательную среду, но и от латентных (скрытых, эндофитных) микроорганизмов [41], в том числе таких, присутствие которых можно установить только на основе иммunoлогического или ПЦР-анализа [450]. Фитотоксическое влияние контактирующих микроорганизмов хорошо известно: они могут выделять токсины, изменять pH среды, вызывать негативные иммunoные реакции и просто

конкурировать за элементы питания [184]. Вероятно, поэтому, биологические агенты, такие как живые водоросли, бактерии или грибы, гораздо реже используются в культуре клеток и тканей растений *in vitro* как факторы регуляции морфогенеза.

Тем не менее, в последней четверти 20 века был проведен ряд работ, направленных на создание ассоциаций между культивируемыми растительными клетками или изолированными протопластами и микроорганизмами. Этот подход рассматривался первоначально, как один из вариантов модификации растительных клеток или целых растений. Предполагалось, что взаимодействия составляющих клеток в смешанных культурах могут сохраняться в растениях, регенерированных из ассоциативных систем, и на этой основе могут быть получены улучшенные сельскохозяйственные растения, в том числе небобовые растения, способные к азотфиксации [367]. Ассоциации с *Rhizobium*, *Azotobacter* и *Spirillum* были получены с бобовыми (горох, вигна, соя) и небобовыми растениями (табак, морковь, сахарный тростник) [182, 199, 280, 159, 165, 591]. Были сделаны попытки инокуляции растительных культур цианобактериями, хлореллой и другими водорослями [34, 61, 77, 170].

Регенерация растений из ассоциативных культур в первых опытах была безуспешной [182], или регенерированные растения не содержали бактерий в своих тканях [159, 591]. Но в процессе культивирования наблюдали частичную способность к нитрификации и росту культур на среде со сниженным содержанием азота. Регенеранты табака из смешанных культур каллусов с цианобактериями содержали в своих тканях и на поверхности гетероцисты бактерий [367].

Было замечено, что фильтраты культур эндофитов *Acinetibacter* и *Lactobacillus plantarum* снижали регенерацию побегов из каллусов хвойных (ели европейской и лиственницы гибридной) и лилейника [256, 396]. Бактерии рода *Azospirillum brasiliense*, которые также были использованы для создания ассоциаций с растениями табака, африканского проса и газонной травой *Eremochloa ophiurooides*, угнетали рост каллусных культур [591]. Быстро размножающиеся бактерии ингибировали рост каллуса, и примерно через неделю после прививки

наступала гибель растительных тканей. Однако до тех пор, пока каллусные клетки выживали, бактерии проявляли нитрогеназную активность на обедненных по азоту питательных средах. В другом эксперименте в аналогичных условиях некоторые каллусы сахарного тростника росли в течение более чем 18 месяцев при регулярном субкультивировании, и из таких двойных культур были получены регенеранты, в тканях которых бактерии не обнаруживались [591]. В более поздней работе Ильчукова [51] инокуляция каллусов пшеницы *in vitro* живыми бактериями *Azospirillum brasilense* также вызывала контаминацию культуры и фитотоксический эффект. Исследование на каллусах винограда показало, что эндофиты, связанные с каллусом, в первую очередь рода *Bacillus*, вызывали окислительное потемнение растительных клеток, в то же время, поддержание баланса эндофитных бактерий, обнаруживаемых в не темнеющих каллусах, оказывало положительное влияние для культивирования здорового каллуса [421].

В нескольких работах сообщалось о положительном влиянии некоторых штаммов бактерий на морфогенетические процессы в культуре соматических тканей растений. Например, совместное культивирование *in vitro* соматических тканей сои со штаммами бактерий *Pseudomonas maltophilia* приводило к формированию каллусов с «узловатыми характеристиками (узелковые каллусы)» и высоким потенциалом регенерации. Регенерация из соматических зародышей происходила, но полностью сформированных растений не было получено [346]. В другом исследовании влияния штаммов *Pseudomonas putida* G2-8 и Gll-32 на каллусы сои отмечалось увеличении биомассы каллусов сои в отсутствии витаминов в составе питательной среды [193]. В процессе поиска стрессового фактора, способного стимулировать соматический эмбриоидогенез неотзывчивого к культивированию сорта герани (*Pelargonium x hortorum* Bailey cv Ringo Rose) было обнаружено, что инфицирование эксплантов эндофитными бактериями способствовало образованию эмбриоидов [447]. Бактерии были идентифицированы как *Bacillus* sp. Способность к стимулированию соматического эмбриоидогенеза наблюдалась при инокуляции эксплантов бактериями в сочетании с

наличием в питательной среде тиодиазурина. Оптимальная концентрация бактерий составляла $0,47 \times 10^5$ КОЕ/мл. В условиях искусственно созданного симбиоза диазотрофных бактерий *Azomonas insignis* и земляники (*Fragaria × ananassa*) был индуцирован каллус и органогенез [345]. В качестве углеводов в составе питательной среды использовали мальтозу, что исключило контаминацию. В полученных растительных культурах отмечена нитрогеназная активность. Симбиотические ассоциации были получены между азотфиксирующими клетками *Azotobacter zettuovii* (CRS-H6) и тканями моркови (*Daucus carota* L. cv. 'Rother' Half Long) [132]. Симбиотические ассоциации выращивались на безазотных средах в течение четырех лет, что подтверждало азотфиксирующую способность системы. При этом, регенерация растений осуществлялась из каллусно-бактериальных ассоциаций на азотсодержащих средах. Из культур тканей сосны (*Pinus sylvestris* L.) были получены бактериальные изоляты и идентифицированы как *Methylobacterium extorquens* и *Pseudomonas synxantha*. Показана их стимулирующая роль в каллусогенезе сосны обыкновенной [173, 224].

Положительной роли метилтrophicных бактерий в стимулировании морфогенеза каллусов растений посвящен целый цикл работ. По данным Каляевой и соавторов [499] аэробные метилтrophicные бактерии *Methylovorus mays* образовывали устойчивые ассоциации *in vitro* с тканями растений табака, картофеля и льна, что приводило к увеличению роста и способности к регенерации и образованию корней. Колонизация незрелых зародышей мягкой пшеницы сорта Мироновская яровая двумя штаммами *Methylobacterium* sp. Д10 и *Methylophilus glucoseoxidans* приводила к повышению выхода морфогенных каллусов от общего числа каллусов, стимулированию формирования побегов и сокращению сроков регенерации растений [21]. Полученные регенеранты отличались ярко-зеленой окраской и хорошо развитой корневой системой. Аналогичный результат был получен при инокуляции каллусов пшеницы штаммом *Methylomonas methanica* S₁ [89]. По данным Дорониной и соавторов (2010) при аналогичной инокуляции незрелых зародышей пшеницы штаммом *Methylobacterium extorquens* Д10 также наблюдалось стимулирование формирования морфогенных

очагов в каллусах (более чем в 1,5 раза по сравнению с контролем) и лучшая регенерация растений (на 20% по сравнению с контролем). Бактерии не только сохранялись в процессе культивирования, но их содержание увеличивалось в каллусах к 30 суткам в 3-5 раз по сравнению с началом культивирования, а в растениях-регенерантах – в 10 раз. В полученных растениях было увеличенное содержание фотосинтетических пигментов, растворимых белков, и удельная плотность листьев также была выше по сравнению с контролем. Кроме того, в культуральной жидкости были обнаружены зеатинрибозид, ИУК и витамины B12, синтез и накопление которых связано с деятельностью бактерий [90]. Широких с соавторами [74] на каллусах ячменя изучали не только влияние природных изолятов *Methylobacterium mesophylicum* 3-345 на морфогенез в культуре соматических тканей *in vitro*, но и на устойчивость к стрессу, обусловленному токсичностью ионов алюминия и водорода. Установлена способность бактерий вступать в ассоциации с каллусной тканью, увеличивать частоту регенерации растений, а также снижать содержание малонового диальдегида, изменять содержание низкомолекулярных антиоксидантов: аскорбиновой кислоты и антоцианов [74]. Для увеличения выхода растений-регенерантов ячменя при создании исходного селекционного материала каллусная ткань 7 различных генотипов была инокулирована бактериями *Methylobacterium extorquens* в сочетании с перфторуглеродами (карбогал, перфтордекалин и перфторметилдекалин) [104]. По данным микроскопии достоверно увеличилась частота встречаемости зон вторичной дифференцировки каллусной ткани.

По сообщению Lim с соавторами [167] искусственно созданный симбиоз между штаммом *Herbaspirillum seropedicae* Z78 и соматическими каллусами масличной пальмы *in vitro* приводил к заселению поверхностей клеток и межклетников каллусов бактериями. Отмечено, что данный вид бактерий не утилизирует сахарозу, входящую в состав питательной среды, поэтому бактерии для своей жизнедеятельности использовали углеводы, синтезированные растительными клетками. При этом бактерии синтезировали индолил-3-уксусную кислоту, были способны к нитрификации азота. В результате скорость образования

эмбриогенного каллуса существенно возрастала (20 суток против 2-6 месяцев по традиционной схеме культивирования). На 60-е сутки культивирования в опытном варианте появились эмбриоиды в стадии сердечка. Авторы отмечают положительную роль обработки каллусов бактериями, подвергнутыми ультразвуковому воздействию [167].

Совместная культура каллусов растений и бактерий может быть использована для изучения физиологических ответов растений на внешние факторы, например, на стресс, вызванный действием тяжелых металлов, как показали [166] при изучении каллуса пустынного растения *Fouquieria splendens*, инокулированного ризосферными бактериями штамма *Staphylococcus pasteurii* Fs2.

Таким образом, в ряде исследований доказана возможность использования растительно-микробных ассоциаций в культуре *in vitro* для стимулирования морфогенетических процессов в соматических тканях. Как правило, авторы предполагают, что механизм воздействия бактерий на клетки растений кроется в дополнительном синтезе ИУК и азотфиксации. Оригинальный подход продемонстрировали мексиканские ученые [212]. Они предположили важную роль цитокининов в процессе прямой регенерации растений из тканей эксплантов. Как известно, некоторые виды патогенных для растений бактерий продуцируют цитокинины, например, *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, которые синтезируют цитокинины благодаря гену изопентенилтрансферазы (*ptz*). Клетки штамма *Escherichia coli* были трансформированы синтетической последовательностью гена *ptz* (*stz*) и полученный штамм продуцировал белок, способный синтезировать цитокинины. Экстракт из культуры *E. coli* добавляли в питательные среды для культивирования листовых эксплантов табака. Подготовленные таким образом бесклеточные среды способствовали образованию побегов и корней на листовых эксплантах табака. По мнению авторов, такие среды могут иметь преимущество перед использованием химически синтезированных цитокининов [212].

1.6.3 Применение ризосферных бактерий для стимулирования морфогенеза в культуре соматических тканей при микроклональном размножении *in vitro*

Для успешного клонального микроразмножения важным этапом является создание активно растущей культуры *in vitro*. На этапе введения в культуру *in vitro* значительные усилия прилагаются для получения асептической культуры. Разработаны различные протоколы стерилизации исходных эксплантов, включающие: предварительную очистку и мытье частей растений, из которых будут выделены экспланты; подбор стерилизующих растворов, их концентрации и времени экспозиции; промывку дистиллированной водой для удаления стерилизующих агентов [184, 185]. В ряде случаев, когда не удается избавиться от инфекции поверхностной стерилизацией, используют термотерапию исходных растений, введение антибиотиков и противовирусных препаратов в состав питательной среды [361, 472]. Было предложено несколько методов минимизации загрязнения в культурах растительных тканей [175, 525], в том числе, для повышения эффективности стерилизации предлагалось вводить стерилизующие препараты эксплантам посредством вакуумной инфильтрации [445]. Для получения чистой культуры иногда приходится высаживать контаминированные растения в грунт и повторно вводить экспланты в культуру *in vitro* [423].

Однако, эндофитные бактерии населяют растения *in situ*, и уничтожить их все практически невозможно. Среди эндофитных бактерий были идентифицированы представители многих видов потенциально полезных бактерий: *Streptomyces*, *Pantoea agglomerans* и другие, а также патогенные для человека, например, *Ralstonia mannitolytica*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium amycolatum*, *Bacillus neonatiensis*, *Salmonella* и *Nocardiida spp.* [41]. Скрытая (латентная) инфекция может проявляться в течение первого пассажа, а может длительное время не выявляться и обнаруживаться через 14 недель культивирования [508], и даже через год [462]. Условия культивирования не всегда благоприятны для развития эндофитных бактерий, поэтому они не могут активно размножаться, но некоторый титр бактерий сохраняется в тканях растения. При

изменении условий культивирования такие бактерии могут проявиться [41]. Даже находясь в скрытом состоянии эндофиты могут отрицательно влиять на рост и развитие культуры растений: угнетать регенерацию, снижать коэффициент размножения при микроклонировании, ухудшать образование побегов и корней [184, 198, 336, 610, 623] и даже вызывать гибель культуры после нескольких пассажей [85, 279]. Особо важное значение чистота культуры имеет при хранении растений в генетических банках. Контаминация таких культур недопустима, и они должны периодически подвергаться тестированию на наличие инфекции [211]. С другой стороны, есть сообщение о положительной роли эндофитных бактерий в пролонгировании срока хранения без субкультивирования декоративных растений фотинии Фрезера [588].

Не смотря на все выше сказанное, известны многочисленные случаи положительного влияния кокультивирования микроорганизмов с соматическими тканями растений. Ярким примером практического использования бактерий является использование бактерий *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes* для генетической трансформации растительных клеток, в результате которой в геном встраивается необходимая генетическая информация [299]. Кроме того, бактерии *A. rhizogenes* вызывают специфические органогенные процессы и приводят к формированию корней на тканях растений [191].

Важное положительное значение эндофитных микроорганизмов, в том числе ризосферных бактерий, может быть отмечено именно при клonalном микроразмножении растений. Причем, положительная роль микроассоциантов фиксируется на всех этапах микроразмножения. Впервые возможность повышения эффективности культур растительных тканей с помощью некоторых бактериальных «загрязнителей» была предположена Herman [323, 324]. Результаты инокуляции растительных культур *in vitro* были впервые опубликованы Digat et al. [365], который обнаружил положительное влияние штаммов *Pseudomonas fluorescens* и *P. putida* на укоренение и акклиматизацию микропобегов. Последующие сообщения показали положительный эффект *Pseudomonas* sp. и *P. mucidolens* в предотвращении гиперводненности (витрификации) куль-

тур орегано и малины [511, 624]. Nowak [464] предложил термин «бактеризация» для обозначения приема инокуляции эксплантов *in vitro* и микrorастений и охарактеризовал ряд полезных эффектов, вызываемых некоторыми бактериями на культуры *in vitro*, подчеркнув преимущества роста микrorастений и после культивирования *in vitro*. Позже Nowak и Shulaev [465] было предложено называть любые воздействия на микrorастения с целью повышения их устойчивости «праймингом» (priming), а инокуляцию микроорганизмами «биопримингом» (bioprimeing), но данные термины, в отличии от биотизации, в литературе не прижились.

В некоторых случаях отмечено, что инокуляция микроклонов бактериями стимулировала инициацию образования почек у генотипов, трудно поддающихся культивированию *in vitro*. В опытах Zawadzka с соавторами [598] микропобеги бузины, естественно загрязненные бактериями *Methylobacterium*, образовывали меньше аддентивных побегов по сравнению с незараженными, но эти побеги были длиннее контрольных. Побеги малины, загрязненные бактериями, были колючими и длиннее по сравнению с не загрязненными побегами. Эти и другие бактерии были выделены, и ими были инокулированы культуры *in vitro* розы, хризантемы, герберы и хосты. Ни одна из этих бактерий не оказывала вредного воздействия на экспланты, а некоторые комбинации бактерии-растения значительно улучшали пролиферацию побегов, а также укоренение [598]. В этом исследовании *Curtobacterium* увеличивали пролиферацию побегов всех четырех видов растений, а также укоренение розы; *Methylobacterium* увеличивали интенсивность роста герберы и хосты, а *Bacillus* удлинял побеги хризантем. Положительный эффект *Bacillus* spp. на рост и развитие хризантемы (*Chrysanthemum* spp.) *in vitro* и *ex vitro* также отмечены в работе [460]. Quambusch соавторами [269] обнаружили связь между эндогенными бактериями и эффективностью микроразмножения генотипов *Prunus avium*.

Многие бактерии синтезируют индолилуксусную кислоту и другие ауксины, что благотворно действует на укоренение побегов. Например, бактерии *Rhodobacter sphaeroides* усиливали укоренение микроростков шелковицы [581],

Bacillus spp. способствовали укоренению клубники [372]. Ряд примеров положительного воздействия эндофитов на микроклонирование растений рассмотрен в обзорах Яблонской с соавторами [107], Самариной с соавторами [106], Orlikowska с соавторами [472], Soumare с соавторами [509] и других. Изучение влияние восьми различных штаммов PGPR, включая *Bacillus subtilis* GB03, *B. Amyloliquefaciens* IN937a, *B. pumilus* SE-34, *B. pumilus* T4, *B. pasteurii* C9, *Paenibacillus polymyxa* E681, *Pseudomonas fluorescens* 89B-61 и *Serratia marcescens* 90-166 на рост растений арабидопсиса дикого типа и мутантов *in vitro* и *in vivo* показало, что в условиях *in vitro* в сигналинге участвовали брацциностероиды, ИУК, салициловая кислота и гиббереллины [578]. Тестирование *in vivo* показало, что в ответных реакциях участвовал этилен. Результаты показывают, что стимулирование роста PGPR у арабидопсиса связано с несколькими различными путями передачи сигналов и что такая сигнализация может отличаться для растений, выращенных *in vitro*, по сравнению с теми, что были выращены в естественных условиях. Биотизация проростков *Arabidopsis thaliana* бактериями *Pseudomonas putida* показала значительное увеличение длины побегов, массы корней и количества боковых корней и корневых волосков, что объясняется способностью *P. putida* продуцировать индолилуксусную кислоту. При этом биотизация не вызывала усиления окислительного стресса у проростков [131].

Индийскими учеными было показано, что инокулирование лекарственно-го растения *Swertia chirayita* бактериями *Azotobacter* sp. и *Pseudomonas* приводило к значительному усилению роста корневой системы и побега растений, культивируемых *in vitro* [276]. Наблюдалось значительное стимулирование роста растений, увеличивалась выживаемость (до 90%) и скорость размножения при низкой концентрации ауксина.

Инокуляция микрорастений картофеля бактериями *Streptomyces flavogriseus* TK-5 и *S. Anulatus* T-2-20 к колонизации побегов и корней без фитотоксического эффекта [48], а использование для бактеризации штамма *S. minoensis* KP-10 способствовало увеличению морфометрических показателей

побегов и коэффициентов размножения двух сортообразцов, а также снижению образования морфозов на листьях и стеблях [103].

Важнейшее направление применения полезных бактерий в технологии клonalного микроразмножения связана с адаптацией микрорастений к естественным условиям выращивания на этапе высадки *ex vitro*. Этот этап часто является узким местом в микроклонировании для многих видов растений, так как полученные в культуре *in vitro* микропобеги имеют анатомические и физиологические особенности, затрудняющие адаптацию к естественным условиям [35]. Микрорастения имеют нефункциональные (открытые) устьица, не полностью функциональные корни и фотосинтетический аппарат, слабо развитые механические ткани и сосуды. Инокуляция микропобегов микроорганизмами на последней стадии микроразмножения или на этапе высадки может помочь преодолеть эту проблему [163, 464, 637]. Бактерии, относящиеся к различным родам (*Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Halomonas*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Methilophylus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*) могут быть применены на данном этапе [472].

Одним из вариантов повышения выживаемости *ex vitro* может быть получение микролуковиц или микроклубней. Показано, что PGPR стимулировали образование клубнелуковиц крокуса (*Crocus sativus* L.) в культуре *in vitro* [364]. *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis* и *Pantoea* sp. способствовали увеличению пролиферации и массы клубнелуковиц. Совместное культивирование с *Acinetobacter haemolyticus*, *Accintobacter lwoffii* и *Pantoea* sp. привело к 100 % прорастанию клубнелуковиц.

Применение приема биотизации микрорастений не собственно в культуре *in vitro*, а на этапе высадки растений *ex vitro* снимает многие вопросы с возможной контаминацией асептических культур и является технически более простой задачей. Получение и поддержание чистой культуры микоризных грибов и их кокульттивирование с растениями в культуре *in vitro* проблематично, поэтому микоризация чаще проводится на этапе высадки микрорастений в субстрат

[107]. Среди объектов биотизации *ex vitro* преобладают древесные культуры, которые в естественных условиях обычно формируют микоризу и ассоциации с бактериями. Например, микrorастения акации белой (*Robinia pseudoacacia* L.) были высажены в почву, в которую были внесены бактерии *Rhizobium* и мицелий арbusкулярных микоризных грибов рода *Glomus* [149].

Для некоторых травянистых растений, таких как орхидей, наличие микоризы также является необходимым экологическим фактором и, поэтому, часто применяется. Например, для установления симбиотической акклиматизации микrorастения орхидей *Stanhopea tigrina*, асептически полученные *in vitro*, инокулировали суспензиями спор грибов *Trichoderma hamatum* и *Penicillium* sp., что позволило достичь 100% выживания и максимального роста побегов [134]. Микrorастения сахарного тростника были инокулированы смесью пяти эндофитных диазотрофных видов (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* и *Burkholderia* sp.). Созданная таким образом ассоциация сохранялась в выращиваемых растениях, и все бактерии выявлялись в корнях даже после 12 месяцев выращивания в грунте [594]. Микrorастения земляники на этапе высадки в почвенный субстрат были инокулированы пятью микроорганизмами (*Glomus mosseae* BEG29, *Bacillus subtilis* M3, *Trichoderma harzianum* DB11, *Pseudomonas fluorescens* C7r12 и *Gliocladium catenulatum* Gliomix) в чистой культуре или в парных комбинациях. Не было установлено положительного влияния на рост микrorастений, но в некоторых комбинациях отмечалось повышение устойчивости к возбудителям гнилей [438]. В другом исследовании двадцать эндофитных бактерий были выделены из тканей земляники, идентифицированы как виды из родов *Bacillus* и *Sphingopyxis* и использованы для инокуляции микrorастений на этапе адаптации в субстрате. Результаты показали, что 15 штаммов продуцировали высокие уровни ИУК, и все 20 имели потенциал для солюбилизации неорганического фосфата. Была выявлена способность штаммов увеличивать число корней, их длину и сухую массу, а также число листьев, длину чешечков и сухую массы надземной части [372].

Полезные бактерии могут помочь в борьбе со стрессом не только путем обеспечения регуляторами роста, облегчения поглощения питательных веществ, но и прямой или косвенной защитой от стрессов [118, 163, 465]. Этот феномен был широко описан в культурах картофеля [157]. Compant с соавторами [630] отметили, что полезные бактерии, используемые при инокуляции эксплантов на стадии *in vitro*, могут стимулировать индукцию защитных процессов, что может иметь решающее значение для преодоления стресса при пересадке. Например, бактерии *Pseudomonas aureofaciens* и *Methylovorus mays* показали способность эффективно защищать микrorастения картофеля [72], земляники [23] и томатов [19], инокулированные суспензией этих бактерий в культуре *in vitro*, от патогенных грибов родов *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Altemaria*, *Helminthosporium* и других, а также фитопатогенных бактерий *Erwinia carotovora*, *Erwinia atroseptica*, *Erwinia amilovora*, *Xanthomonas campestris*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*. Более того, защита от фитопатогенов, протектируемая данными бактериями, может сочетаться с защитой от токсического воздействия нафталина и тяжелых металлов [20].

Хотя технически биотизация эксплантов во время культивирования *in vitro* относительно проста, должны быть соблюдены некоторые параметры культивирования, такие как плотность инокулюма и температура среды [268, 497]. Для эффективной инокуляции важное значение имеет концентрация инокулюма, фаза культивирования микrorастений, тип питательной среды (плотная или жидккая) и ее состав [83, 468]. Решающее значение имеет правильный подбор микроассоцианта или нескольких ассоциантов при совместном их применении [468, 592].

Бактерии рода *Azospirillum*, наряду с псевдомонадами и бациллами, являются одними из наиболее интенсивно исследуемых ассоциативных партнеров растений. Они стимулируют рост и развитие растений, колонизируя поверхности корней и стеблей, а также внутренние ткани корня без образования специализированных структур [43]. Как известно, азоспириллы относятся к группе ри-

зосферных стимулирующих рост растений бактерий. Поэтому интерес к данным бактериям как возможным микроассоциантам в культуре тканей растений *in vitro* вполне закономерен. De Freitas и Germida [217] исследовали культуру корней озимой пшеницы *in vitro* для изучения бактериально-корневых взаимодействий и колонизации корней штаммами *Pseudomonas cepacia* R55 и R85, *Azospirillum brasilense* ATCC 29729 и *Azotobacter chroococcum* ATCC 9043. Они определяли влияние бактерий на морфологию корней и развитие корневых волосков, бактериальную колонизацию поверхности корней и активность нитрогеназы. Как было определено, содержание бактерий на корнях варьировало от $7,5 \times 10^4$ до $3,2 \times 10^7$ КОЕ/см. В опытах было показано, что некоторые ризобактерии (например, *P. cepacia* R85) значительно улучшили развитие корневых волосков, другие (например, *P. cepacia* R55) специфически колонизировали участки корневой эксудации, а ризобактерии *A. brasilense* ATCC 29729 и *A. chroococcum* ATCC 9043 стимулировали активность нитрогеназы корней.

На микрорастениях южноамериканского лиственного дерева розовый лапачо (*Handroanthus impetiginosus*) было показано, что в условиях *in vitro* в побегах происходят существенные анатомо-гистологические изменения, осложняющие выживание побегов в естественных условиях. При этом, ризосферные бактерии *Azospirillum brasilense* штаммов Cd и Az39 уменьшали нежелательные анатомические изменения, возникающие *in vitro*, усиливая адаптация к условиям *ex vitro* после пересадки. Штамм Cd снизил плотность устьиц на 29% у растений, выращенных в MSG (среде Мурасиге-Скуга с витаминами по Гамборгу), по сравнению с неинокулированными растениями, в то время как штамм Az39 увеличил данный показатель на 30 %. Бактериальная колонизация улучшила деление клеток эпидермиса, развитие волокон проводящего пучка, рост вторичных стволовых клеток и плотность корневых волосков по сравнению с таковыми у неинокулированных растений [399]. В другом исследовании бактерии *A. brasilense* Cd и Az39 способствовали ризогенезу и увеличению корневого индекса в условиях повышенной концентрации NaCl в питательной среде при культивировании растений жожоба [309]. Было установлено, что бактерии *A.*

baldaniorum Sp245 способны улучшать акклиматизацию фруктовых растений к условиям *ex vitro* [344], а *A. brasiliense* Az39 – повышать способность к укоренению и адаптации растений жожоба [400]. Оценка влияния нативных изолятов *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum brasiliense* и *Trichoderma harzianum* на укоренение и акклиматизацию выращенных *in vitro* побегов чая показала положительную роль инокулянтов на этапе адаптации и выращивания в субстрате [357]. В том числе отмечалось, что обработка биостимуляторами предохраняла микрорастения от корневой гнили и увядания, поскольку они обладали относительно более высокой активностью защитных ферментов, включая пероксидазу и фенилаланинаммиачную лиазу. По данным Perez-Rosales с соавторами [271] растения жожоба (*Simmondsia chinensis* L. (Schneider)), инокулированные штаммами PGPR, включая *Azospirillum brasiliense* (Cd), *Methylobacterium amino-vorans* (JRR11), *Rhodococcus pyridinivorans* (JRR22) и смесь JRR11 + JRR22., показали увеличение длины побегов и корней, а также изменение ключевых ферментов, участвующих в защите растений (супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы, аскорбатпероксидазы и фенилаланинаммиачной лиазы), что указывает на индуцированный системный ответ и потенциальное повышение устойчивости растений к атаке патогенов.

Метод клonalного микроразмножения широко используется в семеноводстве картофеля, так как в большинстве стран мира стандарты на семенной материал картофеля включают этап оздоровления от фитопатогенов, в том числе вирусов, методом культивирования апикальных меристем. В связи с этим, ряд работ посвящен изучению влияния ризосферных бактерий на микрорастения картофеля в культуре *in vitro* и *ex vitro*. По данным Волкогона с соавторами [24] бактерии рода *Azospirillum* (*A. brasiliense* шт. 410 и *A. lipoferum* шт. 4014 и шт. ЛС-3), интродуцированные в зону корней картофеля в культуре *in vitro*, вызывали интенсивное развитие растений. В общей сложности 150 штаммов бактерий (*Bacillus* (63), *Azotobacter* (50) и *Actinomycetes* (37)) были подвергнуты скринингу *in vitro*, в ходе тепличных и полевых испытаний на картофеле в Международном центре изучения картофеля (International Potato Center (CIP),

Лима, Перу) [281]. Бактерии обнаруживались в тканях корней, образуя скопления в межклетниках. Тесты *in vitro* показали, что большинство использованных бактерий обладали свойствами, которые могли быть полезны для стимулирования роста растений. Положительный эффект бактеризации микрорастений может сохраняться не только на этапе культивирования *in vitro* и адаптации к условиям *ex vitro*, но также может повышать итоговую продуктивность растений [341].

Приведенные факты говорят в пользу использования некоторых бактерий в качестве биоудобрений или биозащиты, чтобы уменьшить использование минеральных удобрений и пестицидов в сельском хозяйстве. Бактеризация может быть особенно значимой в производстве органической продукции. Бактеризация как агробиотехнологический прием может быть успешно применена, но эффективность ее зависит от многих факторов [122, 155]. Было обнаружено, что многие микроорганизмы полезны для растений, но их эффективность в полевых условиях не была подтверждена в полевых испытаниях или полевые испытания не проводились [628]. По данным Oswald и соавторов [281] по сравнению с культурой *in vitro*, в горшечной культуре, а тем более в полевых условиях не удалось получить стабильного положительного результата действия PGPR. Авторы предполагают, что высокий потенциал воздействия ризосферных бактерий, наблюдаемый *in vitro* не реализуется *in vivo*, так как условия среды более сложные и многокомпонентные. При этом некоторые ризосферные бактерии положительно влияли на продуктивность мини-клубней картофеля при аэропонном выращивании [475]. По данным Bacilio с соавторами [545] положительное влияние ризосферных бактерий максимально проявлялось в культуре *in vitro* картофеля и снижалось при переходе к тепличным условиям, а затем к урожаю, который был собран в полевых условиях. Авторы объяснил большие различия в успешности бактеризации экстремальными и изменяющимися условиями окружающей среды в полевых условиях по сравнению с контролируемыми условиями лаборатории. Вероятно, предпочтительным может быть использование консорциумов микроорганизмов, которые будут имитировать, по

крайней мере частично, природный растительный микробиом, который является многочисленным, мультивидовым и многофункциональным, а также необходимо учитывать реакцию сортов растений [628].

1.6.4 Полисахариды и компоненты бактериальных клеток: связь с морфогенезом в культуре клеток и тканей растений *in vitro*

В последние годы все большее внимание уделяется сложным полисахаридам и компонентам клеточных стенок как стимуляторам соматического эмбриогенеза.

Было установлено, что под влиянием фитогормонов в суспензиях соматических клеток может изменяться биосинтез полисахаридов [359]. Изучали влияния фитогормонов 2,4-дихлорфеноксиусной кислоты и абсцизовой кислоты на химический состав полисахаридов, экстрагированных из клеток и внеклеточной жидкости суспензионной культуры пшеницы. Для среды с абсцизовой кислотой было показано, что моносахаридный состав внеклеточных полисахаридов в основном представлен глюкозой (87%), тогда как полисахариды внутри клеток были богаты ксилозой и глюкуроновой кислотой. Моносахаридный состав внеклеточных полисахаридов из среды с 2,4-Д показал 6-кратное увеличение арабинозы, 8-кратное – галактозы, 5-кратное – ксилозы и глюкуроновой кислоты по сравнению с внеклеточными полисахаридами из среды с абсцизовой кислотой. Состав клеточных полисахаридов из сред с 2,4-Д в основном был сходен с АБК и отличался повышенным количеством маннозы (в 3 раза) и галактуроновой кислоты (в 2,5 раза).

Исследования Бишимбаевой с соавторами показали, что способность поддерживать морфогенный потенциал длительно культивируемых тканей пшеницы и ячменя сопровождается появлением внеклеточных полисахаридов [359]. Кроме того, был определен высокий уровень биологической активности полисахаридов, полученных из суспензионной культуры [50, 164]. Авторы предполагают, что полисахариды, образующиеся в процессе разрушения клеток каллусов, вызванного высокой концентрацией 2,4-Д, изолируют некоторые

клетки. Эти изолированные эмбриогенные клетки инициируют соматический эмбриоидогенез и дифференцию эмбриоидов при снижении концентрации 2.4-Д. Таким образом, программируемая клеточная смерть и секретируемые в ходе гибели клеток полисахариды играют важную роль в переключении клеток каллусов на эмбриоидогенный путь развития, в поддержании пула эмбриогенно-компетентных клеток при субкультивировании, в регуляции формы и размеров клеток, а также процессов дифференциации соматических эмбриоидов и роста каллусных тканей [8].

Одним из малоизученных аспектов морфогенеза является роль биополимеров клетки в пространственной изоляции и первичной дифференции каллусных тканей. Такими полимерами являются, например, каллоза и компоненты лигнина. Каллоза откладывается на наружной стенке плазмалеммы [648] и регулирует межклеточный транспорт веществ. В синтезе лигнина участвует ряд ферментов, одним из которых является пероксидаза [4]. В синтезе полисахарида каллозы участвует калозосинтаза II, являющаяся трансмембранным белком плазматической мембраны [383]. Каллоза и лигнин выполняют барьерную функцию и избирательно регулируют межклеточный транспорт, от которого зависит ионный баланс, энергетический и пластический обмен в клетке, влияющий в свою очередь на реализацию внутриклеточных программ развития и дифференциации. Полисахарид создает необходимые условия для селективной регуляции симпластного и апопластного транспорта веществ. Каллоза изолирует группы меристематических клеток от окружающей каллусной ткани и обеспечивает, таким образом, новые условия для их функционирования, повышая автономию новой клеточной структуры и ее пространственную упорядоченность [161]. Скорость и направление деления меристематических клеток приводит к образованию высокоорганизованной, четко структурированной ткани с высоким морфогенным потенциалом, способной к формированию примордиев вегетативных органов. Люминесцентная микроскопия показала, что отложения каллозы наиболее интенсивно происходят в клеточных стенках на границе между паренхимными клетками каллуса и меристематическими клетками, сле-

довательно, синтез β -(1→3)-глюкана является важным элементом, обеспечивающим образование и развитие морфогенных структур [161].

Применение электронной и конфокальной микроскопии для изучения морфогенеза в каллусах растений привело к открытию новых структур и компонентов, отличающих морфогенный и неморфогенный каллус. Так называемая «зернистая» или «узловатая» структура морфогенных каллусов описывались ранее как их отличительная особенность. Šamaj с соавторами [287] показали, что шаровидные или продолговатые комплексы клеток в морфогенном каллусе кукурузы состоят из тесно связанных меристематических клеток, покрытых общей фибрillлярной оболочкой. Электронная микроскопия показала, что этот материал покрывает поверхность эмбриогенных клеток в виде отдельного слоя, обозначенного как поверхностная сеть внеклеточного матрикса (ECMSN). Используя гистохимическое окрашивание было установлено, что в состав матрикса входят арабиногалактановые белки (AGP). Наиболее заметное окрашивание было обнаружено в межклеточниках. Большие неэмбриогенные каллусные клетки не окрашивались этим AGP-специфическим красителем. Иммунофлуоресценция с использованием моноклональных антител LM4 показала, что ECMSN эмбриогенных клеток снабжен эпитопом LM4, в то время как неэмбриогенные каллусные клетки лишены этого эпитопа [287]. Связывание арабиногалактановых белков специфическим реагентом « β -D-glucosyl Yariv» приводило к ингибированию соматического эмбриоидогенеза в культуре цикория *Cichorium hybrid '474'* (*C. intybus* L. var. *sativum* × *C. endivia* L. var. *latifolia*). По данным Verdeil с соавторами в состав внеклеточного матрикса, покрывавшего эмбриогенные комплексы, входили β -1,4-глюканы, а также каллоза и пектин [635]. Было высказано предположение, что именно изоляция клеток от общего симпласта формировалась инициальные клетки проэмбрио.

Bobák с соавторами [285] показали, что внеклеточный матрикс образуется вокруг проэмбрио и глобулярных эмбриоидов, но исчезает при переходе к стадии сердцевидных и торпедовидных эмбриоидов. Поверхностная сеть внеклеточного матрикса (ECMSN) также была обнаружена вокруг некоторых клеток и

молодых эмбриоподобных структур в андроклиинном каллусе пшеницы. Отмечается, что матрикс был стойким по отношению к действию протеаз, частично разрушался хлороформом и эфиром-метанолом, и полностью растворялся пектиназой. По мере развития регенерантов происходила постепенная деградация внеклеточной сети вплоть до ее полного исчезновения. В серии работ на культуре каллусной ткани киви (*Actinidia deliciosa*) был проведено подробное изучение внеклеточного матрикса на морфогенных и неноморфогенных каллусах [507]. Ультраструктурным и гистохимическим анализом подтверждено, что эта структура может быть связана с приобретением морфогенной компетенции и, таким образом, может служить ее структурным маркером в каллусе [625]. Была разработана методология анализа внеклеточного матрикса с помощью сканирующей электронной микроскопии [506]. Образование внеклеточного матрикса отмечено также при прямом соматическом эбриоидогенезе из листьев *Drosera spathulata* Labill. [192]. При этом наличие внеклеточного матрикса не всегда сопровождается формированием проэмбрио и соматическим эмбриоидогенезом, как было показано на каллусной культуре топинамбура (*Helianthus tuberosus* cv. Albik) [286].

В каллусах пшеницы также выявлено появление каллозной оболочки вокруг клеток компетентных к эмбриогенезу, а также 2-4-х клеточных проэмбрио, которая затем исчезает на стадии глобулы [9]. По мнению авторов, образование каллозы вызывает разрыв межклеточных связей и исчезновение плазмодесм, способствует перестройке элементов цитоскелета и возникновению новой оси полярности в морфогенной клетке. Вероятно, роль каллозы заключается в физиологической изоляции, регуляции ассиметричных клеточных делений и сохранении жизнеспособности клеток и ранних проэмбрио в стрессовых условиях культуры *in vitro*, в том числе действия 2,4-Д.

Хитозан, полимерное деацетилированное производное хитина, естественным образом присутствует в клеточных стенках некоторых грибов. Он сочетает в себе уникальный набор универсальных физико-химических и биологических характеристик, что позволяет использовать его в широком диапазоне примене-

ний [202, 363]. Хитозан используется в основном в качестве естественной обработки семян и растений как усилитель роста и экологически чистое биопестицидное вещество, которое повышает врожденную способность растений защищаться от грибковых инфекций, а также как стимулятор деления и роста клеток растений [201, 634]. В ряде исследований показана возможность стимулирования роста культур клеток и тканей растений *in vitro* под действием хитозана, при этом уровень его биологической активности значительно зависит от молекулярной массы и степени деацетилирования макромолекул [208]. Превращение меристематических эксплантов орхидей в протокормоподобные тела (PLBS) ускорялось до 15 раз в присутствии креветочного и грибкового хитозана в жидкой среде [201]. В работе Arda Acemi [120] было показано, что правильно подобранная концентрация хитозана с известным уровнем N-ацетилирования может выступать альтернативой бензиламинопурина и жасмоновой кислоты в культуре тканей орхидей, аналогично стимулируя рост протокормов и корней. Добавление от 2,5 до 98,2 мг/л хитозана в жидкую среду для культивирования суспензии клеток лекарственного растения *Azadirachta indica* стимулировало увеличение сырой и сухой массы клеток и накопление вторичных метаболитов (азадирахтина, мевалоновой кислоты и сквалена) [290]. Хотя точный механизм действия до сих пор неизвестен, но многие исследования показали, что экзогенно применяемый хитозан стремительно индуцирует окислительный стресс, высвобождает цитохром С и дополнительно увеличивает активность каспазы-3, что требуется для правильного формирования эмбриона [203, 469, 479].

Эффективность эмбриогенеза микроспор рапса (*Brassica napus L.*) примерно в 1,8 раза возросла в ответ на 10 мг/л хитозана в течение 2 дней [123]. Высокий уровень хитозана при этом был вреден для эмбриогенеза микроспор до такой степени, что эмбриогенез был полностью ингибирован в культурах, подвергнутых воздействию 50 и 100 мг/л хитозана в течение 5 дней. Но высокие уровни и продолжительность обработки хитозаном привели к усиленному каллусообразованию, так что самое значительное образование каллусов (88 и 79 %) наблюдалось в присутствии 100 мг/л хитозана в течение 1 дня и 20 мг/л в

течение 2 дней, соответственно. Обработка хитозаном не была благоприятной для нормального развития растений-регенерантов на всех испытанных уровнях и сроках. По мнению авторов, эффективность индукции эмбриогенеза микроспор и регенерация растений может быть улучшена обработкой хитозаном при условии, что были выбраны соответствующие уровни и продолжительность инкубации [123].

Механизм действия хитозана в растительных системах, в том числе в культуре *in vitro* пока не совсем ясен. Предполагается, что хитозан активирует реакции растений с помощью различных сигнальных путей, действующих на несколько вторичных мессенджеров и факторов транскрипции [181, 200]. Возможно участие специфических белков-рецепторов хитозана [181, 370, 422], электростатических взаимодействий с отрицательно заряженными молекулами клеточной стенки и плазматической мембранны клеток, такими как липополисахариды, белки и ионы металлов [174, 422]. С генетической точки зрения, Zheng с соавторами [181] в проростках пшеницы обнаружено большое количество генов чувствительных к хитозану связанных с фотосинтезом, первичным метаболизмом углерода и азота, защитными реакциями и факторами транскрипции. Авторы предполагают, что хитозан может запускать путь передачи сигнала через ассоциированную с клеточной стенкой киназу, кальций/кальмодулин-зависимую протеинкиназу и фосфатидилинозитол-специфичную фосфолипазу С, что в конечном итоге приводит к участию факторов транскрипции, способствующих росту растений [443].

Бактерии также могут быть источником внеклеточных полисахаридов, которые столь же структурно и функционально разнообразны, как и бактерии, которые их синтезируют. Они могут присутствовать во многих формах, включая связанные с клетками капсульные полисахариды, несвязанную «слизь» и в качестве компонента О-антитела липополисахарида со столь же широким спектром биологических функций. К ним относятся устойчивость к высыханию, защита от неспецифического и специфического иммунитета хозяина, обеспечение контакта с макропартнером и так далее [146]. Имеются также сведения о

том, что отдельные компоненты и метаболиты микробных клеток, содержащие N-ацетилглюкозамин, такие как хитин, пептидогликан (PGN), липополисахарид (ЛПС), липоолигосахариды (ЛОС) и ризобиальный фактор клубнеобразования (Nod-factor), могут выступать в роли сигнальных молекул, способных вызывать иммунные или симбиотические ответные реакции растения [278, 521]. Показано, что ЛПС наружной мембранны ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* является одним из активных компонентов бактериальной клетки, определяющим контактные взаимодействия с корнями растений [369] и принимающим участие в процессах, индуцирующих ответные реакции растений на эти взаимодействия. По данным Chávez-Herrera с соавторами, ЛПС *Azospirillum balduiniorum* Sp245 влияли на некоторые аспекты развития пшеницы, такие как старение растений и образование колосьев [245]. Есть данные, что обработка ЛПС корней проростков пшеницы *in vitro* вызывала увеличение содержания в тканях O_2 , H_2O_2 и пероксидазы, что в итоге выражалось в уменьшение содержания хлорофилла, но увеличении содержания крахмала, а через 4 суток – в стимуляции роста растений [242].

Механизм воздействия ЛПС на рост клеток и органов растений пока слабо изучен. По самым свежим данным Hernández-Esquivel с соавторами [496] ЛПС *Azospirillum balduiniorum* стимулирует у *Arabidopsis thaliana* сигнальный путь Target of Rapamycin (TOR) через повышение активности фермента фосфолипазы D (PLD), который метаболизирует фосфолипиды в клеточных мембранах, в результате чего образуется фосфатидная кислота (PA), являющаяся вторичным посредником, участвующим в активации сигнальных путей, связанных с процессами развития и реакциями на различные экологические стрессы. Активация TOR происходит через повышение уровня экспрессии гена *S6K1*, а также рибосомальных белков RPS27B и RPL7B. Изменения в экспрессии рибосомных генов может изменять свойства рибосом, влияя на трансляцию белков и, следовательно, рост клеток.

В литературе очень мало исследований роли ЛПС ассоциативных бактерий или других компонентов клеточных стенок в процессах их совместного

культивирования с растительными клетками и тканями *in vitro* [247]. Установлено, что Nod-фактор стимулировал соматический эмбриогенез у *Daucus carota* [532] и способствовал развитию проэмбриогенных комплексов (PEMs) у *Picea abies* [267]. Липоолигосахариды Nod-фактор *Rhizobium* стимулировали формирование соматических эмбриоидов мутантной линии моркови с термочувствительным эмбриоидогенезом [532]. Исследования Tellstrom с соавторами [600] показали, что ЛПС *Sinorhizobium meliloti* в суспензионной культуре клеток из корней *Medicago truncatula* ингибировали окислительный стресс [600]. Другой информации о роли компонентов бактериальных клеток на морфогенез клеток и тканей растений в культуре *in vitro* не обнаружено.

Собственные исследования

Глава 2 Материалы и методы исследований

2.1 Материалы исследований

Исследования влияния бактериальных клеток и их липополисахаридов на морфогенез в культуре соматических тканей *in vitro* проводились на модельной паре почти изогенных линиях (NIL) яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Саратовская 29, различающихся аллелями гена короткостебельности *Rht-B1c* и *Rht-B1a* (сиб, высокорослая сестринская линия). Для создания модельного набора линий предварительно в культуре соматических тканей *in vitro* были изучены 5 пар почти изогенных линий, альтернативных по генам *Rht-B1* (аллели *Rht-B1a* – дикий высокорослый тип; *Rht-B1b* и *Rht-B1c* – короткостебельный тип), *rht14, s1, Q* [186]. Все линии были созданы доктором биологических наук, профессором Лобачевым Ю.В. методом возвратных скрещиваний с отбором на фенотип рекуррентного сорта [63]. Процесс отбора модельных линий для проведения исследований описан в главе 3.

Сорт Саратовская 29 выведен в научно-исследовательском институте сельского хозяйства Юго-Востока методом ступенчатой гибридизации. Последнее скрещивание: Альбидум 24 × Лютесценс 51/11. Родоначальное растение выделено в 1940 году. Сорт районирован в 1957 году. Авторы сорта – Шехурдин А.П., Мамонтова В.Н., Куликов Н.Н. Саратовская 29 (разновидность лютесценс) – сорт среднеспелый, отличается высокой устойчивостью к засухе и пластичностью. Мукомольно-хлебопекарные качества высокие, относится к сильным пшеницам, до настоящего времени остается эталоном по качеству зерна. В производственных условиях Казахстана в 1968 г. получен урожай зерна этого сорта 5 т/га, а на Березовском ГСУ Красноярского края в 1973 г. – 5,1 т/га. В годы своего расцвета сорт Саратовская 29 занимал более 21 млн. га. посевной площади (Мамонтова В. Н., 1977). Этот сорт возделывался в 27 областях, краях и республиках основных зон товарного производства пшеницы

СССР [78]. Сорт входит в родословную большинства современных отечественных сортов яровой мягкой пшеницы степного экотипа.

Влияния бактериальных клеток и их липополисахаридов на микроклоны картофеля в культуре *in vitro* и *ex vitro* изучалось на микrorастениях картофеля из пересадочной *in vitro*-коллекции кафедры «Растениеводство, селекция и генетика» ФГБОУ ВО Вавиловский университет, созданной методом культивирования апикальных меристем. Коллекция включает оздоровленные мериклоны более 20 сортов. Использовались сорта картофеля, включенные в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в Российской Федерации (<http://reestr.gossort.com>) и рекомендованные для выращивания в засушливых условиях 8 региона (Невский, Кондор), не рекомендованные для данного региона, но широко распространенные в производстве (Аврора, Розара, Ред Скарлетт).

В качестве микропартнеров для создания растительно-микробных ассоциаций и выделения липополисахаридов (ЛПС) в серии экспериментов исследовали коллекционные штаммы бактерий: *Azospirillum baldaniorum* Sp245 (до 2020 года *A. brasiliense* Sp245 [303]), *A. brasiliense* Sp7^T, SR55, SR75; *A. lipoferum* SR65; *Escherichia coli* K12; *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. Данные штаммы бактерий (Таблица 2.1) были взяты из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ ФИЦ СНЦ РАН № 1021 (WDCM – World Data Centre for Microorganisms) (<http://collection.ibppm.ru>).

Штамм *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 был выделен в 2012 году из гомогената отмытых корней картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Невский, произраставшего в 3 км юго-восточнее пос. Новопушкинское (Энгельсский р-н, Саратовская обл.; N 51°21'28.04" E 46°9'23.82"), на стадии начала формирования клубней. Бактерии выделяли на твердой безазотистой малатной среде NFb (N-free bromothymol blue medium) следующего состава (г/л): яблочная кислота – 3,8; K₂HPO₄·3H₂O – 0,4; KH₂PO₄ – 0,4; MgSO₄·6H₂O – 0,2; NaCl – 0,1; Na₂MoO₄·12H₂O – 0,002; FeSO₄ (в хелатном комплексе с EDTA) – 0,02; агар-агар – 15 (рН доводили NaOH до 7,0).

Таблица 2.1 – Коллекционные штаммы ризосферных бактерий

№ п/ п	Штамм	Объект, из ко- торого выделен штамм	Орган рас- тения	Автор, место	Ссылка на коллекцию
1.	<i>Azospiril-lum baldanior um</i> Sp245	Пшеница (<i>Triticum sp</i>)	корни	J. Dobereiner, Пасу- Фунду	http://collection.ibppm.ru/ catalogue/azospirillum/azospirillum-brasilense/47- ibppm-219.html
2.	<i>Azospiril-lum brasiliens e</i> Sp7 ^T	Росичка лежа- чая (<i>Digitaria decumbens</i>)	корни	J. Dobereiner, Рио-де- Жанейро	http://collection.ibppm.ru/ catalogue/azospirillum/azospirillum-brasilense/20- ibppm-150.html
3.	<i>Azospiril-lum brasiliens e</i> SR55	Пшеница твер- дая (<i>Triticum durum</i>) сорт Харьковская 46	корни	Л.И. Поздняко- ва, Л.С. Федорова, Саратов	http://collection.ibppm.ru/ catalogue/azospirillum/azospirillum-brasilense/26- ibppm-18.html
4.	<i>Azospiril-lum brasiliense</i> SR75	Пшеница мяг- кая (<i>Triticum aestivum</i>), сорт Саратовская 29	семе- на	Л.И. Поздняко- ва, Л.С. Федорова, Саратов	http://collection.ibppm.ru/ catalogue/azospirillum/azospirillum-brasilense/27- ibppm-22.html
5.	<i>Azospirill um lipoferum</i> SR65	Пшеница твер- дая (<i>Triticum durum</i>), сорт Саратовская 40	корни	Л.И. Поздняко- ва, Сара- товская обл.	http://collection.ibppm.ru/ 62-ibppm-44.html
6.	<i>Azospirill um</i> sp. SR66	Пшеница мяг- кая (<i>Triticum aestivum</i>), сорт Саратовская 55	корни	Л.И. Поздняко- ва, Сара- товская обл.	http://collection.ibppm.ru/ 60-ibppm-21.html
7.	<i>Ochrobac trum cytisi</i> IPA7.2	Картофель (<i>Solanum tuberosum L.</i>) сорт Невский	корни	А.Л. Ива- нова, И.А. Попова, Новопуш- кинское, Саратов	http://collection.ibppm.ru/ catalogue/ochrobactrum/ochrobactrum-cytisi/233- ibppm-544.html
8.	<i>Esche-richia coli</i> K12	человек	-	Stanford University, USA	http://collection.ibppm.ru/ 234-ibppm-204.html

Продолжение таблицы 2.1

9.	<i>Kokuria rosea T1Ks19</i>	Картофель (<i>Solanum tuberosum L.</i>) сорт Кондор	корни	Тумайкина Ю.А., Марксов- ский район Саратов- ской обла- сти	http://collection.ibppm.ru/ collection/kocuria/kocuria-rosea/
10 .	<i>Enterobacter cloacae K7</i>	Топинамбур (<i>Helianthus tuberosus L.</i>)	ризо- план	Е.В. Крючкова, Саратов	http://collection.ibppm.ru/ collection/enterobacter/en terobacter-cloacae/

Первоначально штамм был идентифицирован на основании сравнения последовательностей ДНК генов 16S рРНК как *Ochrobactrum lupini* IPA7.2, а затем на основании полногеномного секвенирования по данным мультилокусного анализа последовательностей (MLSA) как *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2.

ЛПС были предоставлены сотрудниками ИБФРМ ФИЦ СНЦ РАН Бурыгиным Г.Л. и Федоненко Ю.П. в рамках договоров о творческом сотрудничестве.

2.2 Методика изучения влияния бактериальных клеток и их липополисахаридов на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы *in vitro*

Донорные растения пшеницы выращивались в полевых условиях, при этом обеспечивались все условия для формирования здоровых растений.

Посев в поле осуществлялся ручными сеялками с расстоянием между растениями в ряду 5 см и между рядами 20 см. В течение вегетации проводился необходимый уход за растениями.

Все работы с культурами тканей выполнялись учетом требований, изложенных в ряде методических руководств [1, 12, 13, 14, 53]. Все работы по культивированию бактерий и их идентификации на микрорастениях методами им-

мунодиффузного и иммуноферментного анализов, выделению ЛПС бактерий, а также биохимические анализы растений (определение хлорофилла, ферментов и др.) проводили сотрудники лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН Бурыгин Г.Л. и Евсеева Н.В. в рамках договоров о творческом сотрудничестве, приведенных выше.

Зерновки пшеницы вычленялись из колосьев на 14-16 сутки после цветения, что соответствует оптимальной стадии развития для получения каллуса в культуре *in vitro* [218, 317]. Зерновки, извлеченные из центральной части колоса, стерилизовались в растворе хлорамина 3% 6 минут или в растворе «Domes-tos» 10% в течении 10-15 минут. Вычленение зародышей из зерновок проводилось в стерильных условиях ламинар-бокса с соблюдением правил асептики. В чашки Петри на поверхность питательной среды помещались зародыши щитком вверх для получения щиткового каллуса, отличающегося от эпифластового более высокой эмбриогенной способностью [240, 317, 318]. В каждом варианте опыта закладывалось не менее 200 зародышей. Для культивирования использовалась среда Линсмайера-Скуга (ЛС) [414], являющаяся модификацией среды Мурасиге-Скуга [455], с содержанием 2,4Д 2 мг/л и сахарозы 30 г/л. Культивирование осуществлялось в темноте при температуре 25 °C.

Для проведения исследований культуры бактерий выращивали до конца экспоненциальной фазы (18 часов) на жидкой малатной среде (MSM), содержащей (г/л): малат Na – 5 г, K₂HPO₄ – 0,4 г, K₂HPO₄ – 0,4 г, NaCl – 0,1 г, MgSO₄ – 0,2 г, FeSO₄×7H₂O – 0,02 г, Na₂MoO₄×2H₂O – 0,002 г, NH₄Cl – 1 г (pH 6,8-7,0) [232], при 30°C на роторном шейкере (120 rpm). Клетки осаждали центрифугированием при 3,000g в 0,12 M фосфатном буфере (PBS) (pH 7,2), содержащем (г/л): K₂HPO₄ – 0,43; Na₂HPO₄ – 1,68; NaCl – 7,2. Для отмычки бактериальных клеток от культуральной жидкости центрифугировали в буфере PBS дважды. Полученной суспензией живых бактерий инокулировали экспланты (зародыши) на этапе их вычленения путем погружения в суспензию на 2-3 минуты. В других вариантах опыта, каплю бактерий (10 мкг) наносили на культивируемые каллусы. Концентрация бактерий в суспензии составляла 10⁴-10⁶ кле-

ток/мл. Использовали живые бактерии или убитые нагреванием до 100 °С в зависимости от целей эксперимента.

Липополисахариды для изучения влияния бактерий на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы были выделены Федоненко Ю.П. (ИБФРМ РАН) из изучаемых штаммов бактерий по методике [225, 572, 573]. Липополисахариды вводились в состав питательной среды для культивирования каллусов пшеницы в концентрации 1, 10, 100 мг/л перед автоклавированием.

Полученный каллус анализировался на 30 сутки культивирования. Оценивались следующие показатели: выход общего количества образовавшихся каллусов от числа инокулированных эксплантов (%); выход морфогенных каллусов от общего числа полученных каллусов и от числа инокулированных эксплантов (%); выход морфогенных каллусов с начавшимся процессом регенерации побегов на инициальной питательной среде от числа инокулированных эксплантов, от общего числа полученных каллусов и от числа морфогенных каллусов (%).

Морфогенные каллусы субкультивировались на питательной среде для регенерации того же состава, но с заменой 2,4Д на фитогормоны ИУК и кинетин в концентрации по 0,5 мг/л. На 30 сутки анализировали показатели: выход растений-регенерантов от общего числа эксплантов (%); выход растений-регенерантов от числа морфогенных каллусов (%); количество растений-регенерантов на каллус; длина (мм), количество листьев (шт.), сырой и сухой вес растений-регенерантов (мг).

Проводилось изучение накопления молекулярного маркера меристематических клеток – пролиферативного антигена инициалей (ПАИ) в каллусах пшеницы. Четырнадцати-суточные зародыши пшеницы культивировались 30 суток на среде ЛС с 2,4Д 2 мг/л, а затем морфогенные каллусы переносились для регенерации на среду Блейдза с содержанием ИУК и кинетина по 0,5 мг/л. Отбор проб на ПАИ производился в момент закладки зародышей (0 сутки), на 8, 15, 22, 30 сутки (среда с 2,4Д) и на 32, 35, и 39 сутки (среда без 2,4Д). Каждая про-

ба состояла из трех эксплантов, которые отбиралась в трех повторностях. Анализ содержания ПАИ производился по методике [87] методом твердофазного иммуноферментного анализа. Для этого суммарные водорастворимые фракции каллусных белков, нормированные по концентрации суммарного белка, наносили по 50 мкл в каждую лунку полистиролового планшета («Медполимер», Санкт-Петербург). Свободные связи на полистироле блокировали 0,05% раствором полиэтиленгликоля (М.м. 20000). Антиген выявляли с помощью кроличьих моноспецифических антител к ПАИ и меченых пероксидазой козьих антикроличьих антител («Sigma», США). В качестве субстратного реагента использовали ортофенилендиамин с перекисью водорода. Интенсивность хромофорного ответа, прямо пропорциональную количеству ПАИ в образце, определяли с помощью иммуноферментного анализатора (Thermo, Finland) при длине волны света $\lambda=490$ нм. Параллельно в дни отбора проб на ПАИ проводилась визуальная оценка нарастания количества морфогенных каллусов по отношению к общему количеству каллусов (%).

2.3 Методика изучения влияния бактериальных клеток и их липополисахаридов на микроклоны картофеля в культуре *in vitro* и *ex vitro*

Микrorастения картофеля в коллекции в культуре *in vitro* методом вычленения апикальных меристем по методикам получения оздоровленного посадочного материала картофеля [52, 55, 73, 79]. Растения культивировались на питательной среде Мурасиге-Скуга (МС) без гормонов с содержанием сахарозы 30 г/л и агар-агара 7 г/л [455] при температуре 23-25°C, влажность воздуха 70%, интенсивности освещения люминесцентными лампами Flora (Osram) 60 мкм²/с, длине дня 16 часов. Пассирование на свежие среды проводилось каждые 30 суток. Контроль зараженности микrorастений вирусами проводился методом обратной транскрипции, совмещенной с полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) с использованием наборов производства ООО «Синтол». Определяли виroid веретеновидности клубней картофеля (Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd)), X и Y вирусы (Potato virus X, Potato virus Y), M и

L вирусы (PVM и вирус скручивания листьев картофеля PLRV), S и A вирусы (Potato virus S, Potato virus A). ПЦР в реальном времени проводили на оборудовании АНК-32 производства ООО «Синтол».

Для проведения опытов микrorастения в условиях ламинар-бокса разделяли на микрочеренки с одним листом и пазушной почкой и помещали в пробирки на питательную среду МС без гормонов полного или половинного состава микросолей с содержанием агар-агара 7, 3,5 г/л или на жидкую среду (в зависимости от целей эксперимента). Полученные культуры переносили для выращивания на стеллажи для культивирования. Длительность культивирования составляла 20 или 30 суток (в зависимости от целей эксперимента). При необходимости контроля динамики роста растений через каждые 5-10 суток культивирования измеряли следующие морфологические параметры: длина побега (мм), количество узлов на побеге (шт.), количество корней на растении (шт.), максимальная и средняя длина корня (мм), сырая и сухая масса растений или частей растений (мг).

На 20 сутки культивирования дополнительно выявляли бактерии на корнях растений и определяли митотический индекс меристематических клеток придаточных корней микроклонов картофеля [231]. Кончики корней (2-3 мм) фиксировали в уксусной кислоте–этаноле (1:3), окрашивали ацетогематоксилином (Diaem Co., Москва, Российская Федерация), мацерировали ферментом цитазой и рассматривали в микроскопе Leica DM 2500 (Германия) при увеличении ×600. В каждом эксперименте проводилось три повторения, в каждом из которых анализировались кончики корней, вырезанные из пяти растений. В каждом кончике корня анализировалось не менее 1000 клеток.

Суспензией бактерий (10^8 клеток/л) инокулировали микrorастения на этапе черенкования таким образом, чтобы конечная концентрация бактерий в среде составила 10^4 - 10^6 кл./мл раствора. Контролем служили стерильно выращенные микrorастения без инокуляции бактериями.

Для установления наличия жизнеспособных клеток бактерий, ассоциированных с корнями растений картофеля проводился микробиологический тест.

Для этого из разных зон придаточных корней опытных и контрольных вариантов были вырезаны фрагменты длиной около 5 мм и помещены на MSM, содержащую 1,5% агар-агара. Образцы культивировали в термостате 3 суток при 30°C. После этого из зон обраствания проводили высев на MSM для последующего иммунодиффузионного анализа со штаммоспецифическими антителами (АТ) против определяемого штамма бактерий, полученными по методике [429].

Для контроля наличия бактерий на корнях микрорастений проводили иммунодиффузный анализ. Двойную иммунодиффузию в агарозном геле бактериальных препаратов с антителами к клеткам бактерий проводили по стандартной методике [476]. Для получения препаратов клетки отмывали PBS, осаждали центрифугированием и обрабатывали в течение 30 мин при комнатной температуре экстрагирующим буфером (рН 8.5) следующего состава: 0,1 М Трис-HCl, 10 мМ ЭДТА, 0,1 мМ PMSF, 1% тритон X-100 (количество ЭДТА составляло 0,05 мМ на 1 г влажных клеток). Экстракт освобождали от клеток центрифугированием. Реакцию преципитации проводили на стеклянных пластинах 9x9 см в 1 %-ном агарозном геле, приготовленном на PBS. Результаты опытов оценивали через 1-2 суток. При этом пластины высушивали, окрашивали в растворе Кумасси бриллиантового синего R-250 и обесцвечивали в водном растворе, содержащем 45 % этилового спирта и 10 % уксусной кислоты.

Для определения локализации микросимбионтов на поверхности корней микроклонов картофеля использовали флуоресцентную микроскопию. Для этого корни 20-ти суточных регенерантов разрезали на фрагменты длиной 10-15 мм и однократно отмывали в ЗФР (5 мин). Блокировку неспецифических сайтов связывания проводили 0,05% раствором полиэтиленгликоля 20000 (ПЭГ) в течение одного часа. Затем наносили первичные кроличьи антитела (Ат) к клеткам *A. baldaniorum* Sp245 (концентрация 50 мкг/мл). После этого корни отмывали в ЗФР+Твин-20 (3 раза по 15 мин). В качестве вторичных Ат использовали ослиные антикроличьи Ат для флуоресцентной микроскопии, коньюгированные с флуоресцеинизотоцианатом (ОААТ-ФИТЦ) (концентрация 100 мкг/мл) производства ГУНИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика Н.Ф. Гамалеи

РАМН. Затем образцы дважды отмывали в ЗФР+Твин-20, помещали на предметное стекло и анализировали с использованием светового микроскопа из комплекта лазерного диссектора Leica LMD 7000 в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Симбиоз» ИБФРМ РАН. В качестве контроля использовали неинокулированные корни регенерантов.

Для изучения влияния бактерий на адаптацию к условиям *ex vitro* контрольные и инокулированные бактериями микrorастения высаживали в сосуды с почвой. Использовалась готовая нестерильная почва коммерческой марки Terra Vita. Сосуды с растениями помещали на стеллажи в оранжерею или климатическую камеру Bynder (Германия) при температуре 24-25°C; влажности воздуха 60-70%; интенсивности освещения люминесцентными лампами Flora (Osram) 60 мкм m^2/s , длине дня 16 часов. Через 10-20 суток измеряли морфологические параметры растений: высота растения (мм), количество листьев (шт.), площадь листьев (cm^2).

После этого растения высаживались в открытый грунт по схеме 0,4x0,4 м. Погодные условия адаптации и выращивания в открытом грунте не регулировались и являлись стрессовыми для растений (в некоторые дни температура воздуха в дневные часы превышала 30°C, влажность воздуха составляла менее 60%, скорость ветра в метровом приземном слое превышала 3-5 м/с). В период вегетации проводился уход за растениями: полив, прополка, рыхление, подкормка минеральными удобрениями, комплексная обработка против болезней и вредителей. Через три недели после высадки, а также при наступлении фазы бутонизации и начала цветения растений проводилось измерение следующих параметров: доля выживших растений (%), высота растений (см), количество побегов на растении (шт.), число листьев на растении (шт.), площадь листьев (cm^2). Уборку клубней проводили в фазу увядания ботвы. Подсчитывали количество клубней на одном растении (шт.), массу каждого клубня (г), массу клубней с одного растения (г).

Для сравнения влияния ризосферных бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и экзогенной ИУК в составе питательной среды изучалась экспрессия генов утили-

зации индолилуксусной кислоты. Десяти-суточные микрорастения картофеля сорта Невский были подвергнуты воздействию суспензии бактерии *A. baldani-orum* Sp245 в концентрации 10^6 кл./мл питательной среды, а также экзогенной ИУК в концентрации 1, 0,1 и 0,01 мг/л. В качестве контроля использовали растения без обработки. Анализ экспрессии генов проводили через 3 суток.

Экспрессию генов изучали методом обратной транскрипции РНК с последующим ПЦР в реальном времени. Использовали стандартные наборы для выделения РНК, обратной транскрипции и ПЦР-РВ производства компании ООО «Синтол». Для выделения геномной РНК использовали набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растений «Фитоскрин». После деградации ДНК ферментом ДНК-азой проводили обратную транскрипцию с использованием набора ОТ-РВ. Выход ДНК составлял 3-4 мкг на 10 мг ткани. В качестве контроля экспрессии использовали гены «домашнего хозяйства»: TUB, GAP. Использовали стандартные наборы для выделения РНК, обратной транскрипции и ПЦР-РВ компании «Синтол». Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР также были синтезированы ООО «Синтол» (Таблица 2.2). Исследовали 3 гена из предложенных исследователями Junpeng Gao с соавторами (2016), а также AMI, TIR1, GH3.1, IPAM, GH3. Относительный уровень экспрессии рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [416].

Определение каллозы в корнях растений картофеля проводилось по методике Millet с соавторами [362]. Сегменты корней (1,5-2 см) помещались вфиксатор Карнua (этанол: уксусная кислота 3: 1) на ночь. Затем корни постепенно регидратируются в 70 %-ном этаноле в течение 2 часов, 50%-ном этаноле в течение дополнительных 2-х часов и воды в течение ночи. После 2-х промываний водой сегменты корней обрабатываются 10% NaOH и помещаются при 37° С на 1-2 часа, чтобы ткани стали прозрачными. После трех или четырех промываний водой сегменты корней инкубируются в 150 мМ K₂HPO₄, pH 9,5 и 0,01% анилинового синего на несколько часов. Затем сегменты корней помещаются на предметные стекла, и наблюдается каллоза сразу же на лазерном микродиссекторе Leica LMD 7000 с флуоресцентной приставкой [362].

Таблица 2.2 – Праймеры для ПЦР-РВ для изучения экспрессии генов утилизации индолилуксусной кислоты

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>TUB</i>	GTTACTTGCTGTTGAGATTCCCTG	CTGTCAGGTAACGTCCATGACG
<i>GAP</i>	GGTTAAGGATGAGAAGACCCTTC	GCGGAGATCACAACCTTCTTG
<i>StIAA3</i>	ATTGTGGACTCAAGGATT	ACAAACATCTCCAAGGTA
<i>StIAA15</i>	TAGAACGAGCTACGTTAA	CATATCCCAAGGTACATCA
<i>StIAA20</i>	ACCCAGCACGACTGTTGT	TTCCGTCATTCTTCCAT
<i>AMI</i>	GGCTTACAGCATCAATGGCG	CACCAGTATCCGTTCTAATGCG
<i>TIR1</i>	CCGTTGGAGACAAGGCTCT	TCTTCGTCCAGCCACAGTTC
<i>GH3.1</i>	CTCCAGGGTGATTCTGT	TTCTTGGTCCACTGTCT
<i>IPAM</i>	TGTTTGGACATTGGTGCAT	AACGGTGCCACATGAAAAT
<i>GH3</i>	GAGACGAAAACCTCCAGGTGG	CGCTCATAGAGACCGCAGAG

Примечание – локусы *StIAA*, входят в семейство генов картофеля *Aux/IAA* по данным Potato Genome Sequencing Consortium, <http://potato.plantbiology.msu.edu/>.

Для определения каллозы в листьях растений картофеля сегменты листьев с 3-х растений картофеля помещаются в чашки Петри и обезвоживаются абсолютным этианолом в течение 12 часов. Затем они переводятся последовательно от 100% этианола до 67 мМ K₂HPO₄ (pH 12,0) через растворы постепенно уменьшающихся концентраций этианола (например, 100%, 75%, 50%, 25% и 0%). Затем листья окрашиваются 0,01% (мас./об.) анилиновым синим в 67 мМ K₂HPO₄ (pH 12,0) в течение 1 ч при комнатной температуре. Окрашенный материал переносится на предметные стекла и наблюдается каллоза сразу же на лазерном микродиссекторе Leica LMD 7000 с флуоресцентной приставкой.

2.4 Статистический анализ данных экспериментов

Все эксперименты повторялись трижды. В экспериментах с культурами соматических каллусов пшеницы в каждом варианте опыта закладывалось в

среднем 200 эксплантов ($n=200$). в экспериментах с микроклонами картофеля в каждом варианте опыта закладывалось в среднем по 40 пробирок ($n=40$) с растениями и по 30 растений ($n=30$) при высадке в условия *ex vitro*.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ статистического и биометрико-генетического анализа в растениеводстве и селекции AGROS, версия 2.10 [67] и программы Statistica 6 (StatSoft). Вычислялась стандартная и относительная ошибки опыта, наименьшая существенная разность (НСР), а также проводились множественные сравнения по критерию Фишера ($F_{\text{факт.}}$) и по тесту Дункана. Полученные данные ранжировали согласно этому тесту при уровне значимости $p = 0,05$, что позволило определить достоверность различий исследуемых вариантов. Варианты, сопровождаемые в Таблицах и диаграммах одинаковыми латинскими буквами, различались незначимо по тесту Дункана. Для качественных показателей достоверность различий оценивали методами вариационной статистики альтернативных (двоеквозможных) признаков при уровне значимости $p = 0,05$ или $p = 0,01$ на основе критерия Стьюдента t_{05} или t_{01} и стандартного отклонения $s=[p(1-p)]^{1/2}$ [40]. Эффекты *Rht*-генов (%) определялись путем сопоставления значений изучаемого признака у низкорослых и их сестринских высокорослых линий.

Глава 3 Генетическая модель для изучения влияния морфогенеза в культуре соматических тканей пшеницы *in vitro*

3.1 Изучение эффектов генов короткостебельности в культуре соматических тканей пшеницы *in vitro*

Эффективность морфогенетических процессов в культуре клеток и тканей растений *in vitro* в большой степени зависит от генотипа. Как было показано в пункте 1.5 главы 1, многие исследования по изучению морфогенеза растений проведены на модельных объектах, в качестве которых обычно используются сорта с высокой «отзывчивостью» к культивированию, то есть сорта, способные с большой вероятностью формировать каллус, морфогенные структуры (эмбриоиды, почки) и регенерировать растения. Альтернативой такого модельного сорта обычно выступает сорт с низкой способностью к морфогенезу *in vitro*. Однако сорта различаются между собой десятками и сотнями генов в самых различных комбинациях, что делает такую пару недостаточно репрезентативной с точки зрения альтернативности в отношении изучаемого признака и нарушает принцип единственного различия дисперсионного анализа. В связи с этим, особенный интерес представляют почти изогенные линии, идентичность которых составляет более 99%. В пункте 1.5 главы 1 описана группа генов, определяющих процессы реализации totipotentности клеток растений, но с точки зрения практической растениеводства и селекции особый интерес представляют гены, детерминирующие хозяйствственно-ценные признаки, например, гены, отвечающие за снижение высоты растений. При этом, как известно, гены обладают не только прямыми, но и плеотропными эффектами на различные признаки, в том числе на этапы морфогенетических процессов в культуре клеток и тканей растений *in vitro*.

Скрининг набора изогенных сестринских линий, альтернативных по генам короткостебельности *Rht-B1b*, *Rht-B1c*, *Rht-14*, *s1*, *Q*, созданных в генотипе сорта Саратовская 29 [63], проводился в культуре пыльников и соматических тканей *in vitro* мягкой пшеницы. Линии с изучаемыми генами были обозначе-

ны: LRht-B1b, LRht-B1c, LRht-14, Ls1, и LQ. Соответствующие высокорослые сибы были обозначены: LRht-B1a, Lrht-14, LS1, и Lq. В результате проведенных исследований было установлено, что гены системы *Rht*, а также *s1* и *Q*, однозначно определяющие на уровне целого растения редукцию в той или иной мере высоты растения, на клеточном уровне демонстрируют различный характер влияния на морфогенетические процессы.

В культуре пыльников *in vitro* гены системы *Rht*, а также *s1* и *Q* в генофонде сорта мягкой пшеницы Саратовская 29 могут оказывать существенное влияние на формирование морфогенных пыльников, гаплоидных новообразований и растений-регенерантов (Таблица 3.1, 3.2).

Попарное сравнение линий, содержащих гены короткостебельности, и их высокорослых сибов показало, что среди взятых в изучение линий во все годы изучения достоверное превышение изучаемых показателей отмечалось у линий с генами *Rht-B1c* и *Q*. Линии с этими генами достоверно превышали соответствующие высокорослые сибы по показателям выход морфогенных пыльников, выход гаплоидных новообразований, выход растений-регенерантов, в % от общего количества инокулированных пыльников. Положительное влияние на все этапы гаплопродукции также отмечалось у линии с геном *Rht 14*, но статистически достоверные отличия обнаружены не во всех экспериментах.

У линии с геном *s1* отмечалось снижение выхода морфогенных пыльников и новообразований. На регенерацию растений данный ген существенного влияния не оказывал. Линия с геном *Rht-B1b* ни в одном эксперименте существенно не отличалась от своего высокорослого сиба ни по одному показателю (Таблица 3.1, 3.2).

Анализ соматических каллусных культур, полученных из незрелых зародышей, показал, что при внесении в генофонд сорта мягкой пшеницы Саратовская 29 гены короткостебельности могут оказывать существенное влияние на формирование меристематических очагов в тканях и способность к сохранению регенерационной активности в процессе длительного культивирования каллусов (Таблица 3.3).

Таблица 3.1 – Влияние генов короткостебельности на морфогенез в культуре пыльников *in vitro* яровой мягкой пшеницы

Генотип	Количество пыльников всего, шт.	Выход морфогенных пыльников, % от всех пыльников	Выход новообразований, % от всех пыльников		
			всего	каллусов	эмбриоидов
Саратовская 29	1148	2,70	4,70	1,17	4,53
ЛRht-B1b	1120	0,54	0,54	0,27	0,27
ЛRht-B1a (сиб)	1036	0,77	1,06	0,19	0,87
ЛRht-B1c	1036	5,50	9,85	0,77	9,07
ЛRht-B1a (сиб)	616	0,81	1,46	0,16	1,30
ЛRht-14	644	0,62	0,93	0,47	0,47
Лrht-14 (сиб)	1148	0,44	0,44	0,26	0,17
Лs1	1204	0,33	0,33	-	0,33
ЛS1 (сиб)	1120	1,61	2,32	0,09	2,23
ЛQ	1036	2,80	4,05	0,58	3,47
Лq (сиб)	1120	0,54	0,54	-	0,54
F факт.		17,63*	38,39*	2,38*	37,86*
HCP _{0,05}		1,08	1,34	0,45	1,26

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{meop.}$

Таблица 3.2 – Влияние генов короткостебельности на способность к регенерации в культуре пыльников *in vitro* яровой мягкой пшеницы

Генотип	Количество растений-регенерантов					
	общее,		зеленых,		альбиносных,	
	шт.	% от всех пыльников	шт.	% от всех пыльников	шт.	% от всех пыльников
Саратовская 29	8	0,70	2	0,17	6	0,52
ЛRht-B1b	3	0,27	2	0,18	1	0,09
ЛRht-B1a (сиб)	1	0,10	0	0,00	1	0,10
ЛRht-B1c	26	2,50	10	0,97	16	1,54
ЛRht-B1a (сиб)	4	0,65	1	0,16	3	0,49
ЛRht-14	1	0,16	1	0,00	0	0,00
Лrht-14 (сиб)	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Лs1	0	0,00	0	0,00	0	0,00
ЛS1 (сиб)	5	0,45	2	0,18	3	0,27
ЛQ	22	2,12	9	0,37	13	1,25
Лq (сиб)	2	0,18	1	0,09	1	0,09
F факт.		12,30*		4,82*		7,59*
HCP _{0,05}		0,70		0,44		0,55

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{meop.}$.

Выявлены гены *Rht-B1c* и *Rht14*, обладающие сильным положительным эффектом на формирование морфогенных каллусов и сохранение регенерационной способности в процессе пассирования. При этом гены *s1* и *Q* достоверно тормозили морфогенетические процессы в каллусах. Ген *Rht-B1b* не оказывал влияния на закладку меристематических очагов и регенерацию растений.

Таблица 3.3 – Влияние генов короткостебельности на выход морфогенных каллусов в культуре соматических каллусов мягкой пшеницы *in vitro*

Генотип	Количество эксплантов, шт.	Выход каллуса,		Выход морфогенного каллуса,							
		шт.	%	30 суток		60 суток		90 суток		120 суток	
				шт.	% от эксплантов	шт.	% от эксплантов	шт.	% от эксплантов	шт.	% от эксплантов
Саратовская 29	192	162	84,4	33	17,2	23	12,0	18	9,4	3	1,6
ЛRht-B1b	237	222	93,7	27	11,4	22	9,3	16	6,8	3	1,3
ЛRht-B1a (сиб)	220	200	90,9	34	15,5	25	11,4	10	4,5	5	2,3
ЛRht-B1c	229	220	96,1	37	16,2	32	14,0	21	9,2	10	4,4
ЛRht-B1a (сиб)	235	214	91,1	27	11,5	25	10,6	14	6,0	1	0,4
ЛRht-14	239	220	92,1	71	29,7	63	26,4	44	18,4	11	4,6
Лrht-14 (сиб)	208	205	98,6	35	16,8	26	12,5	22	10,6	2	1,0
Лs1	214	189	88,3	12	5,6	4	1,9	3	1,4	0	0,0
ЛS1 (сиб)	211	207	98,1	39	18,5	31	14,7	13	6,2	6	2,8
ЛQ	233	186	79,8	19	8,2	16	6,9	8	3,4	1	0,4
Лq (сиб)	182	166	91,2	37	20,3	22	12,1	19	10,4	3	1,6
F факт.			8,99*		7,6*		8,29*		7,42*		3,1*
HCP _{0,05}			5,3		4,6		6,2		5,2		2,7

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{теор.}}$.

Сравнение эффектов генов в гомо- и гетерозиготном состоянии показало, что во всех вариантах наблюдается эффект гетерозиса у гибридов F1 по сравнению с короткостебельными линиями по способности к формированию морфогенных каллусов. Возможность гетерозисного эффекта по показателям культивирования *in vitro* была отмечена в ряде исследований различных авторов [426, 520].

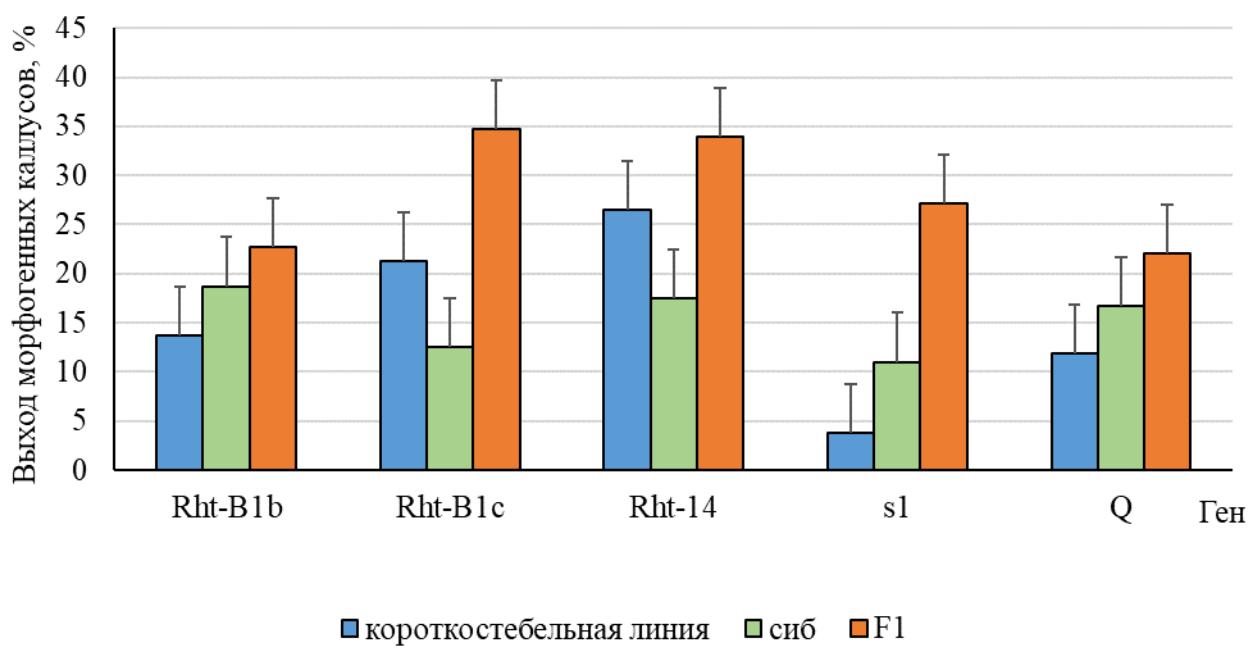


Рисунок 3.1 – Влияние генов короткостебельности в гомо- и гетерозиготном состоянии на выход морфогенных каллусов в культуре соматических каллусов мягкой пшеницы *in vitro*

В результате проведенных исследований установлено, что гены, основным эффектом которых *in vivo* является снижение высоты растений, в культуре клеток и тканей *in vitro* оказывают различное качественное и количественное влияние на отдельные морфогенетические процессы. Выявлены гены, обладающие достоверным положительным эффектом на формирование каллусов с зонами меристематической активности и растений регенерантов [95].

3.2 ПАИ – молекулярный маркер морфогенеза в культуре соматических тканей пшеницы *in vitro*

Морфогенез в культуре клеток и тканей растений *in vitro*, приводящий в конечном итоге к реализации свойства totipotentности растительной клетки, сопровождается изменениями в количестве и качестве клеток, то есть в уровне их дифференцированности, включенности в состав тканей и органов. Любые изменения состояния дифференцированности сопровождаются изменением экспрессии соответствующих генов и синтезом различных белков, являющихся маркерами состояния клеток и тканей [15, 218, 420]. Молекулярным маркером меристематических клеток пшеницы является белок пролиферативный антиген инициалей (ПАИ) [25, 42, 631].

Была выявлена связь между морфогенетическим потенциалом каллусных клеток и содержанием в них ПАИ [576]. В экспериментах с неморфогенными каллусами различного происхождения (от короткостебельных или высокорослых линий), проведенных иммунодиффузионным анализом, ПАИ содержался в очень низкой концентрации (Рисунок 3.2). При этом в морфогенных каллусах у этих же линий пшеницы ПАИ содержалось в 2,5-3 раза больше. Это позволяет сделать вывод о том, что ПАИ связан с закладкой меристематических очагов в каллусной ткани и может считаться маркером морфогенеза.

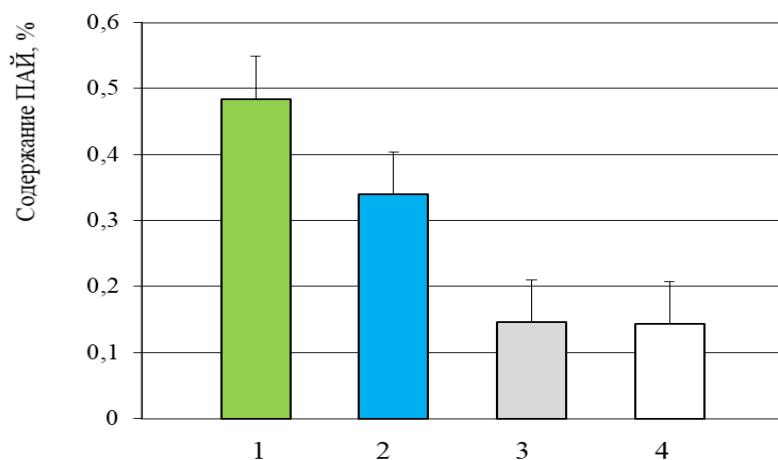


Рисунок 3.2 – Содержание ПАИ в морфогенных (1, 2) и неморфогеных каллусах (2, 3) на среде для регенерации (1, 3) и на среде для каллусогенеза (2, 4)

Сравнительный иммунохимический анализ содержания ПАИ в незрелых зародышах и каллусной ткани пшеницы пяти пар почти изогенных линий в процессе каллусогенеза и последующей регенерации показал, что в незрелых зародышах (до начала культивирования) всех изучаемых генотипов содержание ПАИ было одинаковым (Рисунок 3.3). Этот факт объясняется функционированием инициальных клеток в эмбриональных апексах незрелых зародышей пшеницы. В процессе каллусогенеза проводили сравнительный анализ содержания ПАИ на 7-е, 14-е, 24-е и 30-е сутки культивирования. На 7-е сутки каллусогенеза отмечалось снижение содержания ПАИ у всех исследуемых генотипов. На этом этапе культивирования в незрелых зародышах происходит процесс дедифференциации клеток тканей, то есть наращивания каллусной массы за счет недифференцированного деления растительных клеток. В это время начинают активно функционировать молекулярные маркеры каллусных клеток, но понижается синтез меристематических антигенов, к которым относится ПАИ.

Начиная с 14 суток культивирования, отмечалось увеличение содержания ПАИ в каллусах всех изучаемых генотипов. Причем, достоверное различие в увеличении содержания ПАИ по сравнению с высокорослым сибом наблюдалось, только у низкорослой линии с аллелем *RhtB1c* (Рисунок 3.3). На 24-е и 30-е сутки каллусогенеза происходило дальнейшее увеличение содержания ПАИ, и достоверное различие между низкорослыми линиями и высокорослыми сибами наблюдалось у всех исследуемых генотипов на 30-е сутки культивирования. Морфометрический анализ каллусов на 30-е сутки культивирования (Таблица 3.3), показывает, что количество морфогенных каллусов у низкорослых линий с аллелями *RhtB1c* и *Rht14* значительно превышает аналогичный показатель соответствующих сестринских высокорослых линий.

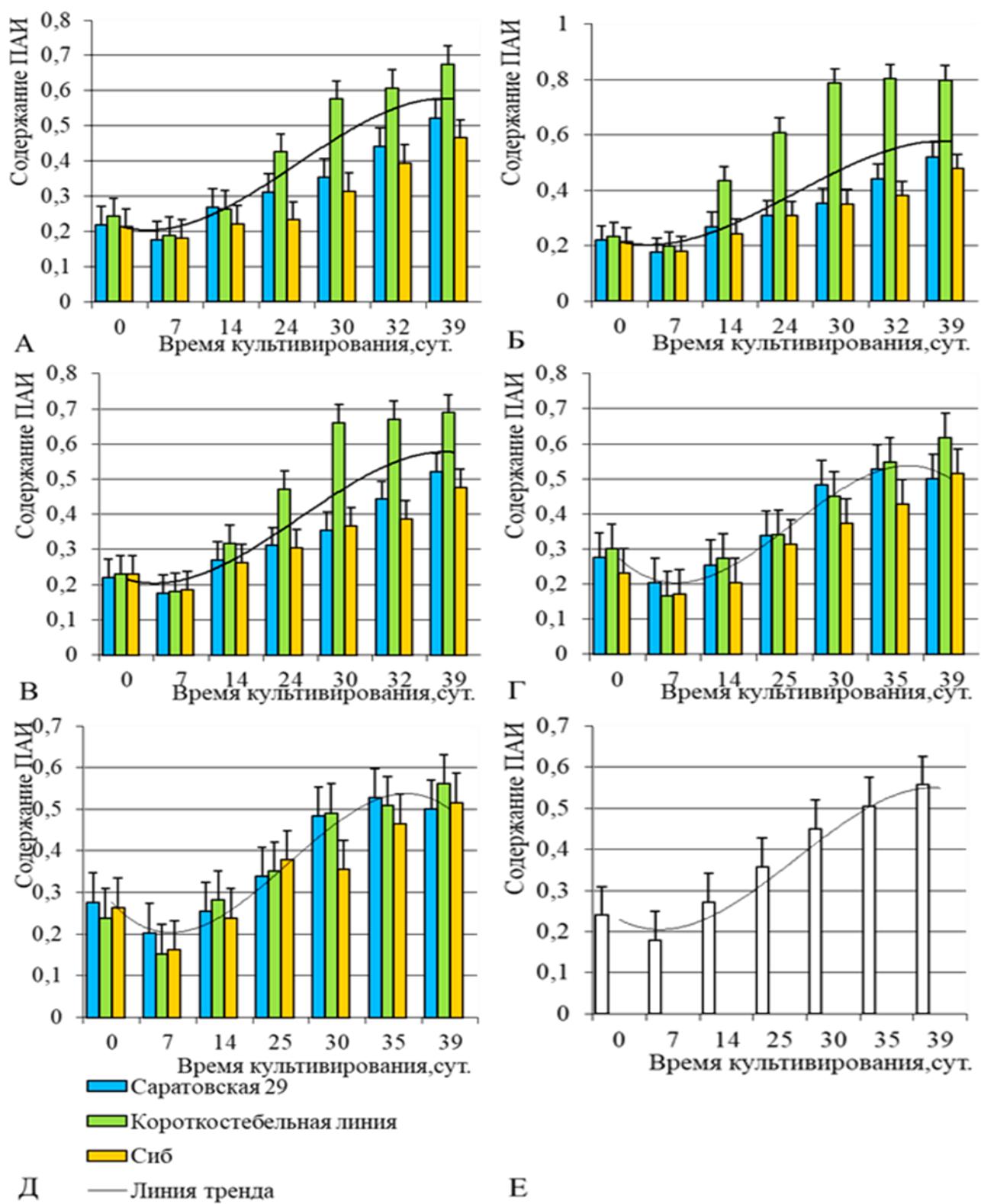


Рисунок 3.3 – Динамика содержания ПАИ в соматических каллусах сорта яровой мягкой пшеницы Саратовская 29 и почти изогенных сестринских линий, альтернативных по генам короткостебельности (2004-2006 гг.): А – по гену *Rht-B1b*; Б – по гену *Rht-B1c*; В – по гену *Rht14*; Г – по гену *s1*; Д – по гену *Q*; Е – в среднем по всем вариантам

В тоже время не было отмечено достоверных различий по этому показателю у линий, альтернативных по аллелю *RhtB1b*. У линий, альтернативных по с генами *s1* и *Q* не различие в содержании ПАИ у короткостебельной линии не столь существенно в сравнении с сортом и сибом, что коррелирует со сниженным количеством морфогенных каллусов на 30-е сутки культивирования.

После переноса морфогенных каллусов на среду для регенерации содержание ПАИ продолжало увеличиваться у всех генотипов. Но у низкорослой линии с аллелем *RhtB1c* увеличение его количества происходило значительно интенсивнее. На 9-е сутки регенерации разница между генотипами сглаживалась, что соответствовало переходу к регенерации целых растений (Рисунок 3.3).

В результате исследований установлена общая закономерность динамики содержания ПАИ в соматических каллусах пшеницы, заключающаяся в снижении уровня его содержания в процессе каллусогенеза и повышении уровня его содержания при вторичной дифференциации клеток до определенного максимального уровня в процессе регенерации растений. Эта закономерность выражается кривой линией, описываемой уравнением типа $Y=a+b_1x+b_2x^2+b_3x^3$ (Рисунок 3.3).

Для исследуемых 11 генотипов получено следующее усредненное уравнение кривой линии:

$$Y = 0,2205977799 - 0,0081608275x + 0,0009683462x^2 - 0,0000132656x^3.$$

Установлено, что отдельные гены могут влиять на форму общей кривой линии, не изменяя ее принципиального характера.

3.3 Использование генетической модели на основе почти изогенных линий для оптимизации метода культивирования клеток пшеницы *in vitro*

Модельные линии были использованы для изучения влияния тетрагидратгидротартрата-цис-[2S, 5R-1,5-диметил-2-(1-окси-3-пропил)]-пирролидиния (1385). Изучаемое вещество, производное фурфурола, получаемое при гидролитическом расщеплении гемицеллюлоз, по своему химическому строению близко к группе цитокининов, и в эксперименте было представлено рацематом и

двумя оптическими изомерами (+) гидротартрат [1,5-диметил-2(1-окси-3-пропил)пирролидиния] (1386) и (-) гидротартрат [1,5-диметил-2(1-окси-3-пропил)пирролидиния] (1387). Биологическая активность рацемата 1385 на вегетирующие растения была установлена ранее (Патент RU 2039041).

Исходный рацемат 1385 оказывал отрицательное влияние на образование морфогенных каллусов, снизив выход морфогенных каллусов на 43,5-47,2 % в зависимости от концентрации в составе среды (Таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Влияние тетрагидрат (+) гидротартрата (+) цис-[2S, 5R-1,5-диметил-2-(1-окси-3-пропил)]-пирролидиния на морфогенез в культуре соматических тканей мягкой пшеницы *in vitro*

Вариант	Количество эксплантов, шт.	Выход морфогенных каллусов,		Выход регенерантов,	
		шт.	% от количества эксплантов	шт.	% от количества морфогенных каллусов
контроль	239	46	19,3b	25	54,3a
1385 1 мг/л	236	24	10,2a	20	83,3b
1385 10 мг/л	239	26	10,9a	24	92,3b
1386 1 мг/л	238	47	19,8b	39	83,0b
1386 10 мг/л	239	39	16,3a	32	82,1b
1387 1 мг/л	233	49	21,0b	32	65,3a
1387 10 мг/л	237	35	14,8a	25	71,4a
F _{факт.}	-	-	2,8*	-	3,0*
HCP _{0,05}	-	-	6,7	-	19,6

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{теор.}$.

Изомеры 1386 и 1387 в изученных концентрациях не влияли на морфогенную способность каллусов.

На регенерационную способность одинаково положительно влияли рацемат 1385 и оптический изомер 1386.

Изомер 1387 на образование каллусов с проростками на исходной питательной среде влияния не оказал (Таблица 3.4).

Глава 4 Изучение влияния бактериальных клеток и их липополисахаридов на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы *in vitro*

4.1 Изучение влияния бактериальных клеток на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы *in vitro*

Изучение морфогенеза в культуре соматических тканей пшеницы проводилось по стандартной схеме непрямого эмбриоидогенеза и органогенеза (Рисунок 4.1).

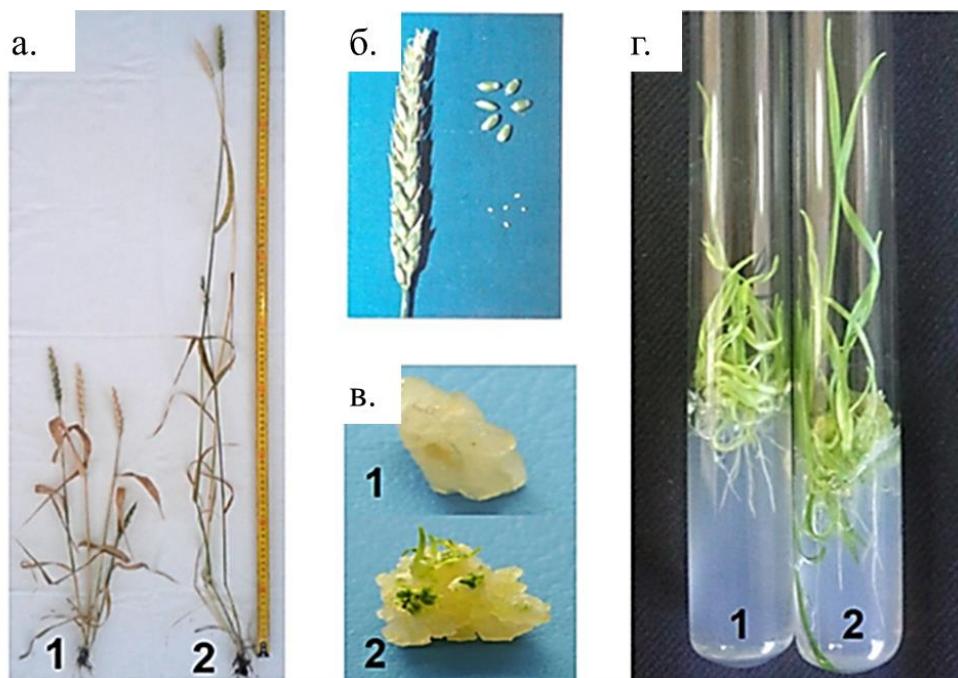


Рисунок 4.1 – Схема проведения экспериментов по изучению морфогенеза в культуре соматических тканей пшеницы: а. – донорные растения яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum L.* (почти изогенные сестринские линии, альтернативные по гену *Rht-B1c*, в генофонде сорта Саратовская 29); а1. – линия с аллелем *Rht-B1c*; а2. – высокорослый сиб с аллелем *Rht-B1a*; б. – колос, зерновки и зародыши на этапе вычленения и введения в культуру (14-е сутки после опыления); в. – каллусы на 30 сутки культивирования: в1. – неморфогенный каллус; в2. – морфогенный каллус с зонами регенерации; г. – растения-регенеранты; г1. – регенерант линии с аллелем *Rht-B1c*; г2. – регенерант высокорослого сиба с аллелем *Rht-B1a*

Для пшеницы обязательными этапами морфогенеза являются дедифференциация с пролиферацией каллусной ткани и последующим формированием в ней меристематических очагов. В дальнейшем формируются эмбриоиды или стеблевые почки и корни. Общий выход каллусов из эксплантов как правило достаточно высокий для большинства генотипов.

В данном исследовании впервые было проведено комплексное исследование влияния бактерий рода *Azospirillum* на морфогенетические процессы в культуре соматических тканей пшеницы двух почти изогенных линий, альтернативных по гену короткостебельности *Rht-B1c*. За годы исследования для изучаемых генотипов, линий LRht-B1c и LRht-B1a (сиб), каллусогенез из незрелых зародышей составлял порядка 80-100%. Достоверных различий между изучаемыми линиями на этапе каллусогенеза не наблюдалось. На 30-е сутки культивирования визуальный анализ каллусов под бинокулярной лупой позволял выделять морфогенные каллусы с очагами меристематической активности и начинаящейся регенерацией растений. Неморфогенные каллусы с высокой вероятностью не были способны к регенерации даже при переносе на среду для регенерации. Растения-регенеранты формировались в течении еще 30 суток.

Для изучения влияния живых бактерий на процессы каллусогенеза и вторичной дифференциации незрелые зародыши на этапе вычленения помещались на 3-5 минут в суспензии живых бактерий, содержащих 10^6 клеток в мл суспензии. Для инокуляции использовались ризосферные бактерии рода *Azospirillum*: *A. balduinorum* Sp245, *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* SR88, *A. brasilense* SR80. Было установлено, что данные штаммы не растут на питательной среде М-С, так как не способны использовать в качестве источника углерода сахарозу.

Анализ культур показал, что во всех вариантах инокуляции наблюдалось начало формирования каллусов, но далее пролиферация клеток ингибировалась, и к 30-м суткам клетки некротировали (Рисунок 4.2). В питательную среду выделялись метаболиты вероятно фенольной природы, окрашивающие ее в желтый цвет. Контаминация культур не наблюдалась, как и ожидалось, так как бактерии на среде самостоятельно не развивались. Некоторое количество бак-

терий распространялось вокруг каллусов, что можно объяснить выделением каллусами метаболитов в питательную среду, которые использовались бактериями для питания.

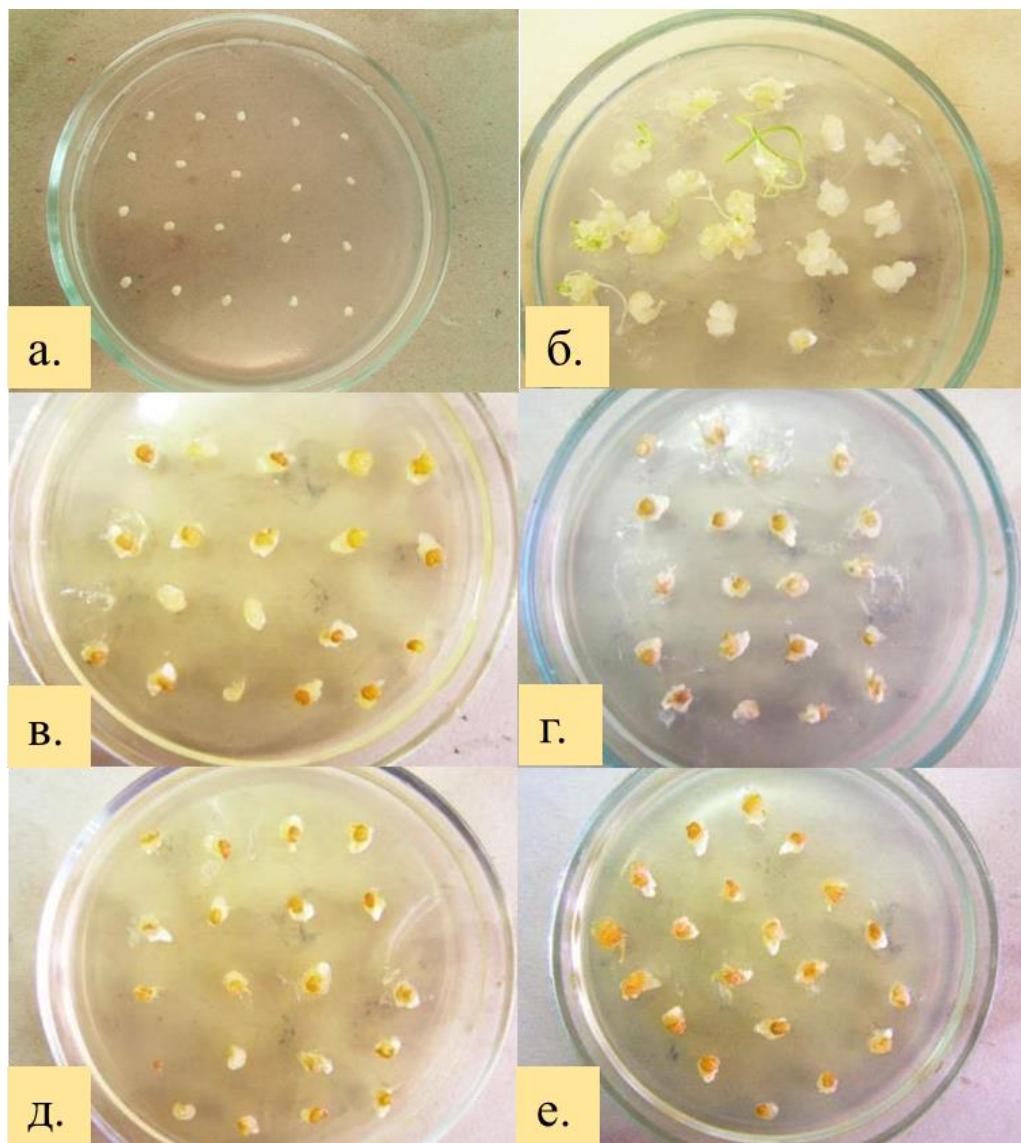


Рисунок 4.2 – Каллусогенез из незрелых зародышей, инокулированных бактериальными штаммами: а. – 14-ти суточные зародыши на 0 сутки; б.-е. – 30-е сутки культивирования; б. – контроль без бактерий; в. – инокуляция штаммом *A. baldaniorum* Sp245; г. – инокуляция штаммом *A. brasiliense* Sp7; д. – инокуляция штаммом *A. brasiliense* SR88; е. – инокуляция штаммом *A. brasiliense* SR80

Инокуляция каллусов на 10-е стуки культивирования эксплантов также не дала положительного эффекта (Рисунок 4.3в). Несмотря на то, что каллусная ткань уже начала формироваться к 10-ым суткам, инокуляция бактериями, как и при инокуляции на 0-е сутки (Рисунок 4.3б), приводила к некрозу тканей. На 30 сутки не было обнаружено ни одного жизнеспособного каллуса. В то же время в контроле (Рисунок 4.3б) 100% эксплантов формировали каллус, часть их которых были морфогенными.

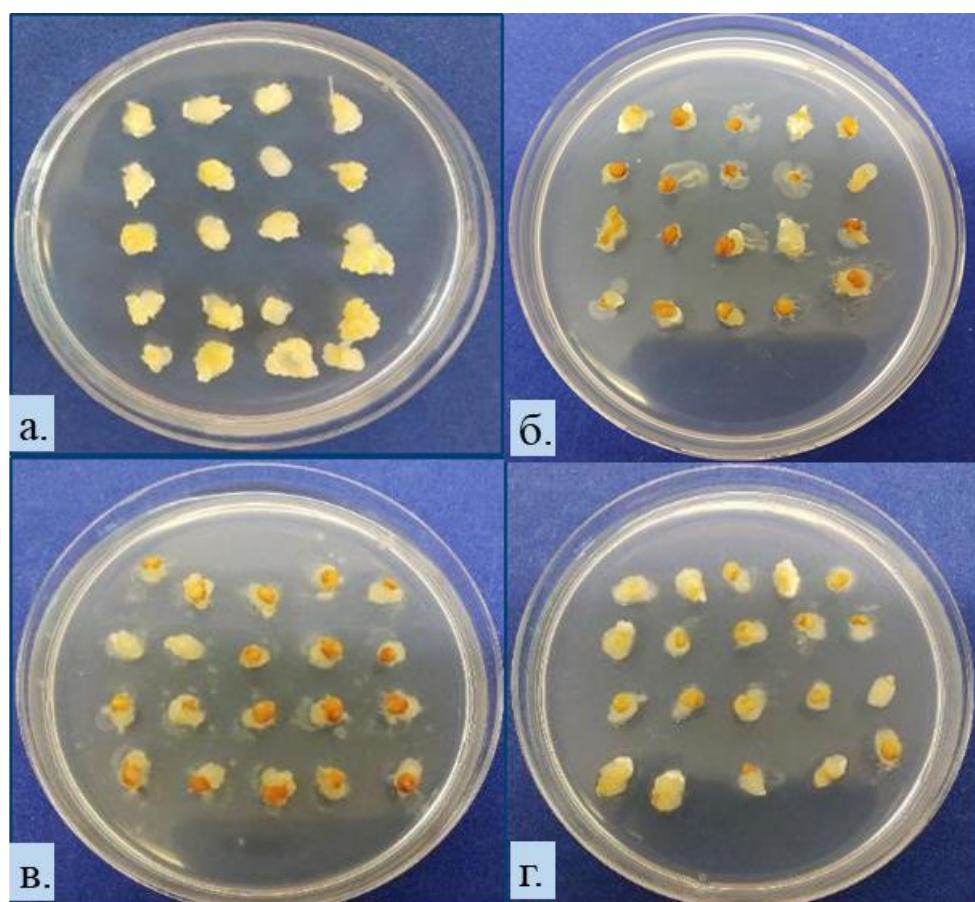


Рисунок 4.3 – Каллусогенез в культуре соматических тканей, инокулированных штаммом *A. baldaniorum* Sp245: а. – контроль без бактерий; б. – инокуляция на 0 сутки культивирования; в. – инокуляция на 10 сутки культивирования; г. – инокуляция на 0 сутки культивирования с обработкой канамицином на 7 сутки культивирования

Использование раствора антибиотика канамицина в концентрации 100 мкг/мл приводило к освобождению растительных тканей от бактерий, каллусы не погибали (Рисунок 4.3г). Наблюдалось частичное восстановление роста каллусов (75-90%), но морфогенетические процессы угнетались, меристематические очаги не формировались, и регенерация растений не происходила.

Бактериальные клетки штамма *A. brasiliense* sp7 были убиты нагреванием до 100 °С в течение 10 мин. и использованы для инокуляции эксплантов параллельно с живыми бактериями того же штамма. Гибель клеток бактерий контролировалась высеиванием на чашки с питательной средой MSM. Анализ каллусных культур показал, что в варианте с убитыми клетками фитотоксический эффект отсутствовал (Таблица 4.1; 4.2), тогда как при обработке живыми бактериями клетки пшеницы обеих линий погибали. В варианте с обработкой убитыми бактериальными клетками развития бактерий не наблюдалось, каллус на эксплантах формировался на уровне контроля без бактерий (выход каллусов составил 98,6-100%, а в контроле 97,9-99,4%) (Таблица 4.1). Достоверных различий между контролем и опытом, а также между генотипами не наблюдалось. На выход морфогенных каллусов обработка убитыми клетками бактерий повлияла положительно. Достоверно увеличился выход морфогенных каллусов у короткостебельной линии с геном *Rht-B1c*, обладающей повышенной морфогенной активностью по сравнению с сибом.

На среде для регенерации на морфогенных каллусах формировались растения-регенеранты с частотой от 12,65 до 36,8% (Таблица 4.2). При этом у высокорослой линии сиба выход регенерантов от числа морфогенных каллусов достоверно увеличивался по сравнению с контролем и линией LRht-B1c, тогда как у короткостебельной линии выход регенерантов достоверно снижался по сравнению с контролем. При пересчете на количество эксплантов отличия в регенерационной способности не достоверны.

Таблица 4.1 – Влияние бактериальных клеток *A. brasiliense* Sp7 (10^6 клеток/мл) на каллусогенез пшеницы сестринских линий LRht-B1c и LRht-B1a

Вариант	Генотип	Количе- ство экс- плантов	Выход каллу- сов,		Выход морфогенных каллусов,		
			шт.	%	шт.	% от экспл.	% от калл.
Контроль (без бак- терий)	LRht-B1c	540	526	99,4±0,6	84	15,6±3,1	16,0±3,2
	LRht-B1a	582	570	97,9±1,2	67	11,5±2,6	11,8±2,7
Живые клетки	LRht-B1c	200	0	0	-	-	-
	LRht-B1a	200	0	0	-	-	-
Клетки, убитые нагрева- нием	LRht-B1c	140	140	100	32	22,9±7,0	22,9±7,0
	LRht-B1a	140	138	98,6±2,0	19	13,6±5,7	13,8±5,8

Таблица 4.2 – Влияние бактериальных клеток *A. brasiliense* Sp7 (10^6 клеток/мл) на выход регенерантов в каллусах пшеницы сестринских линий LRht-B1c и LRht-B1a

Вариант	Генотип	Выход регенерантов,		
		шт.	% от эксплан- тов	% от морфогенных кал- лусов
Контроль (без бакте- рий)	LRht-B1c	25	4,63±1,78	29,8±9,8
	LRht-B1a	10	1,72±1,06	14,9±8,57
Прогретые клетки	LRht-B1c	4	2,86±2,78	12,5±11,5
	LRht-B1a	7	5,00±3,63	36,8±21,8

В литературе имеются данные как о негативном, так и об успешном применении живых бактерий для стимулирования морфогенетических процессов, в том числе в культуре соматических каллусов мягкой пшеницы отмечено положительное влияние инокуляции штаммами метилтрофных бактерий *Methylobacterium* sp. Д10, *Methylophilus glucoseoxidans* [21, 90] *Methylomonas methanica* S₁ [89]. Инокуляция приводила к повышению выхода морфогенных

каллусов от общего числа каллусов, стимулированию формирования побегов и сокращению сроков регенерации растений. Штамм *Methylobacterium mesophylicum* 3-345 с успехом применялся при инокуляции каллусов ячменя [74]. В то же время, бактерии *Azospirillum brasilense* были использованы для создания ассоциаций с растениями табака, африканского проса и газонной травы *Eremochloa ophiuroides* [591], а также пшеницы [51]. При этом наблюдалось угнетение роста каллусных культур и гибель растительных тканей.

Из проведенных исследований следует, что, вероятно, контакт клеток растений с живыми бактериальными клетками азоспирилл вызывает запуск фитоиммунных реакций, приводящих к их гибели и некрозу тканей (рис. 4.2). Негативную роль могут оказывать низкомолекулярные метаболиты, выделяемые каллусной тканью в ответ на инокуляцию бактериями. Даже краткосрочный контакт живых бактериальных клеток с клетками растений также ингибирует морфогенетические процессы в каллусной ткани. Поскольку рост инокулированных каллусов восстанавливался после их обработки антибиотиком, и отсутствовал ингибирующий эффект на формирование каллусов убитыми клетками *A. brasilense* sp7, следовательно, гибель каллусной ткани связана с жизнедеятельностью бактерий. Можно предположить, что каллусы по сравнению с растениями выделяют существенно больше экссудатов, которые утилизируются азоспириллами. Это приводит к увеличению бактериальных клеток вокруг каллусов. Большая микробная нагрузка вызывает в недифференцированных клетках растений чрезмерно сильный иммунный ответ, приводящий к гибели каллусов. Таким образом, азоспириллы не могут быть использованы для улучшения роста каллусной ткани пшеницы и повышения её морфогенной активности.

4.2 Изучение влияния липополисахаридов на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы *in vitro*

4.2.1 Изучение влияния липополисахаридов *Azospirillum baldaniorum* Sp245

Возможной заменой PGPR для культуры ткани растений могут стать макромолекулы поверхности бактериальных клеток, такие как, липополисахариды,

липотеихоевые кислоты, капсулные полисахариды, экзополисахариды, флагеллины, пилины и другие. ЛПС – сложные макромолекулы поверхности бактериальных клеток (Рисунок 4.4).

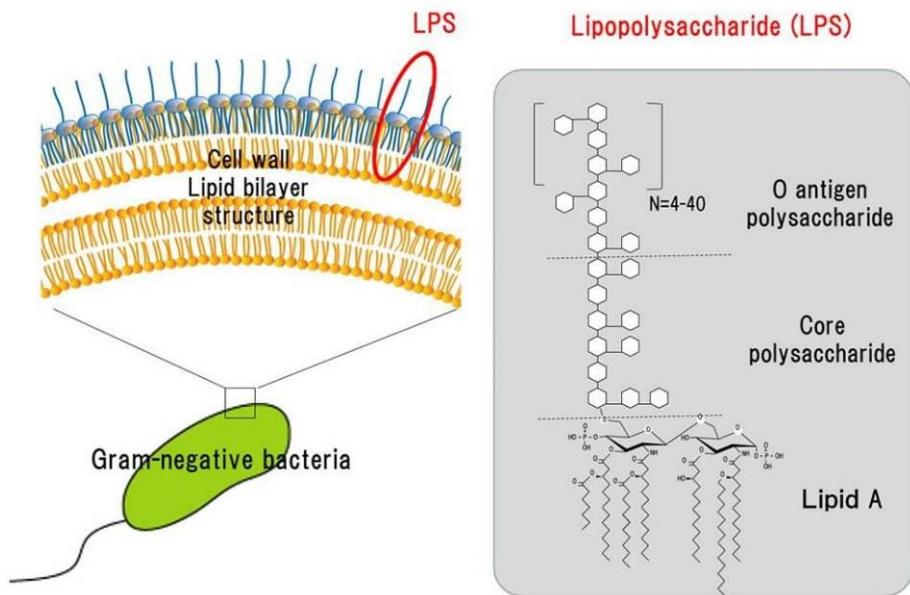


Рисунок 4.4 – Структура молекул липополисахаридов грамотрицательных бактерий (<https://www.macrophi.co.jp/english/lps/1-1.html>)

Ранее было установлено, что липополисахарид (ЛПС) наружной мембраны ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* является одним из активных компонентов бактерий, определяющим контактные взаимодействия с корнями растений и принимающим участие в процессах, индуцирующих ответные реакции растений на эти взаимодействия [224, 340]. Было показано, что ЛПС ряда бактерий оказывают положительное действие на рост и развитие растений сопоставимое с инокуляцией клеточной суспензией этих же рост-стимулирующих бактерий [224, 574, 575].

В данной работе впервые был изучен эффект ЛПС азоспирилл на формирование и морфогенез каллусов пшеницы. В течение трех лет (2009-2011 гг.) изучалось влияние ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 в трех концентрациях. Контролем служил вариант культивирования соматических тканей из незрелых 14-суточных зародышей мягкой пшеницы двух описанных выше линий на сре-

де Линсмайера-Скуга с 2 мг/л 2,4-Д. В опытных вариантах в стандартную индукционную питательную среду до автоклавирования вводили ЛПС, выделенный из наружной мембранны бактерий *A. baldaniorum* Sp245 методом Лейве с соавт. [406], в концентрации 1, 10 и 100 мкг/мл. В каждом варианте на питательную среду для каллусогенеза помещали не менее 100 зародышей.

Анализ каллусов на 30 сутки культивирования показал, что активный процесс дедифференциации и пролиферации соматических клеток незрелых зародышей наблюдался во всех вариантах опыта. Эффективность каллусогенеза была высокой, близкой к 100%, и не зависела от генотипа или наличия дополнительных компонентов в питательной среде (Таблица 4.3).

По данным некоторых авторов, косвенным показателем морфогенной активности каллусов может служить их масса [82]. Результаты проведенного исследования не подтвердили подобной закономерности (Таблица 4.3). Сырая масса морфогенных и неморфогенных каллусов во всех вариантах опыта достоверно не различалась и не зависела ни от генотипа линий, ни от содержания ЛПС в питательной среде. Данный морфометрический показатель, согласно полученным данным, не коррелирует с пролиферативной или морфогенетической активностью соматических клеток в каллусной ткани.

После 3 недель культивирования на каллусах наблюдалось появление очагов меристематической активности и зеленых зон регенерации, частично с растениями-регенерантами (Рисунок 4.5).

Установлено, что в контроле, в среднем за 3 года, частота формирования морфогенных каллусов составляла у обеих линий менее 20% от количества инокулированных эксплантов (Таблица 4.3). Введение в состав среды ЛПС в целом повышало активность морфогенетических процессов. Несмотря на некоторое варьирование по годам, статистически достоверное превышение выхода каллусов с очагами меристематической активности наблюдалось

Таблица 4.3 – Влияние ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 на морфогенез в культуре соматических тканей

Вариант среды	Генотип	Общий выход каллусов, % от эксплантов		Масса каллусов, мг		Выход морфогенных каллусов, % от эксплантов		Масса морфогенных каллусов, мг		Выход регенерантов, % от эксплантов	
		по вариан-там	в сред-нем по фактору B	по вариан-там	в сред-нем по фактору B	по вариан-там	в сред-нем по фактору B	по вариан-там	в сред-нем по фактору B	по вариан-там	в сред-нем по фактору B
Контроль	LRht-B1c	94,9	96,2	95,96	93,36	17,1 ab	15,6a	186,30	209,28	10,9 d	6,6a
	LRht-B1a	97,5		86,27		14,1 a		230,70		2,2 a	
ЛПС 1 мкг/мл	LRht-B1c	98,0	96,1	68,73	90,90	26,5 bc	26,6c	201,27	223,32	6,6 abcd	5,3a
	LRht-B1a	94,1		81,52		26,7 bc		212,90		4,0 ab	
ЛПС 10 мкг/мл	LRht-B1c	100,0	100,0	90,76	79,42	29,7 c	27,2c	232,27	213,80	8,4 bcd	6,3a
	LRht-B1a	100,0		95,54		24,6 bc		215,93		4,1 ab	
ЛПС 100 мкг/мл	LRht-B1c	95,4	97,7	90,11	81,47	26,1 bc	23,2b	226,33	218,10	10,8 cd	9,2b
	LRht-B1a	100,0		81,41		20,3 abc		223,30		7,5 bcd	
В сред-нем по фактору A	LRht-B1c	97,1		83,12		24,9		207,79		9,2	
	LRht-B1a	97,9		89,45		21,4		224,46		8,9	

Продолжение таблицы 4.3

$F_{факт.}$ (по вариантам)	0,539	0,947	3,838*	1,309	5,185*
$HCP_{0,05}$	-	-	8,6	-	4,3
$F_{факт.}$ (по фактору А)	1,818	0,936	1,649	2,911	3,096
$HCP_{0,05}$ A	-	-	-	-	-
$F_{факт.}$ (по фактору В)	0,736	1,102	4,421*	0,377	8,791*
$HCP_{0,05}$ B	-	-	6,1	-	3,0
$F_{факт.}$ (взаимодействие AB)	0,266	0,796	3,984*	1,708	2,274
$HCP_{0,05}$ AB	-	-	8,6	-	-

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{теор.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана; фактор А – генотип; фактор В – вариант среды.



Рисунок 4.5 – Морфогенные каллусы на 30 сутки культивирования у высоко-рослого сиба, несущего аллель *Rht-B1a* (а), и короткостебельной линии с алле-
лью *Rht-B1c* (б)

у короткостебельной линии, на среде при добавлении ЛПС в любой концентрации (Таблица 4.3). Обладающий меньшей морфогенетической компетентностью высокорослый аналог показал увеличение по сравнению с контролем выхода каллусов с зонами вторичной дифференциации в варианте с 1 и 10 мкг/мл ЛПС.

Кроме того, в каллусах исследуемых генотипов на 30 сутки культивирования проводили сравнительную оценку содержания молекулярного маркера меристематических клеток пшеницы – пролиферативного антигена инициалей (ПАИ) [7] методом твердофазного иммуноферментного анализа. Как было описано ранее (см. раздел 3.2), содержание ПАИ в каллусах коррелирует с их морфогенной способностью [7]. Результаты данных исследований показали, что в контрольных вариантах без добавления ЛПС линии достоверно и значительно различались между собой по содержанию ПАИ (Рисунок 4.6).

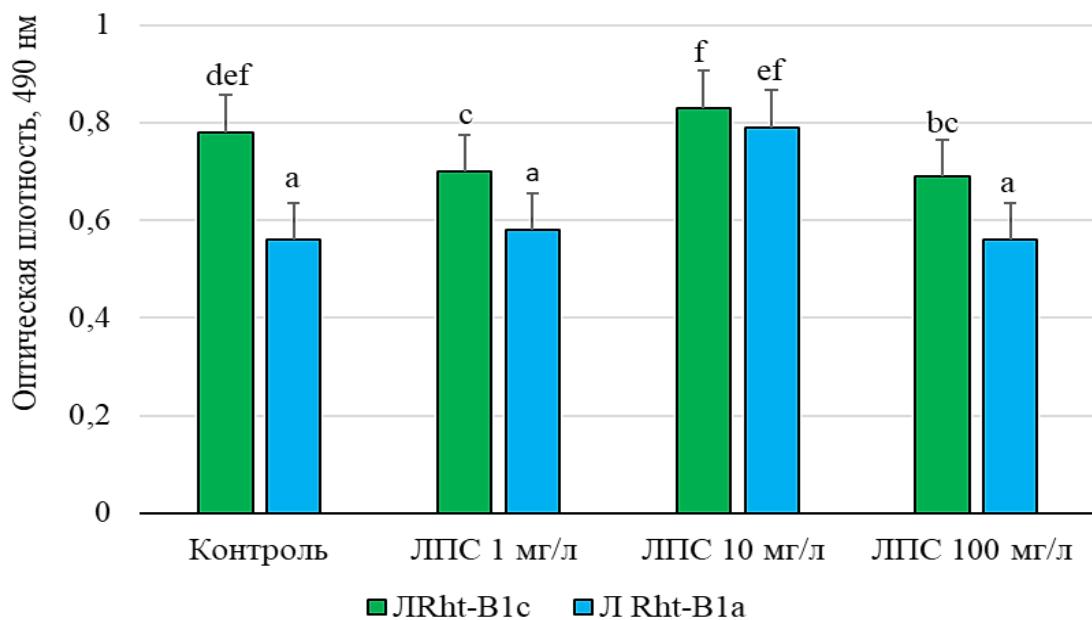


Рисунок 4.6 – Влияние ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 на сравнительное содержание ПАИ в каллусах на 30 сутки культивирования: LRHT-B1c – короткостебельная линия с аллелем *Rht-B1c*; LRht-B1a – высокорослая линия с аллелем *Rht-B1a* (сиб) (2012 г.). Буквами латинского алфавита обозначены результаты теста Дункана. Варианты опыта различаются на достоверном уровне если в обозначении отсутствуют одинаковые буквенные обозначения

В каллусах низкорослой линии содержание ПАИ почти в 1,4 раза превышало его содержание в высокорослом сибе. При добавлении в питательную среду ЛПС содержание ПАИ в каллусах высокорослого сиба увеличивалось и становилось практически равным его содержанию в каллусах низкорослой линии, обладающей высоким морфогенным потенциалом. Особенно ярко это проявилось в варианте с содержанием ЛПС в питательной среде 10 мкг/мл, когда различия между линиями стали статистически недостоверными. Во всех последующих экспериментах использовалась концентрация ЛПС 10 мкг/мл.

На выход растений-регенерантов большее влияние оказывал генотип экспланта (Таблица 4.3). Короткостебельная линия характеризовалась более высокой регенерационной способностью по сравнению со своей сестринской лини-

ей, что проявилось у контрольных растений. В опытных вариантах под влиянием ЛПС выход регенерантов у высокорослой линии увеличивался.

Кроме того, регенеранты высокорослой линии отличались увеличением длины побега и количества листьев (Рисунок 4.7). Корневая система формировалась во всех вариантах с одинаковой интенсивностью, а масса побега варьировала без видимой закономерности (Таблица 4.4).



Рисунок 4.7 – Растения-регенеранты линий LRht-B1c (а) и LRht-B1a(б)

4.2.2 Анатомо-морфологический анализ влияния липополисахаридов

Azospirillum baldaniorum Sp245

Параллельно проводилось анатомо-морфологическое описание культивируемых незрелых зародышей обеих линий и отбор объектов для гистологических исследований.

Таблица 4.4 – Влияние ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 на морфологические параметры растений-регенерантов

Вариант среды	Генотип	Количество побегов на каллусе, шт.		Длина побега, см		Количество листьев, шт.		Длина корня, см		Количество корней, шт.		Масса побега с корнями, мг	
		по вариан-там	в сред-нем по фак-тору В	по ва-риан-там	в сред-нем по фак-тору В	по ва-риан-там	в сред-нем по фак-тору В	по ва-риан-там	в сред-нем по фак-тору В	по ва-риан-там	в сред-нем по фак-тору В	по ва-риан-там	в сред-нем по фак-тору В
Контроль	ЛRht-B1c	2,4	2,4	1,0a	3,0	2,2a	4,5	1,9	1,5	3,8	5,4	303,2ab	326,4b
	ЛRht-B1a	2,3		4,9c		6,8bcd		1,0		7,0		349,5bc	
ЛПС 1 мгк/мл	ЛRht-B1c	2,0	2,3	3,4abc	4,1	2,6a	5,7	1,5	1,5	5,0	5,1	231,3a	261,2a
	ЛRht-B1a	2,5		4,8c		8,8d		1,4		5,2		291,0ab	
ЛПС 10 мкг/мл	ЛRht-B1c	2,0	2,6	2,0ab	3,1	3,1a	5,0	0,9	1,3	4,6	5,2	363,2bc	383,2c
	ЛRht-B1a	3,2		4,2bc		6,9cd		1,6		5,7		403,1c	
ЛПС 100 мкг/мл	ЛRht-B1c	2,4	2,3	4,1bc	4,2	2,4a	4,8	1,3	1,4	4,2	4,7	321,2b	319,7b
	ЛRht-B1a	2,2		4,2c		7,1cd		1,4		5,1		318,2b	
В среднем по факто- ру А	ЛRht-B1c	2,2			2,6a		2,6a		1,4		4,4a		304,7a
	ЛRht-B1a	2,6			4,5b		7,4b		1,4		5,8b		340,5b

Продолжение таблицы 4.4

$F_{\text{факт.}}$	0,883	3,965*	5,095*	1,722	1,840	5,111*
$HCP_{0,05}$	-	2,2	3,5	-	-	76,5
$F_{\text{факт. A}}$	1,923	14,926*	23,524*	0,149	5,310*	4,886*
$HCP_{0,05} A$	-	1,3	2,0	-	1,3	44,2
$F_{\text{факт. B}}$	0,293	1,128	0,481	0,259	0,081	10,265*
$HCP_{0,05} B$	-	-	-	-	-	54,1
$F_{\text{факт. AB}}$	0,954	1,322	0,494	3,972*	1,864	0,070
$HCP_{0,05} AB$	-	-	-	0,8	-	-

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{теор.}}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана; фактор А – генотип; фактор В – вариант среды.

На 7-е сутки культивирования анатомический анализ эксплантов показал, что важной особенностью состояния структурных элементов зародыша исследуемых линий в контрольном варианте являлось увеличение пролиферативной активности клеток и тканей узловой зоны первого листа, а также зоны перехода побег–корень, что хорошо просматривается на срезах тканей обеих линий (Рисунок 4.8). В основном каллусогенную активность проявляли клетки формирующихся проводящих пучков. Ткани верхней части колеоптиля и первого листового примордия ввиду дифференциации клеточных структур не проявляли меристематическую активность.

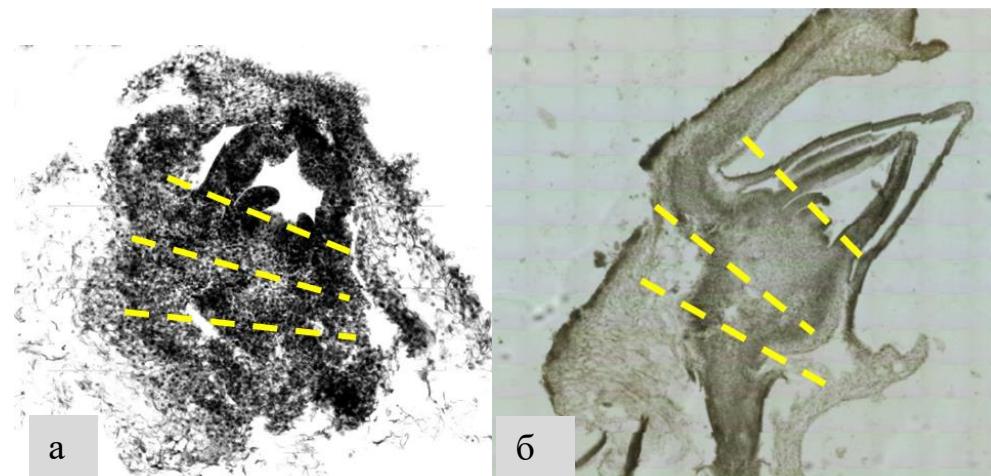


Рисунок 4.8 – Меристематическая активность тканей зародышей обеих линий пшеницы на 7-е сутки культивирования, контроль: а. – низкорослая линия; б. – высокорослая линия; – границы зон

Исследование фиксированных зародышей, помещённых в раствор глицерина (Рисунок 4.9), позволило установить местоположение зон меристематической активности в средней части жилок колеоптиля и первого листа. Это объясняется тем, что клетки проводящих пучков сохраняют меристематическую активность в зонах расположения интеркалярной меристемы, обеспечивая, таким образом, рост и развитие зародышевых структур. Не менее активны и клетки щитка.

Реакция паренхимных тканей изолированных зародышей исследуемой линии, находящихся в области узловой зоны перехода стебля в корень, колеоризы и

эпифлора, заключалась в гипертрофии клеток, что указывало на отсутствия меристематической активности. Факт растяжения клеточных стенок свидетельствовал о ауксиновой зависимости этого процесса. Причем данная ответная реакция типична для полиплоидных и дифференцированных клеток. Аналогичная реакция тканей наблюдалась и у высокорослой линии с аллелем гена *RhtB1*.

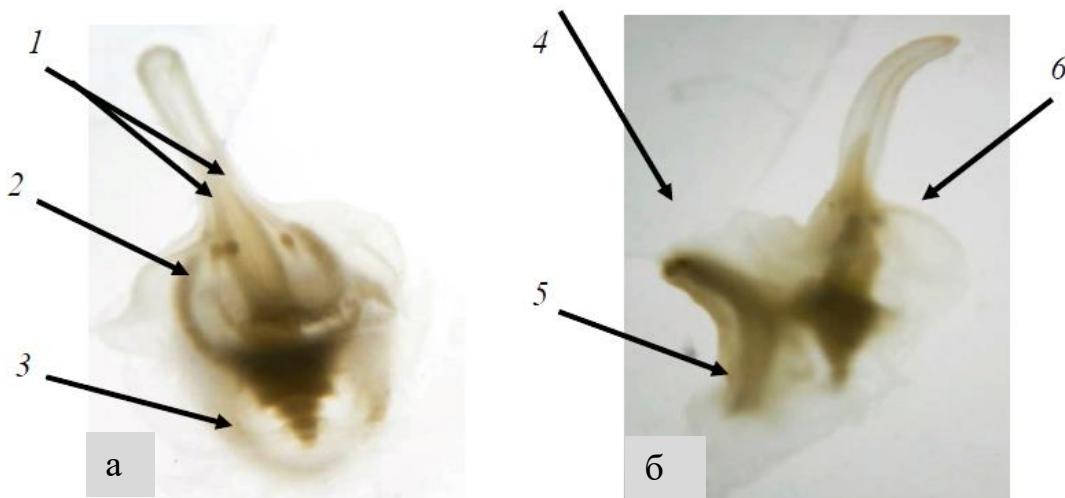


Рисунок 4.9 – Морфологическое состояние структурных компонентов зародыша низкорослой линии на 7-е сутки культивирования, контроль: 1 – промежуточные и 2 – большой проводящий пучок колеоптиля; 3 – колеориза; 4 – верхняя и 5 – нижняя часть щитка; 6 – эпифлора; а. – низкорослая линия; б. – высокорослая линия

Введение в питательную среду ЛПС оказывало положительное влияние на меристематическую активность клеток в узловой зоне первого листа, а также в зоне перехода побег-корень культивируемых в течение недели зародышей. Это обусловлено увеличением очагов или локусов меристематической активности в тех же самых зонах, что ранее наблюдались в контрольных вариантах исследуемых генотипов (Рисунок 4.10).

Пролиферация клеток в периферической части щитка зародышей продолжалась и на 15-е сутки культивирования, что обусловлено наличием в проводящих тканях меристематически активных клеток. При этом на основании анализа

плотности клеточных структур четко выделяются зоны с неравномерной пролиферацией. Так, на периферийных участках формировалась каллусная ткань, состоящая из конгломерата гипертрофированных клеток с большими межклеточными пространствами. Максимальной меристематической активностью обладали клетки, расположенные в зоне проводящих пучков.

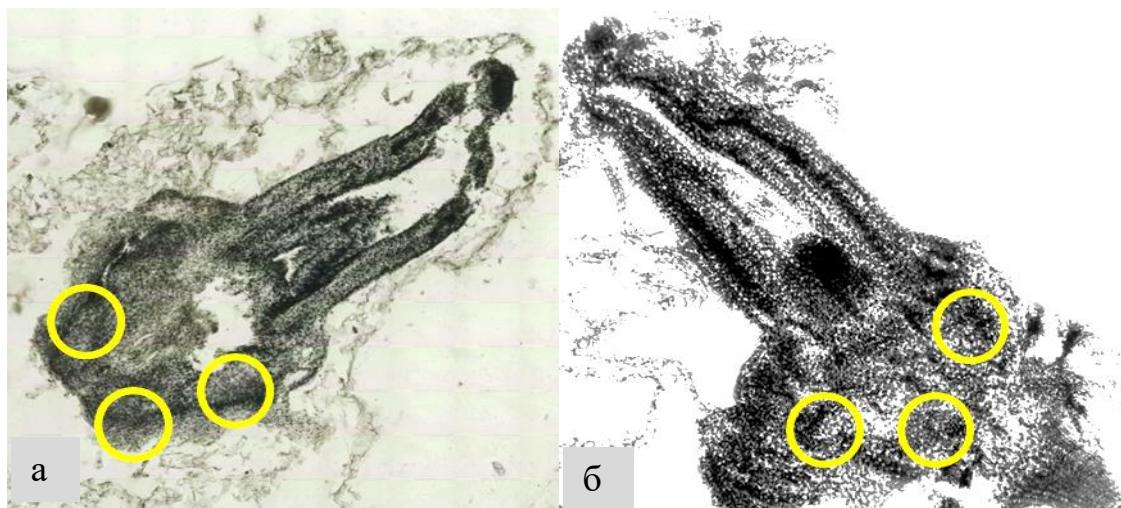


Рисунок 4.10 – Меристематическая активность недельных эксплантов опытных зародышей исследуемых линий пшеницы: а – низкорослая линия; б – высокорослая линия; О – меристематический локус

В результате неравномерного развития наружные клеточные структуры растягивались, а внутренние быстро переходили к дифференциации, что приводило к закручиванию тканей щитка (Рисунок 4.11 а). Подобный эффект был установлен и в контрольном варианте сестринского высокорослого сиба. Отличие состояло лишь в том, что у высокорослой линии было больше рыхлых каллусных клеток в области колеоризы (Рисунок 4.11 б).

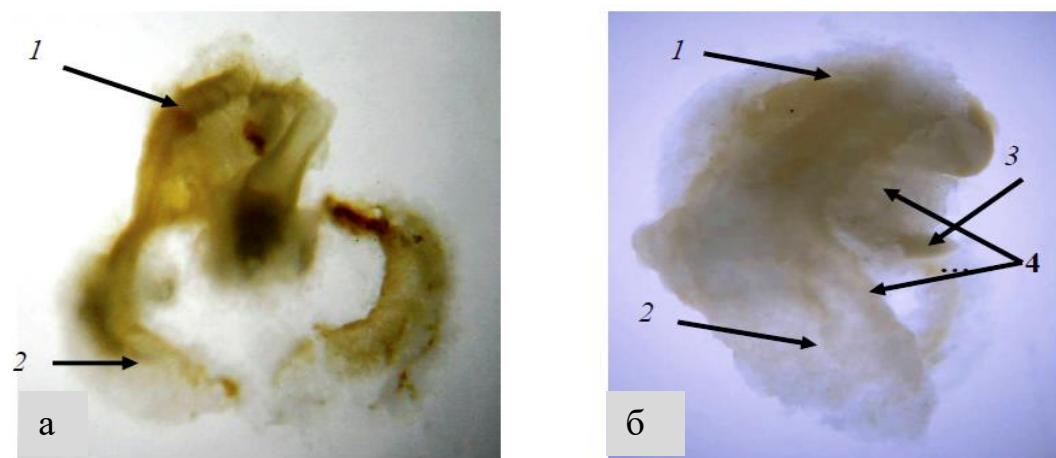


Рисунок 4.11 – Морфологическое состояние структурных компонентов целых зародышей исследуемых линий пшеницы на 15-е сутки культивирования, контроль: а – низкорослая линия; б – высокорослый сиб; 1 – верхняя часть щитка; 2 – нижняя часть щитка; 3 – главный корень; 4 – колеориза

Добавление ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 в питательную среду приводило к удлинению колеоптиля и первого листа изолированных зародышей, независимо от генотипа. Причем у низкорослой линии колеоптиль увеличивался в размере, но при этом утрачивал пространственную ориентацию, выражавшуюся в его закручивании. Потеря пространственной ориентации колеоптилем линии высокорослой пшеницы была менее заметна, хотя и в этом случае не наблюдалось сохранение абсолютной ориентации полярности. В зоне щитка происходило уплотнение клеток, однако четких различий в закладке эмбриогенных структур не обнаруживалось (Рисунок 4.12).

На 21-е сутки культивирования изолированных зародышей в области щитка и отходящих от него тяжей в контрольном варианте обеих линий наблюдался соматический эмбриогенез, в результате которого образовались зародышеподобные структуры, напоминающие аналогичные структуры, сформированные при нормальном зиготическом эмбриогенезе. Единственным отличием их являлось то, что образовавшиеся эмбриоиды имели почечную организацию, т.е. не формировали корней (Рисунок 4.11 а1, б1).

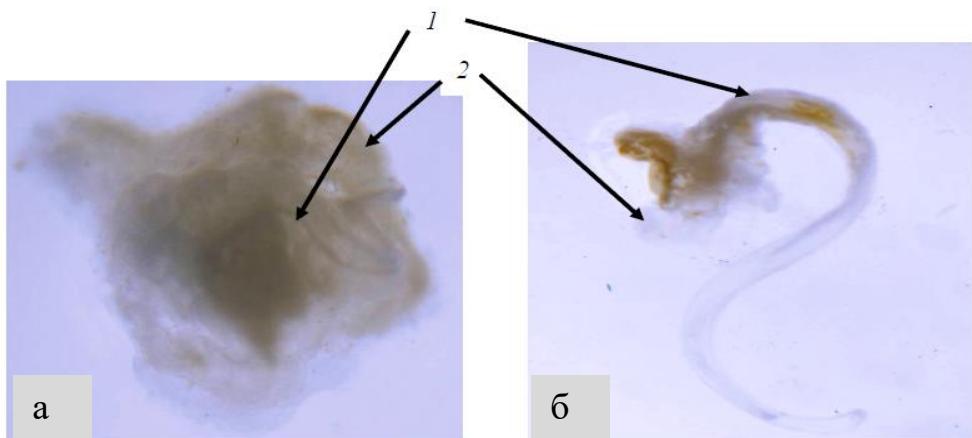


Рисунок 4.12 – Морфологическое состояние структурных компонентов зародышей обеих линий пшеницы на 15-е сутки культивирования, опыт: а – низкорослая линия; б – высокорослый сиб; 1 – колеоптиль; 2 – щиток

В вариантах с добавлением в питательную среду ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 также не происходил ризогенез. Однако зародышеподобных структур в опытном варианте было много, но они имели меньшие размеры. При этом четко выделялись две области их массового возникновения – зона щитка и сближенных узлов (Рисунок 4.13 а2, б2).

Анатомо-гистологическими методами подтверждено, что наличие ЛПС в питательной среде приводило к заметному повышению морфогенного потенциала соматических клеток на 21-е сутки культивирования двухнедельных зародышей. ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 стимулировал увеличение очагов меристематической активности в узловой зоне первого листа, а также в зоне перехода побег–корень зародышей исследуемых генотипов. Наибольшей физиологической активностью в отношении каллусных клеток пшеницы обладал ЛПС в концентрации 10 мг/л.

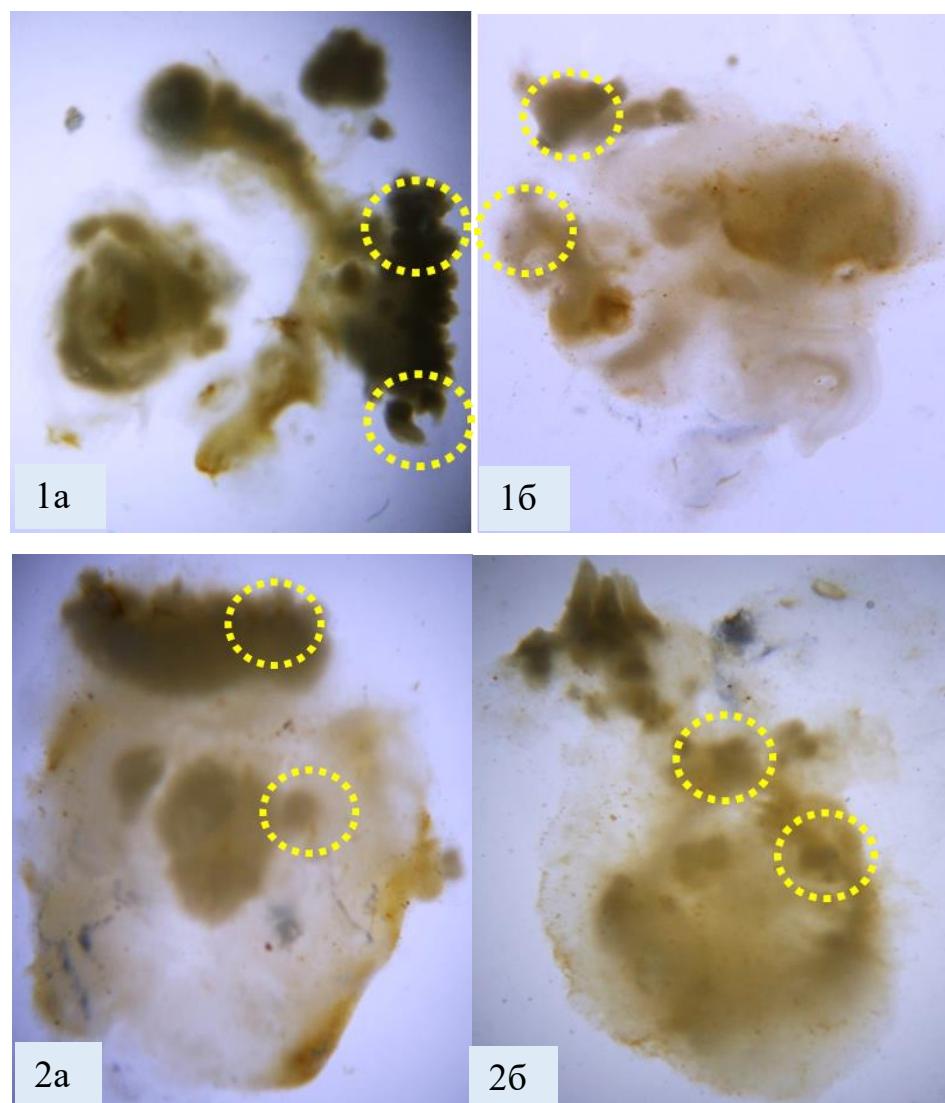


Рисунок 4.13 – Морфологическое состояние структурных компонентов целых зародышей исследуемых линий пшеницы на 21 день культивирования, контроль: 1. – контроль; 2. – ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 10 мг/л; а – низкорослая линия; б – высокорослый сиб; О – эмбриоиды

4.2.3 Сравнительное изучение влияния липополисахаридов *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Escherichia coli* K12

Для установления роли структуры ЛПС были проведены исследования роли О-антигена, как наиболее гетерогенной части ЛПС, в стимулировании морфогенеза в культуре соматических каллусов пшеницы. О-антител – важная наружная часть ЛПС, экспонированная во внешнюю среду. Он представляет собой полисахарид, состоящий из повторяющихся олигосахаридных звеньев из 1 – 8 остатков

сахаров [516]. Вариации остатков сахаров, последовательности их соединения, тип связи между соседними остатками, наличие или отсутствие заместителей приводят к огромному разнообразию О-антител в разных штаммах грамотрицательных бактерий. Поскольку О-антител экспонирован наружу и содержит большое число хиральных атомов углерода, он является основной антигенной детерминантой клетки. Для изучения роли О-антитела был использован лабораторный штамм *Escherichia coli* K-12, который в отличии от ЛПС *A. baldaniorum* Sp245, не содержит О-антитела за счет мутации в гене рамнозилтрансферазы [569].

В 2012-2013 гг. были проведены эксперименты, в которых в опытных вариантах в стандартную среду вводили ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 и энтеробактерий штамма *E. coli* K12 в концентрации 10 мкг/мл. Контролем служила стандартная среда Линсмайера-Скуга с 2,4-Д 2 мг/л. В каждом варианте на питательную среду для каллусогенеза помещали по 100 зародышей.

Анализ каллусов на 30 сутки культивирования показал, что активный процесс дедифференциации и пролиферации соматических клеток незрелых зародышей наблюдался во всех вариантах опыта. Эффективность каллусогенеза была высокой, близкой к 100%, и не зависела от генотипа или наличия дополнительных компонентов в питательной среде (Таблица 4.5).

После 30 суток культивирования на морфогенных каллусах наблюдалось появление очагов меристематической активности и зеленых зон регенерации. При этом в контрольных вариантах, по средним данным за 2 года, частота формирования морфогенных каллусов составляла у обеих линий менее 20% от количества обработанных ЛПС эксплантов (Таблица 4.5).

Введение в состав среды ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 повышало активность морфогенетических процессов. Статистически достоверное превышение выхода каллусов с очагами меристематической активности наблюдалось у короткостебельной линии при добавлении ЛПС азоспирилл в питательную среду более чем на 10 % (Таблица 4.5).

Обладающий меньшей морфогенетической компетентностью высокорослый аналог под действием ЛПС азоспирилл также показал увеличение по сравнению с

контролем выхода каллусов с зонами вторичной дифференциации на 8 %. В то же время ЛПС энтеробактерий *E. coli* K12 не оказывал влияния на способность соматических каллусов к вторичной дифференциации меристематических очагов ни у одного из исследуемых генотипов (Таблица 4.5).

Таблица 4.5 – Влияние бактериальных ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 и *Escherichia coli* K12 на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы

Вариант среды	Генотип	Общий выход каллусов, % от эксплантов		Выход морфогенных каллусов, % от эксплантов		Выход регенерантов, % от эксплантов	
		по вариантам	в среднем по фактору В	по вариантам	в среднем по фактору В	по вариантам	в среднем по фактору В
Контроль	LRht-B1c	96,45	96,85	15,36 b	13,34ab	6,20 bc	4,45a
	LRht-B1a	97,25		11,32 ab		2,69 a	
<i>ЛПС A. baldaniorum</i> Sp245	LRht-B1c	99,50	99,75	25,48 d	22,83c	8,89 c	7,06b
	LRht-B1a	100,00		19,86 c		5,22 ab	
<i>ЛПС E. coli</i> K12	LRht-B1c	100,00	100,0	11,66 ab	10,83a	4,12 ab	3,81a
	LRht-B1a	100,00		10,00 a		3,50 ab	
в среднем по фактору А	LRht-B1c	98,65a		17,5b		6,40b	
	LRht-B1a	99,08b		13,7a		3,66a	
$F_{\text{факт.}}$ по вариантам		4,852		25,228*		8,151*	
$HCP_{0,05}$ по вариантам		-		4,35		2,84	
$F_{\text{факт.}}$ по фактору А		11,709*		54,244*		9,652*	
$HCP_{0,05}$ по фактору А		1,860		3,08		2,01	
$F_{\text{факт.}}$ по фактору В		0,532		14,899*		16,635*	
$HCP_{0,05}$ по фактору В		-		2,51		1,64	
$F_{\text{факт.}}$ взаим. факторов AB		0,156		1,377		2,407	
$HCP_{0,05}$ взаим. факторов AB		-		-		-	

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{неоп.}}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана; фактор А – генотип; фактор В – вариант среды.

На выход растений-регенерантов существенное влияние оказывал также генотип экспланта (Таблица 4.5). Короткостебельная линия характеризовалась более высокой регенерационной способностью по сравнению со своей сестринской линией, что проявлялось у контрольных растений. При действии ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 выход регенерантов у слабоэмбриогенной линии LRht-B1a увеличивался почти в 2,5 раза по сравнению с контролем. Выход регенерантов у низкорослой высокоэмбриогенной линии также увеличивался под действием ЛПС азоспирилл, но на менее значительную величину. В отличие от ЛПС азоспирилл, ЛПС энтеробактерий *E. coli* K12 оказывал незначительное влияние на выход регенерантов у высокорослой линии и даже несколько снижал этот показатель у короткостебельной линии (Таблица 4.5). Регенеранты высокорослой линии отличались увеличением длины побега в контрольном варианте при анализе по вариантам, а также в целом по фактору влияния генотипа.

В результате проведения экспериментов было установлено, что ЛПС ассоциативных бактерий *A. baldaniorum* Sp245 стимулирует процессы вторичной дифференциации и регенерационную способность каллусных клеток пшеницы, повышая тем самым эффективность культивирования генотипов с низким морфогенным потенциалом.

В то же время ЛПС энтеробактерий *E. coli* K12 не оказывал влияния на способность соматических каллусов к вторичной дифференциации меристематических очагов у исследуемых генотипов. Показатели выхода морфогенных каллусов и растений-регенерантов при действии данного ЛПС не отличались от контрольных вариантов. Эти результаты согласуются с данными, полученными ранее при воздействии ЛПС азоспирилл и энтеробактерий на корневую систему проростков пшеницы в экспериментах *in vivo*, где установлено, соответственно, положительное влияние ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 и нейтральное – *E. coli* K12 на функциональную активность клеток корневых меристем пшеницы [224].

Следует отметить, что все исследованные к настоящему моменту (с точки зрения структуры поверхностных гликополимеров) штаммы азоспирилл имеют S-формы ЛПС, т.е. содержат О-специфический полисахарид (О-ПС) с той или иной

длиной полисахаридной цепи [470]. Кроме того, в доступной литературе нет сведений о получении спонтанных или индуцированных мутантов азоспирилл, утративших О-ПС (возможно, вследствие летального характера таких мутаций). Поэтому в данной работе не представлялось возможным воздействовать в контрольных экспериментах ЛПС без О-специфического полисахарида, выделенный из дикого штамма или мутанта азоспирилл. Для сравнительного исследования влияния ЛПС на морфогенез каллусов пшеницы был использован модельный штамм непатогенных энтеробактерий *E. coli* K-12, ЛПС которого не содержит О-ПС в своем составе [549], но включает олигосахаридную коровую область и липид A. Известно, что структура липида A *E. coli* рассматривается в качестве канонической структуры для ЛПС всех грамотрицательных бактерий. При этом именно эта часть ЛПС, как полагают, обладает митогенным действием на эукариотические клетки [601]. В данных экспериментах активный процесс пролиферации наблюдался во всех вариантах опыта, что указывает на одинаковую функцию липида A в ЛПС энтеробактерий и азоспирилл.

Однако, отсутствие положительного влияния ЛПС *E. coli* K-12 на вторичную дифференацию и регенерационную способность каллусных клеток пшеницы позволил предположить, что этот эффект может определяться именно полисахаридной частью молекулы ЛПС.

Возможно, ЛПС азоспирилл взаимодействует с распознающими рецепторами растительных клеток, такими, как специфические лектины или рецептор-подобные киназы [521], или некие гормональные рецепторы, локализованные на поверхности растительных клеток. Такое взаимодействие активирует передачу сигнала в ядро, что приводит к репрограммированию генома в направлении создания условий для реализации клетками их морфогенетического потенциала [654].

Учитывая, что влияние ЛПС в некоторых случаях аналогично действию целых бактериальных клеток [224, 340, 369], представляется вероятным, что он может воздействовать, в частности, на активность ИУК-оксидаз в растениях, как это было установлено в случае *Bacillus subtilis* [368], и тем самым влиять на соотно-

шение ауксинов и цитокининов в растительных клетках, определяющее в свою очередь ход реализации клетками морфогенетической программы развития. Кроме того, ЛПС может активизировать сигнальные молекулы защитных реакций растения, таких как эндохитиназы, которые являются инициаторами делений меристематического типа [532].

4.2.4 Изучение влияния липополисахаридов бактерий рода *Azospirillum*

Было проведено изучение влияния ЛПС *A. brasiliense* Sp7 в концентрации 10 мг/л на морфогенез в культуре соматических тканей изучаемых линий мягкой пшеницы. Было установлено, что к 30 суткам культивирования общий выход каллусов в контрольном варианте и на питательной среде, содержащей ЛПС *A. brasiliense* Sp7, был близок к 100% (Таблица 4.6). Достоверных различий между вариантами опыта по способности к формированию каллусов из эксплантов не установлено.

На формирование морфогенных каллусов также не установлено достоверного влияния ЛПС *A. brasiliense* Sp7 у линий пшеницы: варианты опыта не отличались от контроля (Таблица 4.6)

Таблица 4.6 – Влияние ЛПС *A. brasiliense* Sp7 на каллусогенез в культуре соматических тканей линий мягкой пшеницы LRht-B1c and LRht-B1a

Вариант среды	Генотип	Коли-чество эксплан-тов, шт.	Выход каллу-сов		Выход морфогенных кал-лусов		
			шт.	%	шт.	% от экспл.	% от калл.
Контроль	LRht-B1c	740	725	98,0±1,2	103	13,9±2,5	14,2±2,6
	LRht-B1a	782	768	98,2±0,9	77	9,85±2,1	10,0±2,1
ЛПС <i>A. brasiliense</i> Sp7	LRht-B1c	200	200	100	26	13,0±4,7	13,0±4,7
	LRht-B1a	200	199	99,5±1,0	24	12,0±4,5	12,1±4,6

На этапе регенерации наблюдалось увеличение регенерационной способности относительно количества эксплантов и морфогенных каллусов у линии LRht-B1a по сравнению с контролем, а также у линии LRht-B1c относительно количества морфогенных каллусов (Таблица 4.7).

Действие ЛПС штамма *A. brasiliense* Sp7 на каллусы пшеницы отличалось от ранее описанного действия ЛПС штамма *A. baldaniorum* Sp245. ЛПС штамма Sp245, в отличие от ЛПС штамма Sp7, существенно повышал выход морфогенных каллусов обеих линий пшеницы (как показано выше). В то время как итоговый выход растений регенерантов линий LRht-B1c and LRht-B1a для ЛПС обоих штаммов был примерно одинаков.

Таблица 4.7 – Влияние ЛПС *A. brasiliense* Sp7 на выход регенерантов от эксплантов в культуре соматических тканей линий мягкой пшеницы LRht-B1c и LRht-B1a

Вариант среды	Генотип	Выход регенерантов		
		шт.	% от эксплантов	% от морфогенных каллусов
Контроль	LRht-B1c	32	4,32±1,47	31,1±9,1
	LRht-B1a	14	1,79±0,93	18,2±8,8
ЛПС <i>A. brasiliense</i> Sp7	LRht-B1c	14	7,00±3,56	53,9±20,1*
	LRht-B1a	11	5,50±3,18*	45,8±21,0*

Примечание – “*” различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $t \geq t_{0,05}$.

Аналогичная проверка эффективности влияния на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы была проведена для ЛПС штамма *Azospirillum* sp. SR66. Эффективность каллусогенеза во всех вариантах опыта составляла 100% (Таблица 4.8). В отличии от влияния ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 и *A. brasiliense* Sp7, под влиянием ЛПС *Azospirillum* sp. SR66 снижался выход морфогенных каллусов, что было зафиксировано на достоверном уровне у линии LRht-B1c. При

этом достоверные различия между линиями по данному показателю, обнаруженные в контрольном варианте, в опытном варианте нивелировались.

На этапе регенерации наблюдалось существенное увеличение регенерационной способности морфогенных каллусов у короткостебельной линии (Таблица 4.9). Различий между линиями в вариантах опыта не отмечалось.

Таким образом, ЛПС, выделенные из разных штаммов рост-стимулирующих бактерий рода *Azospirillum*, оказывают различное действие на морфогенез и регенерацию культуры ткани пшеницы, что может быть обусловлено как разным строением О- полисахарида [574], так и другими особенностями структуры этих ЛПС.

Таблица 4.8 – Влияние ЛПС *Azospirillum* sp. SR66 на каллусогенез в культуре соматических тканей линий мягкой пшеницы LRht-B1c and LRht-B1a

Вариант среды	Генотип	Количество эксплантов, шт.	Выход каллусов		Выход морфогенных каллусов		
			шт.	%	шт.	% от экспл.	% от калл.
Контроль	LRht-B1c	180	180	100	42	23,3±6,22	23,3±6,22
	LRht-B1a	200	200	100	25	12,5±4,61**	12,5±4,61**
ЛПС <i>Azospirillum</i> sp. SR66	LRht-B1c	200	200	100	22	11,0±4,36*	11,0±4,36*
	LRht-B1a	200	200	100	16	8,0±3,78	8,0±3,78

Примечание – Различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $t \geq t_{0,05}$; “*” сравнение с контролем; “**” сравнение линий между собой в варианте опыта.

Таблица 4.9 – Влияние ЛПС *Azospirillum* sp. SR66 на выход регенерантов от эксплантов в культуре соматических тканей линий мягкой пшеницы LRht-B1c and LRht-B1a

Вариант среды	Генотип	Выход регенерантов		
		шт.	% от эксплан- тов	% от морфогенных каллусов
Контроль	LRht-B1c	28	15,6±5,33	66,7±14,69
	LRht-B1a	18	9,0±3,99	72,0±18,53
ЛПС <i>Azospirillum</i> sp. SR66	LRht-B1c	20	10,0±4,18	90,9±12,75*
	LRht-B1a	12	6,0±3,31	75,0±23,07

Примечание – Различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $t \geq t_{0,05}$. «*» сравнение с контролем.

В 2018-2019 гг. для уточнения влияния полисахаридной части молекулы ЛПС было проведено сравнение действия препаратов ЛПС, выделенных из клеток трёх штаммов рода *Azospirillim* (*A. brasiliense* SR55, SR75 и *A. lipoferum* SR65), различающихся по химической структуре повторяющихся звеньев их О-полисахаридов [575], а также по серологическим и физико-химическим свойствам. Данные штаммы относятся к трем разным серогруппам: *A. brasiliense* SR75 (серогруппа I), *A. brasiliense* SR55 (серогруппа II), и *A. lipoferum* SR65 (серогруппа III). Их О-полисахариды имеют различающиеся химическое строение повторяющихся звеньев (Рисунок 4.14).

Выбор штаммов был обусловлен присутствием в их О-полисахаридах только по одному варианту повторяющихся звеньев (Рисунок 4.14), в отличие от большинства штаммов *Azospirillum* spp., О-полисахариды которых имеют гетерогенный состав [575]. Определение содержания углеводов в препаратах ЛПС, размера и дзета-потенциала мицелл, формирующихся из молекул ЛПС в водных средах, выявило индивидуальные характеристики каждого из трёх исследованных ЛПС (Таблица 4.10).

- a** →2)- β -D-Rhap-(1→3)- α -D-Rhap-(1→3)- α -D-Rhap-(1→2)- α -D-Rhap-(1→2)- α -D-Rhap-(1→
- b** →3)- β -L-Rhap-(1→4)- α -L-Rhap-(1→3)- α -D-Galp-(1→3)- β -L-Rhap-(1→4)- β -L-Rhap3OMe-(1→4)- α -L-Rhap-(1→3)- α -D-Galp-(1→ α-D-GlcA-(1|2
- c** →2)- α -L-Rhap-(1→3)- α -L-Rhap-(1→3)- α -L-Rhap-(1→ β-D-Glc -(1|3

Рисунок 4.14 – Структуры повторяющихся единиц липополисахаридов, используемых штаммов: а – *Azospirillum brasiliense* SR75 (серогруппа I) – гомополисахарид пента-D-рамнан [225]; б – *A. brasiliense* SR55 (серогруппа II) – гетероолигосахарид, содержащий один остаток L-акофриозы, два остатка D-галактозы, четыре остатка L-рамнозы и один остаток D-глюкуроновой кислоты [573]; в – *A. lipoferum* SR65 (серогруппа III) – глюко-L-рамнан, содержащий один остаток D-глюкозы и три остатка L-рамнозы [572]

Таблица 4.10 – Физико-химические свойства мицелл ЛПС четырех штаммов *Azospirillum* spp.

Липополисахариды	Массовая доля карбогидратов, %	Диаметр мицелл, нм	Дзета- потенциал мицелл, мВ
ЛПС <i>A. brasiliense</i> SR75	64,9b	30,7b	20,5c
ЛПС <i>A. brasiliense</i> SR55	37,2a	22,9a	22,0d
ЛПС <i>A. lipoferum</i> SR65	35,0a	23,2a	17,5a
ЛПС <i>A. baldaniorum</i> Sp245	80,3c	26,0ab	18,9b

Примечание – Различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $t \geq t_{0,05}$. “*”
сравнение с контролем.

ЛПС штамма *A. brasiliense* SR75 имеет умеренное содержание углеводов и формирует мицеллы диаметром 31 нм со средним дзета-потенциалом. ЛПС штаммов *A. brasiliense* SR55 и *A. lipoferum* SR65 имеют низкую массовую долю углеводов и их мицеллы в водной среде более мелкие, но дзета-потенциалы мицелл существенно различаются. Поверхностный заряд мицелл ЛПС *A. brasiliense* SR55 наиболее отрицательный, что связано с присутствием остатков глюкуроновой кислоты в О-полисахариде. Мицеллы ЛПС штамма *A. lipoferum* SR65, наоборот, имеют наименее отрицательный дзета-потенциал.

Экспланты пшеницы линий LRht-B1c и LRht-B1a культивировали на среде, содержащей ЛПС бактерий *Azospirillum* spp. в концентрации 10 мг/л, для формирования каллусов и в контрольном варианте без ЛПС. На 30-ый день культивирование было подсчитано, какая доля эксплантов сформировала каллусы, и в какой доли каллусов были выявлены признаки дифференциации меристематической ткани (морфогенеза). Выявлено достоверное повышение выхода каллусов из эксплантов обеих линий пшеницы при действии ЛПС штаммов *A. brasiliense* SR55 и *A. lipoferum* SR65 (Таблица 4.11) относительно соответствующих контрольных вариантов (каллусы линий LRht-B1c и LRht-B1a получены без воздействия ЛПС).

Таблица 4.11 – Влияние ЛПС *A. brasiliense* SR75, SR55, *A. lipoferum* SR65 на общий выход каллусов в культуре соматических тканей пшеницы

Генотип	LRht-B1c		LRht-B1a	
Вариант	Количество эксплантов, шт.	Выход каллусов, %	Количество эксплантов, шт.	Выход каллусов, %
Контроль	1025	98,4±0,76	1022	97,7±0,93
ЛПС <i>A. brasiliense</i> SR75	200	99,5±0,98	200	99,0±1,39
ЛПС <i>A. brasiliense</i> SR55	153	100*	171	100*
ЛПС <i>A. lipoferum</i> SR65	345	100*	351	99,7±0,56*

Примечание – Различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $t \geq t_{0,05}$. «*» сравнение с контролем.

Достоверных различий между генотипами LRht-B1c и LRht-B1a в парах вариантов не выявлено (Рисунок 4.15, 4.16).

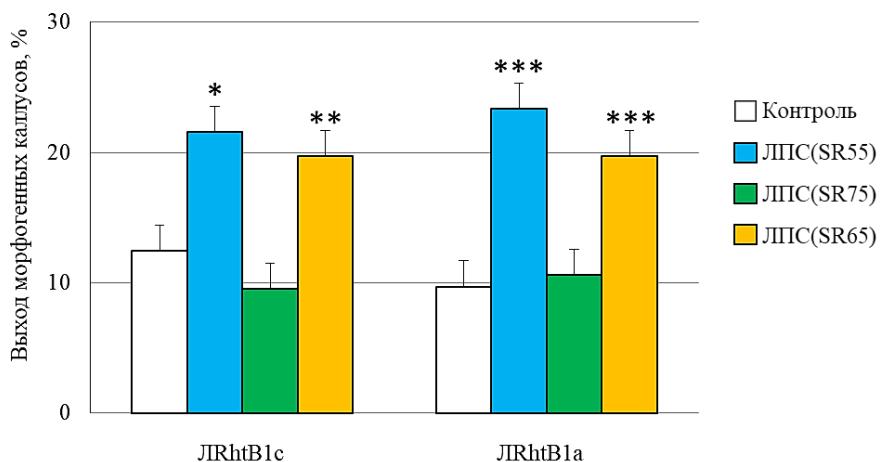


Рисунок 4.15 – Выход морфогенных каллусов линий LRht-B1c и LRht-B1a при культивировании на среде, содержащей ЛПС штаммов *A. brasiliense* SR75, *A. brasiliense* SR55, and *A. lipoferum* SR65 (2018-2019 гг.). Различия между контрольными вариантами (без воздействия ЛПС) двух генотипов каллусов пшеницы достоверны при $P=0,05$; $t=1,98 > t_{0,05} = 1,97$. Звездочками обозначены существенные различия между каллусами, полученными на среде с ЛПС, и контролем: * – при $P = 0,05$; ** – при $P = 0,01$; *** – при $P = 0,001$

Выход морфогенных каллусов повышался в присутствии ЛПС штаммов *A. brasiliense* SR55 и *A. lipoferum* SR65 в 1,7- и 1,6 раз, соответственно, для LRht-B1c и в 2,4 и 2,0 раза, соответственно, для LRht-B1a. При культивировании эксплантов на среде, содержащей ЛПС *A. brasiliense* SR75, выход каллусов и выход морфогенных каллусов не отличались (при $P = 0.05$) от контрольных вариантов обеих линий пшеницы.

После переноса морфогенных каллусов на среду Линсмайера-Скуга для регенерации, не содержащую ЛПС, наблюдали достоверное повышение выхода растений-регенерантов низкоморфогенной линии LRht-B1a в 2,6 раза в варианте с использованием в инициальной среде ЛПС *A. brasiliense* SR75 и в 1,8 раза в варианте с использованием ЛПС *A. lipoferum* SR65 (Таблица 4.12).

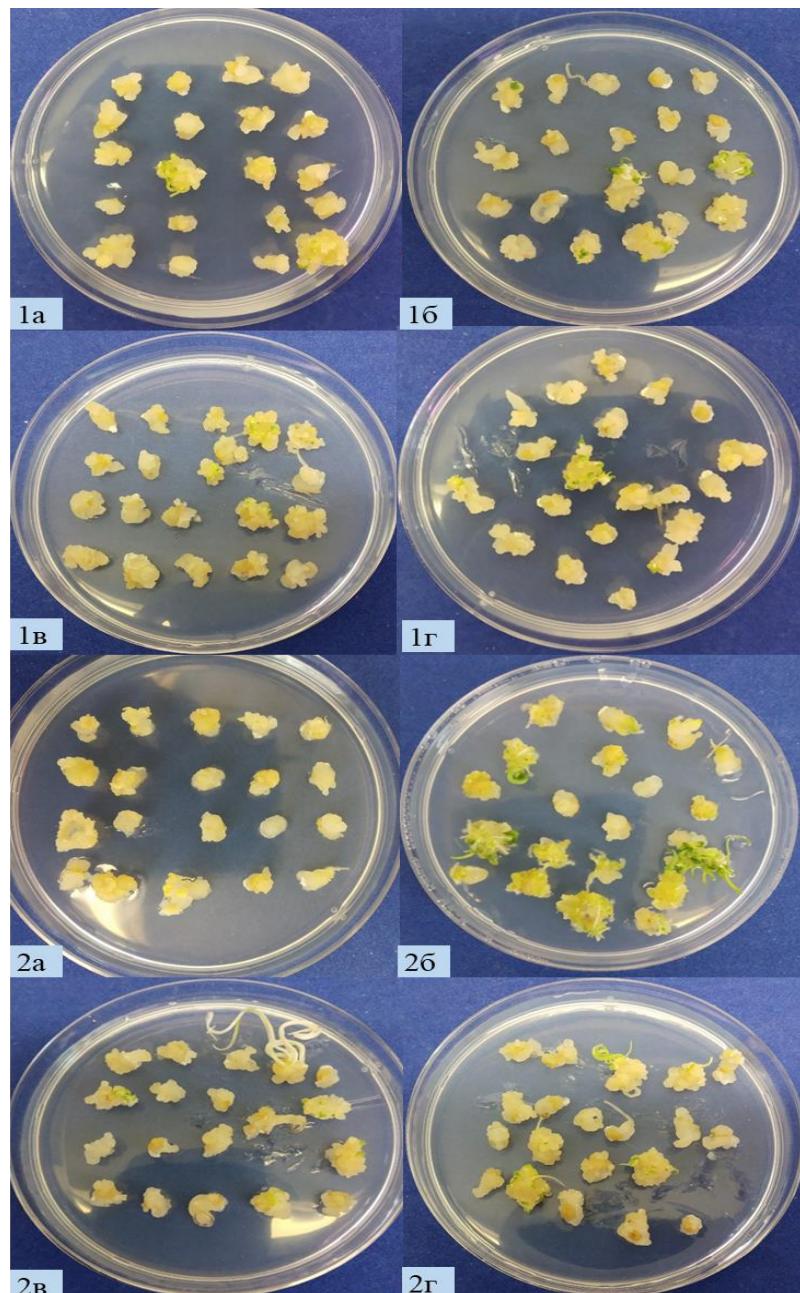


Рисунок 4.16 – Морфогенные каллусы линий LRht-B1c (1) и LRht-B1a (2) при культивировании в контроле (а) и на среде, содержащей ЛПС штаммов *A. brasiliense* SR75 (б), *A. brasiliense* SR55 (в) и *A. lipoferum* SR65 (г)

ЛПС *A. brasiliense* SR55 не оказывал достоверного действия на регенерацию из морфогенных каллусов линии LRht-B1a. Выход растений-регенерантов из морфогенных каллусов линии более высокоморфогенной линии LRht-B1c ни в одном из вариантов обработки ЛПС достоверно не изменялся относительно контрольного варианта.

Таблица 4.12 – Влияние ЛПС штаммов *A. brasiliense* SR75, *A. lipoferum* SR65 на выход регенерантов из морфогенных каллусов в культуре соматических тканей пшеницы

Генотип	LRht-B1c		LRht-B1a	
Вариант	Количество морфогенных каллусов, шт.	Выход регенерантов, %	Количество морфогенных каллусов, шт.	Выход регенерантов, %
Контроль	126	30,2±8,09	97	16,5±7,48
ЛПС <i>A. brasiliense</i> SR75	19	26,3±21,14	21	42,9±22,46
ЛПС <i>A. brasiliense</i> SR55	33	30,3±16,28*	40	20,0±12,78
ЛПС <i>A. lipoferum</i> SR65	67	41,8±12,03*	69	30,4±11,05

Примечание – Различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $t \geq t_{0,05}$. “**” сравнение с контролем.

Таким образом, по сумме проведенных исследований было выявлено достоверное повышение выхода растений-регенерантов из полученных на первом этапе каллусов линий LRht-B1c и LRht-B1a при действии ЛПС *A. lipoferum* SR65 в 2,15- и 3,75 раза ($P = 0,05$) относительно контрольных вариантов, соответственно (Таблица 4.13).

Положительное действие ЛПС штаммов *A. brasiliense* SR55 и SR75 на итоговый выход растений-регенерантов из каллусов было обнаружен только по отношению к низкоморфогенной линии LRht-B1a ($P = 0,1$). При этом, следует отметить, что итоговые выходы растений-регенерантов линии LRht-B1a для всех вариантов с ЛПС достоверно не отличались от соответствующих вариантов и контроля линии LRht-B1c. В отличие от контрольного варианта линии LRht-B1a, для

которого выход регенерантов был в 2,4 раза ниже ($P = 0.01$), чем для контрольного варианта линии LRht-B1c.

Таблица 4.13 – Влияние ЛПС штаммов *A. brasiliense* SR75, SR55, *A. lipoferum* SR65 на выход регенерантов от общего количества эксплантов в культуре соматических тканей пшеницы

Генотип	LRht-B1c		LRht-B1a	
Вариант	Количество эксплантов, шт.	Выход регенерантов, %	Количество эксплантов, шт.	Выход регенерантов, %
Контроль	1009	3,77±1,18	97	1,60±0,78
ЛПС <i>A. brasiliense</i> SR75	199	2,51±2,19	21	4,55±2,92*
ЛПС <i>A. brasiliense</i> SR55	153	6,54±3,95	40	4,68±3,19*
ЛПС <i>A. lipoferum</i> SR65	345	8,12±2,89*	69	1,60±0,78*

Примечание – Различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $t \geq t_{0,05}$. «*» сравнение с контролем.

Анализ морфометрических параметров растений-регенерантов не показал существенного влияния ЛПС на количество побегов, образовавшихся на каллусах, количество листьев у побегов или массу побегов (Таблица 4.14). Достоверное влияние обнаружено только на снижение дины побегов в вариантах с ЛПС по сравнению с контролем. При этом в вариантах с ЛПС *A. brasiliense* SR55 и ЛПС *A. lipoferum* SR65 наблюдалось различие в длине побегов у высокорослой и короткостебельной линий.

Таблица 4.14 – Влияние ЛПС штаммов *A. brasiliense* SR75, SR55, *A. lipoferum* SR65 на морфологические параметры растений-регенерантов

Вариант сре- ды	Генотип	Количество побегов на каллусе, шт.		Длина побега, см		Количество листьев, шт.		Сухая масса побега с корнями, мг	
		по вари- антам	в среднем по фактору B	по вари- антам	в среднем по фактору B	по вари- антам	в среднем по фактору B	по вари- антам	в среднем по фактору B
Контроль	ЛRht-B1c	3,00	2,50	14,50cd	15,25b	4,30	3,98	168,83	162,82
	ЛRht-B1a	2,00		16,00de		3,67		156,80	
ЛПС <i>A. bra- silense</i> SR75	ЛRht-B1c	1,17	2,00	13,00bc	13,75a	6,23	4,99	133,13	144,43
	ЛRht-B1a	2,83		14,50cd		3,75		155,73	
ЛПС <i>A. bra- silense</i> SR55	ЛRht-B1c	1,43	1,55	9,43a	13,22a	5,17	4,58	128,57	131,58
	ЛRht-B1a	1,67		17,00e		4,00		134,60	
ЛПС <i>A. lipoferum</i> SR65	ЛRht-B1c	1,67	1,75	12,20b	13,35a	6,83	5,40	135,87	138,27
	ЛRht-B1a	1,83		14,50cd		3,97		140,67	
в среднем по фактору А	ЛRht-B1c	1,82		12,28a		5,63b		141,60	
	ЛRht-B1a	2,08		15,50b		3,85a		146,95	

Продолжение таблицы 4.14

$F_{\text{факт.}}$	1,145	15,140*	1,982	1,113
$HCP_{0,05}$	-	1,83	-	-
$F_{\text{факт. A}}$	0,388	56,598*	1,624	0,310
$HCP_{0,05} A$	-	0,92	-	-
$F_{\text{факт. B}}$	0,918	4,766*	7,076*	1,952
$HCP_{0,05} B$	-	1,30	1,44	-
$F_{\text{факт. AB}}$	1,625	11,695*	0,809	0,542
$HCP_{0,05} AB$	-	1,83	-	-

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{теор.}}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана; фактор А – генотип; фактор В – вариант среды.

Выбор для анализа липополисахаридов, различающиеся по физико-химическим и серологическим свойствам, обусловлен прогрессом в исследовании О-антител бактерий рода *Azospirillum*, достигнутым в последние два десятилетия [225]. Результаты экспериментов с каллусами пшеницы линий LRht-B1a и LRht-B1c подтвердили положительное действие ЛПС бактерий рода *Azospirillum* на морфогенез пшеницы, подобно описанному ранее для ЛПС штамма *A. baldaniorum* Sp245. Наибольшая активность была показана для ЛПС, изолированного из клеток *A. lipoferum* SR65 (серогруппа III). Мицеллы этого ЛПС в воде имели диаметр 23 нм и слабый дзета-потенциал. Этот ЛПС, подобно ЛПС из *A. baldaniorum* Sp245 (серотип I), стимулировал морфогенез на всех этапах культуры *in vitro*. В то же время, ЛПС штамма *A. brasiliense* SR75, имеющий идентичное по структуре с ЛПС штамма *A. baldaniorum* Sp245 повторяющееся звено О-полисахарида [225], повышал только показатель выхода растений-регенерантов из морфогенных каллусов у линии LRht-B1a, но не относительно контрольных вариантов.

Существенные различия в действии ЛПС штаммов *A. brasiliense* SR75 и *A. baldaniorum* Sp245 по отношению к каллусам пшеницы являются тяжело объяснимыми. Так, ЛПС этих штаммов имеют идентичные по химическому строению О-полисахариды [225] и небольшие различия массовой доле углеводов или физико-химических характеристиках мицелл (Таблица 4.10). Тем не менее, ЛПС штамма *A. baldaniorum* Sp245 оказывал существенное положительное влияние на морфогенез обеих линий пшеницы (как показано выше), в отличие от ЛПС штамма *A. brasiliense* SR75. Это различие может быть связано с многофакторностью взаимодействия молекул ЛПС с клетками каллуса. Совокупность эффектов от небольших различий в размере, поверхностном заряде мицелл и других неизвестных факторов может быть важным фактором при формировании морфогенных центров в дедифференцированной растительной ткани. Также не следует исключать специфичность действия липидов А и коровых олигосахаридов. Эти части молекул ЛПС являются высоко консервативными [183, 627], поэтому их влияние не было учтено в данной работе. При этом не исключены различия в структуре липида А или кора, являющиеся важными для взаимодействия с растительными

клетками, у бактериальных штаммов одного вида [183, 515]. В работе Desaki с соавторами [474] было показано участие липида А фитопатогенной бактерии *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* в активации ответных реакций посредством специфического взаимодействия с многофункциональной киназой ко-рецептора OsCERK1 в суспензионной культуре клеток риса. Следует предположить, что существуют и другие растительные рецепторы, запускающие разные биохимические и физиологические ответы растений на ЛПС. В целом, механизм действия бактериальных ЛПС на растения остаётся до сих пор малоизученным.

Препарат ЛПС штамма *A. brasiliense* SR55 ($d = 23$ нм, высокий отрицательный дзета-потенциал, серогруппа II) оказывал существенное (в 2,5 раза; $P = 0,01$) положительное действие относительно контрольных вариантов на выход морфогенных каллусов для обеих линий пшеницы, но не на выход растений-регенерантов из морофогенных каллусов. Тем не менее, для каллусов низкоэмбриогенной линии LRht-B1a, культивированных на среде с ЛПС *A. brasiliense* SR55, за счёт значительной активации морфогенеза на стадии формирования морфогенных каллусов, в целом (от эксплантов до регенерантов) экспериментально наблюдалось повышение выхода растений-регенерантов в 2,9 раза ($P = 0,1$) относительно контрольной группы. Таким образом, соотнесение выявленных эффектов трёх исследованных ЛПС бактерий рода *Azospirillum* с их физико-химическими и серологическими свойствами позволило выявить слабую зависимость между повышением морфогенной активности каллусов и низким значением дзета-потенциала мицелл ЛПС в водной среде. Вероятно, установленное стимулирующее влияние ЛПС по отношению к каллусам пшеницы связано не только с особенностями химической структуры повторяющегося звена О-полисахаридов и размером образуемых мицелл.

В 2020 г. был проведен эксперимент по изучению влияния ЛПС *A. lipoferum* SR65 на разные этапы морфогенеза соматических тканей пшеницы. На первом этапе каллусогенеза и формирования меристематических очагов в каллусах сравнивались варианты культивирования эксплантов двух линий на питательной среде с ЛПС *A. lipoferum* SR65 и контрольной среде без добавления ЛПС. Эффектив-

ность каллусогенеза, как и в предыдущих экспериментах, была близка к 100% без существенных различий между вариантами опыта (Таблица 4.15). По количеству морфогенных каллусов в данном эксперименте наблюдалось достоверное превосходство линии LRht-B1c над низкорослым сибом в контрольном варианте опыта. На среде с ЛПС в данном эксперименте не наблюдалось увеличения морфогенной активности каллусов обеих линий.

На втором этапе морфогенные каллусы, полученные в контроле и на среде с ЛПС *A. lipoferum* SR65, далее были перенесены на два варианта питательной среды Линсмайера-Скуга для регенерации: контроль без ЛПС и опытный вариант с ЛПС *A. lipoferum* SR65. В варианте с добавлением в питательную среду ЛПС на обоих этапах наблюдалось увеличение количества растений-регенерантов, причем у низкоморфогенной линии LRht-B1a регенерационная способность увеличивалась на достоверном уровне (Таблица 4.16). В остальных вариантах различия между выходом регенерантов были несущественные.

Таблица 4.15 – Влияние ЛПС *A. lipoferum* SR65 на морфогенез в каллусах пшеницы

Вариант среды	Генотип	Количество эксплантов, шт.	Выход каллусов,		Выход морфогенных каллусов,		
			шт.	%	шт.	% от экспл.	% от калл.
Контроль	LRht-B1c	356	355	99,7±0,55	90	25,3±4,5	25,4±4,5
	LRht-B1b	400	398	99,5±0,69	73	18,3±3,8*	18,3±3,9
<i>ЛПС A. lipoferum SR65</i>	LRht-B1c	400	394	98,5±1,19	93	23,3±4,2	23,6±4,2
	LRht-B1b	400	400	100,0±0	82	20,5±4,0	20,5±4,0

Примечание – Различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $t \geq t_{0,05}$. «*» сравнение с контролем.

Таблица 4.16 – Влияние ЛПС *A. lipoferum* SR65 на регенерацию растений из каллусов пшеницы

Вариант среды	Генотип	Выход регенерантов,		
		шт.	% от морфоген- ных каллусов	% от каллусов
индуциционная регенераци- онная	Контроль	LRht-B1c	20	54,1±16,6
		LRht-B1a	17	50,0±17,5
ЛПС <i>A. lipofer- um</i> SR65	контроль	LRht-B1c	27	65,8±15,0
		LRht-B1a	26	57,8±14,8
Контроль	ЛПС <i>A. lipoferum SR65</i>	LRht-B1c	28	52,8±13,8
		LRht-B1a	26	66,7±15,3
ЛПС <i>A. lipofer- um</i> SR65	ЛПС <i>A. lipoferum SR65</i>	LRht-B1c	36	69,2±12,9
		LRht-B1a	32	86,5±11,4*

Примечание – Различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $t \geq t_{0,05}$. «*»
сравнение с контролем.

Анализ морфометрических параметров растений-регенерантов показал (Таблица 4.17), что количество растений-регенерантов на каллусах не различалось по вариантам опыта. Во всех вариантах опыта наблюдались достоверные различия между линиями по длине побегов (у короткостебельной линии побеги были ожидаемо короче). В присутствии ЛПС хотя бы на одном этапе культивирования у растений регенерантов обеих линий увеличивалось количество листьев на побегах. В среднем по вариантам опыта (фактор В) достоверное увеличение количества листьев отмечалось в варианте с каллусогенезом в контрольных условиях и регенерацией в присутствии ЛПС *A. lipoferum* SR65. Аналогично увеличивалась масса побегов в варианте «Контроль / ЛПС *A. lipoferum* SR65».

Таблица 4.17 – Влияние ЛПС штамма *A. brasiliense* SR65 на морфологические параметры растений-регенерантов

Вариант среды		Генотип	Количество побегов, шт.		Длина побега, см		Количество листьев, шт.		Сухая масса побега с корнями, мг	
ин-дук-цион-ная	реке-нерап-цион-ная		по вариан-там	в среднем по фактору В	по вариан-там	в среднем по факто-ру В	по вари-антам	в среднем по фактору В	по вариан-там	в среднем по фактору В
Кон-троль	Кон-троль	JRht-B1c	2,40	2,17	13,27a	14,88	4,56c	4,43a	162,40abcd	158,48a
		JRht-B1a	1,93		16,50bcde		4,29c		154,57ab	
ЛПС <i>A. lipoferum</i> SR65	кон-троль	JRht-B1c	2,53	2,73	11,13a	14,00	5,44e	4,38a	156,53abc	158,20a
		JRht-B1a	2,93		16,87cde		3,32a		159,87abcd	
Кон-троль	ЛПС <i>A. lipoferum</i> SR65	JRht-B1c	2,15	2,47	10,48a	14,09	6,21f	5,17b	174,37cd	174,88b
		JRht-B1a	2,80		17,70de		4,12bc		175,40d	
ЛПС <i>A. lipoferum</i> SR65	ЛПС <i>A. lipoferum</i> SR65	JRht-B1c	3,33	2,93	11,53a	14,83	5,40de	4,41a	170,77bcd	158,95a
		JRht-B1a	2,53		18,13e		3,42ab		147,13a	

Продолжение таблицы 4.17

в среднем по фактору А	JRht-B1c	2,60	11,60a	5,40b	166,02
	JRht-B1a	2,55	17,30b	3,79a	159,24
$F_{\text{факт.}}$	1,464	13,506*	18,510*	3,397*	
HCP _{0,05}	-	2,63	0,72	16,66	
$F_{\text{факт. A}}$	0,044	86,611*	92,730*	3,045	
HCP _{0,05} A	-	1,31	0,36	-	
$F_{\text{факт. B}}$	1,634	0,594	5,175*	4,433*	
HCP _{0,05} B	-	-	0,51	11,78	
$F_{\text{факт. AB}}$	1,767	2,049	7,106*	2,479	
HCP _{0,05} AB	-	-	0,72	-	

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{теор.}}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана; фактор А – генотип; фактор В – вариант среды.

Для изучения характера воздействия ЛПС *A. lipoferum* SR65 каллусы линии LRht-B1c, полученные в контрольных условиях, помещали в жидкую питательную среду, содержащую 10 мг/л ЛПС. Методом иммуноферментного анализа было установлено (Рисунок 4.17), что начальная концентрация ЛПС в среде резко падает в 1,5-2 раза после помещения в нее каллусов. Далее в течении 3 часов концентрация практически не меняется, а после 6 часов культивирования падает до нижней определимой границы.

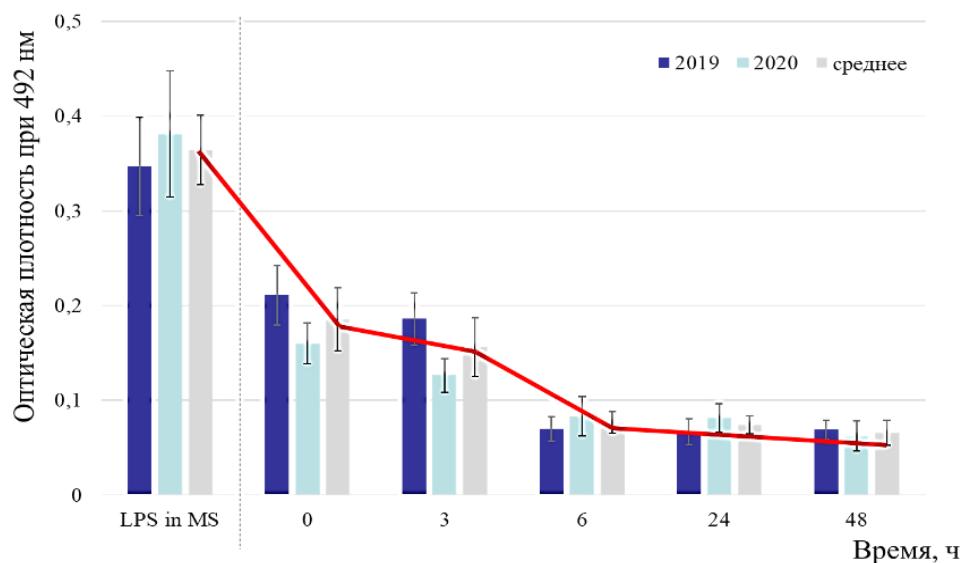


Рисунок 4.17 – Динамика изменения концентрации ЛПС *A. lipoferum* SR65 в среде культивирования каллуса LRht-B1c по данным иммуноферментного анализа

Вероятно, липополисахариды в значительном количестве адсорбируются на поверхности клеток, что приводит к снижению их концентрации в среде, а затем в течении 3 часов проникают в более глубокие слои каллусной ткани. Через 6 часов происходит насыщение тканей ЛПС.

При этом, анализ пероксидазы (Рисунок 4.18) показал значительное нарастание её активности в направлении обратном падению концентрации ЛПС в среде. Увеличение активности пероксидазы, отмечаемое до 48 часов, говорит об активировании ответных реакций, инициированных липополисахаридом.

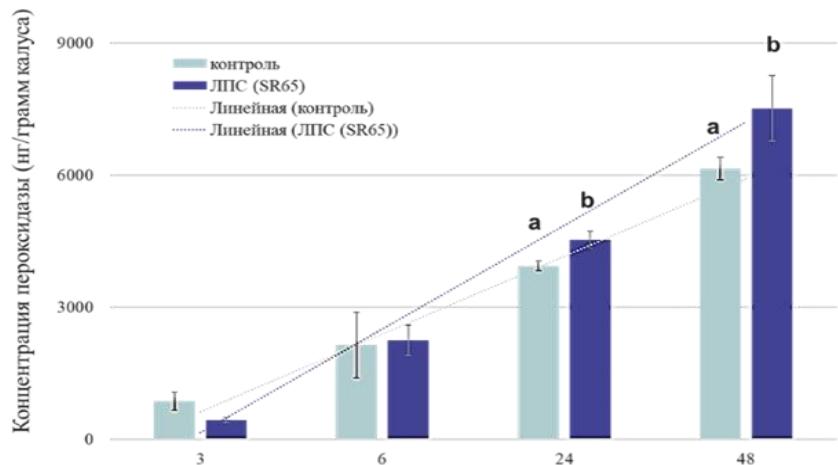


Рисунок 4.18 – Динамика изменения пероксидазной активности в среде культивирования каллуса LRht-B1c

Далее было исследовано влияние ЛПС трех видов ризобактерий, относящихся к другим таксономическим видам: *Ensifer adhaerens* T1Ks14, *Ochrobactrum quorumnocens* T1Kr02 и *Pseudomonas chlororaphis* K3, также в концентрации 10 мкг/мл в составе индукционной питательной среды.

Анализ результатов подсчёта количества каллусов показал, что препараты ЛПС трёх ризосферных штаммов по-разному действовали на культуру тканей пшеницы (Таблица 4.18).

Выход каллусов из эксплантов, полученных из незрелых зародышей, достоверно увеличивался на 2,5% при действии ЛПС штамма *O. quorumnocens* T1Kr02 и уменьшался на 4% в варианте с ЛПС *P. chlororaphis* K3. В то время как ЛПС *E. adhaerens* T1Ks14 достоверного влияния на каллусогенез не оказывал. При этом следует отметить, что значения выхода каллусов из эксплантов во всех вариантах было высоким – более 90 %.

Выход морфогенных каллусов увеличивался при действии ЛПС штаммов *E. adhaerens* T1Ks14 (+ 57%) и *P. chlororaphis* K3 (+41%). При этом, значения выходов для ЛПС обоих штаммов были сопоставимы со значениями, которые ранее были описаны для наиболее активных ЛПС штаммов *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Azospirillum lipoferum* SR65.

Таблица 4.18 – Влияние бактериальных ЛПС (10 мкг/мл) на морфогенетическую активность каллусов и выход растений-регенерантов мягкой пшеницы линии Rht-B1a

Вариант	Выход каллусов от эксплантов, %	Выход морфогенных каллусов от всех каллусов, %	Выход регенерантов, %	
			от морфогенных каллусов	от всех каллусов
Контроль	96,8±1,89	17,2±4,7	44,2±12,3	7,6±4,1
ЛПС <i>E. adhaerens</i> T1Ks14	95,5±2,89	27,0±7,1*	46,3±15,7	12,5±4,2*
ЛПС <i>O. quorumnocens</i> T1Kr02	99,29±1,41*	21,2±6,8	28,6±13,6*	6,1±2,4
ЛПС <i>P. chlororaphis</i> K3	92,5±4,12*	24,3±5,0*	41,7±11,7	10,1±4,9

Примечание – Различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $t \geq t_{0,05}$. “**” сравнение с контролем.

После переноса каллусов с морфогенными очагами на питательную среду для регенерации, не содержащую ЛПС, развитие растений-регенерантов во всех вариантах была примерно одинаковой – выход составлял 40-45% от числа морфогенных каллусов. Исключение составляли каллусы, пересаженные со среды, содержащей на первом этапе культивирования ЛПС штамма *O. quorumnocens* T1Kr02. Такие каллусы образовывали на 35% меньше регенерантов, чем контрольные каллусы. В целом же, при подсчёте выхода регенерантов на 100 исходных эксплантов было выявлено, что эффективность применения препаратов ЛПС на стадии формирования морфогенных каллусов была достоверно выше только в варианте штамма *E. adhaerens* T1Ks14 (+64%). Полученные данные свидетель-

ствуют о существенных отличиях в реакции культуры тканей растений в отношении ЛПС различных ризосферных бактерий.

В составе ЛПС штамма *E. adhaerens* T1Ks14 большую массовую долю составляют остатки уроновых кислот, в отличие от ЛПС *O. quorumnocens* T1Kr02 и *P. chlororaphis* K3, содержащих остатки фукозы (6-дезоксисахар) и аминосахаров соответственно. Таким образом, одной из причин разного действия бактериальных ЛПС на культуру тканей пшеницы могут быть существенные различия в моносахаридном составе и физико-химических свойствах гликанов.

На основании полученных результатов предлагается оптимизировать методику культивирования соматических каллусов пшеницы введением в состав индукционной питательной среды ЛПС штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasiliense* sp 7, *A. lipoferum* SR65 и *E. adhaerens* T1Ks14 в концентрации 10 мг/л.

Глава 5 Изучение влияния бактериальных клеток и их липополисахаридов на микроклоны картофеля в культуре *in vitro* и *ex vitro*

5.1 Изучение влияния ризосферных бактерий на микроклоны картофеля в культуре *in vitro*

5.1.1 Создание растительно-микробных ассоциаций в культуре *in vitro*

Обязательным этапом современного семеноводства картофеля является получение оздоровленного посадочного материала биотехнологическим методом. ГОСТ 33996-2016 предусматривается категория семенного картофеля – «оригинальный семенной картофель», которая включает оздоровленный исходный материал, в том числе микrorастения, полученные в культуре *in vitro* [32].

Для освобождения растений от бактериальных и вирусных инфекций используется метод вычленения апикальных меристем с последующим микроклональным размножением побегов *in vitro*. Культивируемые *in vitro* растения стерильны, что создает сложности в адаптации готового посадочного материала к естественным условиям выращивания в почве. Высаженные стерильные микrorастения подвергаются агрессивному воздействию естественного микробного фона и абиотических факторов среды. Для повышения адаптационной способности микроклонов в ряде случаев применяют прием инокуляции корней рост-стимулирующими ризосферными микроорганизмами [344, 509].

Известно, что ризосферные бактерии, в том числе *Azospirillum sp.*, в естественных условиях *in vivo* могут оказывать положительное влияние на рост и развитие растений [153, 501]. Бактерии рода *Azospirillum* способны фиксировать молекулярный азот и передавать его в доступной для растения форме, улучшая его азотное питание, способствуют повышению доступности фосфора в ризосфере, продуцируют ауксины, цитокинины, гиббереллины, способны подавлять (контролировать) заболеваемость растений, обусловленную фитопатогенными микроорганизмами [153, 568]. По данным Волкогона [24] азоспириллы способны активизировать рост микроклонов картофеля в культуре *in vitro*, но условия создания эффективной ассоциации

между бактериями и микrorастениями картофеля *in vitro* до сих пор не были раскрыты в полной мере.

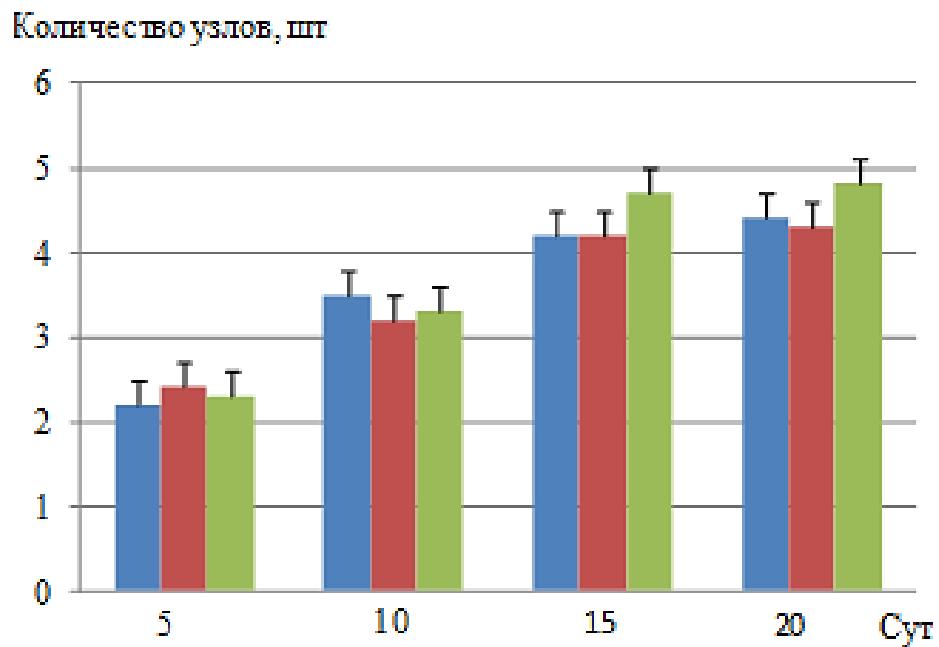
На первом этапе данного исследования (в 2011-2012 гг.) была поставлена задача изучения возможности инокуляции микrorастений в культуре *in vitro* ризосферными бактериями рода *Azospirillum* и создания активных растительно-микробных ассоциаций. Для этой цели использовали штамм *A. baldaniorum* Sp245, а в качестве макропартнера микrorастения картофеля сорта Кондор, а также хризантемы сорта Сноубол. Инокуляцию микrorастений, культивируемых на жидкой среде М-С без гормонов, проводили на 10 сутки после микрочеренкования суспензией бактерий, содержащей 10^8 кл./мл, с получением итоговой концентрации в пробирках с растениями 10^5 или 10^7 клеток в мл питательной среды.

Измерение морфометрических параметров мериклонов картофеля и хризантемы в первом эксперименте по сравнению с контролем не показали достоверного различия. Это подтверждается, результатами периодического измерения количества узлов у растений картофеля и хризантемы (Рисунок 5.1).

При этом, анализ митотической активности клеток кончиков корней микrorастений показал существенное влияние бактерий на деление клеток растений (Рисунок 5.2). В контрольных вариантах митотическая активность клеток корневых меристем микрочеренков картофеля была в 3 раза ниже по сравнению с митотической активностью клеток корней хризантемы (Рисунок 5.2а, 5.2б). Это указывает на видовую особенность функционирования клеток апикальных меристем исследуемых растений. Не было установлено достоверного положительного влияния азоспирилл на митотическую активность клеток корневых меристем картофеля (Рисунок 5.2а). В то же время, митотический индекс клеток корневых меристем хризантемы достоверно превышал в (1,4 раза) аналогичный показатель контрольных растений (Рисунок 5.2б).

Не наблюдалось видимой контаминации культуры и фитотоксичного действия бактерий. Поэтому, на основании полученных данных были изменены условия эксперимента: использовалась питательная среда М-С с агар-агаром (7 г/л) и инокуляция проводилась на 0 сутки культивирования.

а



б

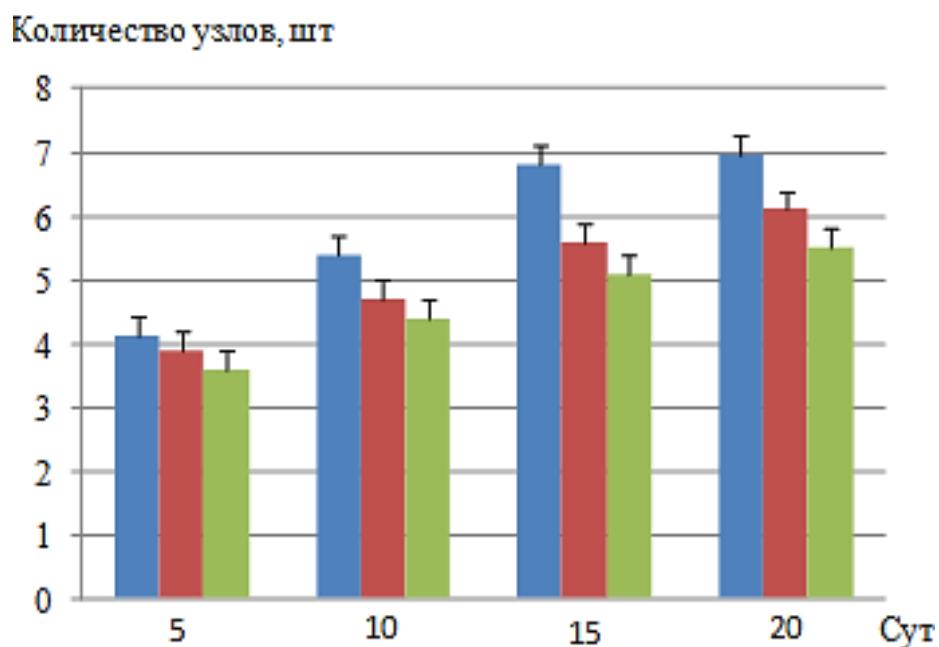


Рисунок 5.1 – Количество узлов у микрорастений хризантемы (а) и картофеля (б)
при инокуляции *A. baldaniorum* Sp245 на 10 сутки культивирования

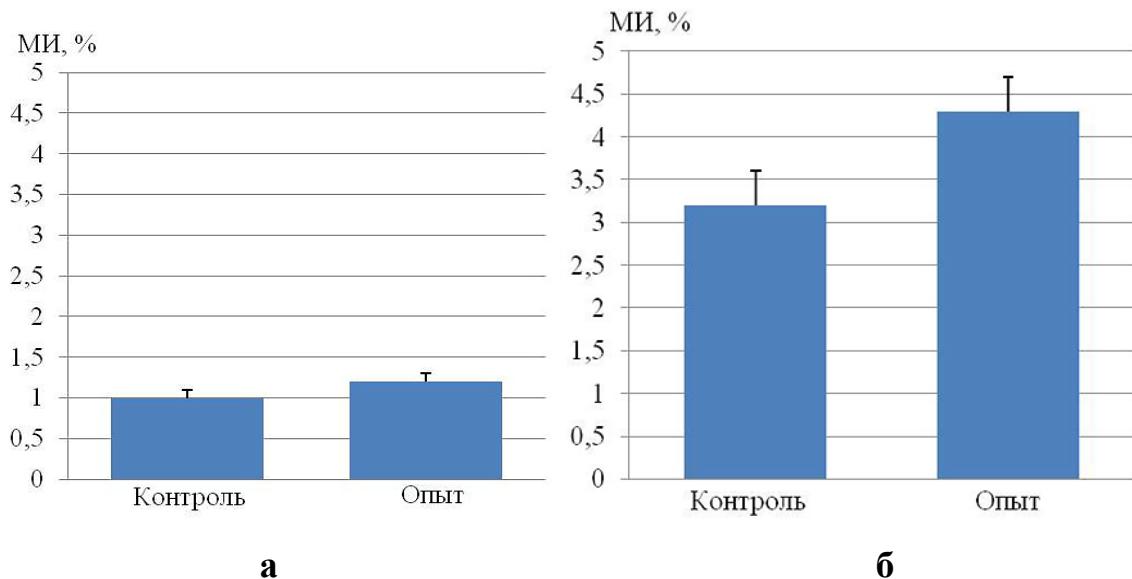


Рисунок 5.2 – Митотический индекс клеток корневых меристем картофеля (а)
и хризантемы (б)

В модернизированном эксперименте, в отличие от данных первого опыта (Рисунок 5.3а), установлено положительное влияние азоспирилл на митотическую активность клеток корневых меристем картофеля. Митотический индекс клеток корня картофеля увеличивался в 1,8 раза (Рисунок 5.3б). Данный факт указывает на то, что изменение времени добавления бактериальной суспензии в среду выращивания растений картофеля и изменение ее плотности усилило положительное влияние бактерий на митотическую активность апикальных меристем корня картофеля.

Методом иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием специфических антител к штамму *A. baldaniorum* Sp245 изучался характер распределения колоний бактерий на корнях картофеля и хризантемы. Были обнаружены единичные колонии бактерий на корнях хризантемы (Рисунок 5.4) и скопления бактерий на корнях картофеля, главным образом, в зоне кончика корня и в зоне корневых волосков (Рисунок 5.5).

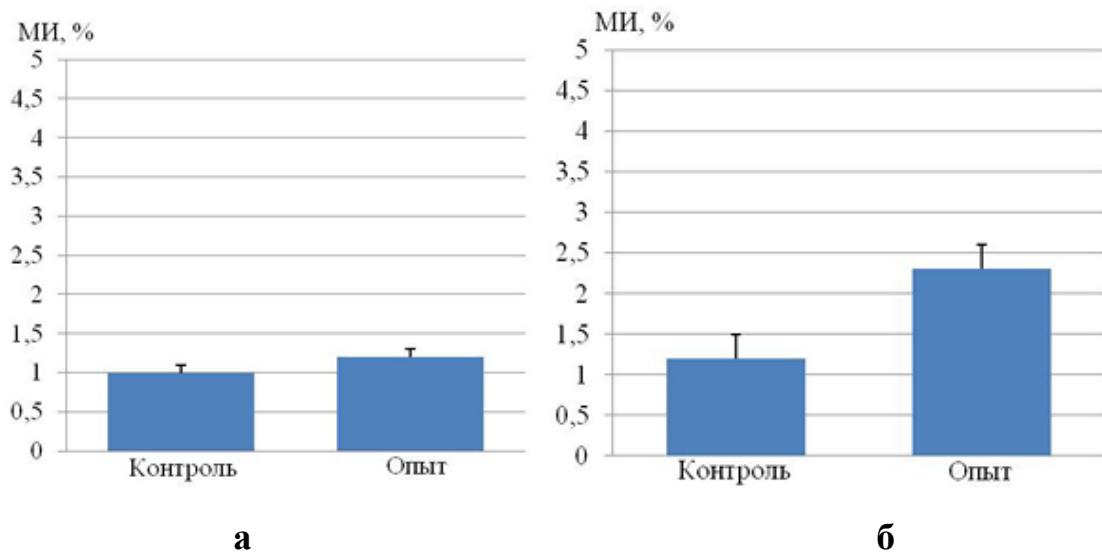


Рисунок 5.3 – Митотический индекс клеток корневых меристем картофеля в первом (а) и в модернизированном экспериментах (б)

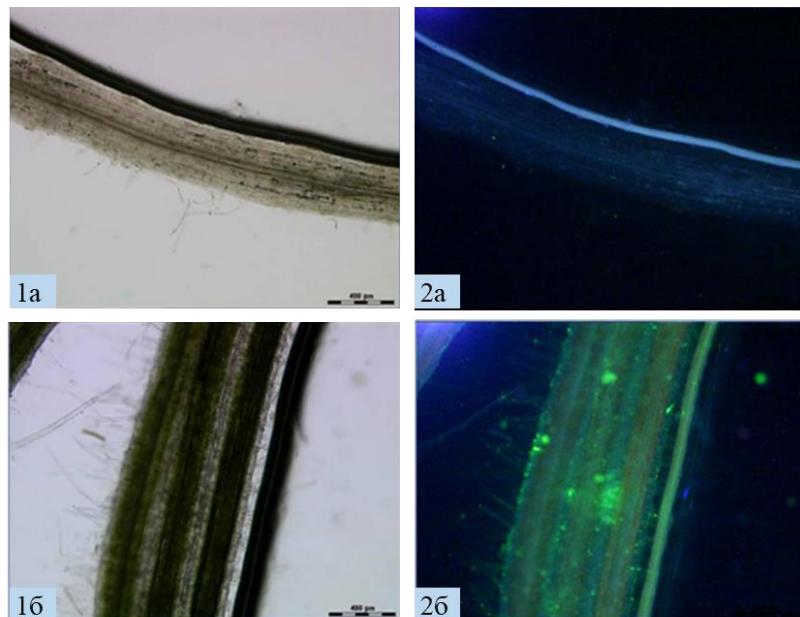


Рисунок 5.4 – Обнаружение бактерий *A. baldaniorum* Sp245 на корнях хризантемы с использованием флуоресцентной микроскопии и специфических Ат к ЛПС данного штамма: без подсвечивания флуоресцентной лампой (1), в свете флуоресцентной лампы (2), в контроле (а) и опыте (б)

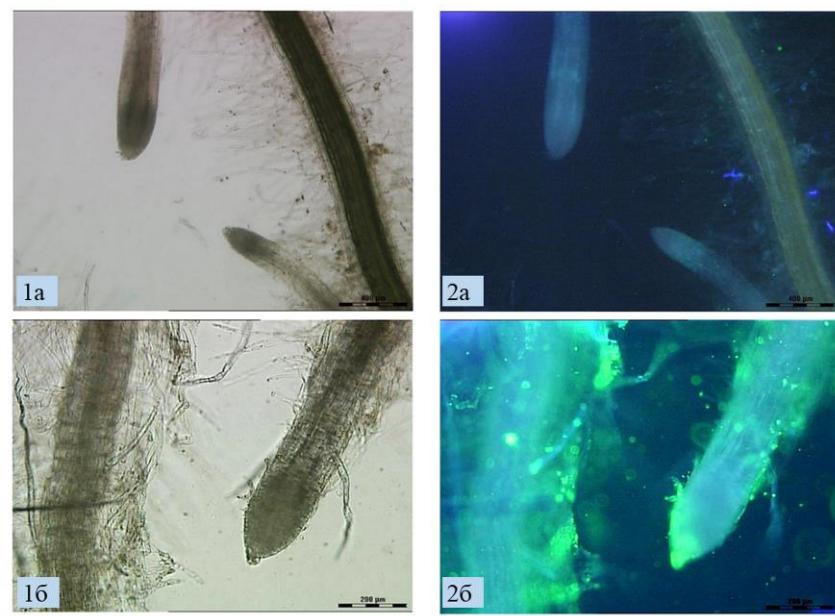


Рисунок 5.5 – Обнаружение бактерий *A. baldaniorum* Sp245 на корнях картофеля с использованием флуоресцентной микроскопии и специфических Ат к ЛПС данного штамма: без подсвечивания флуоресцентной лампой (1), в свете флуоресцентной лампы (2), в контроле (а) и опыте (б)

Для изучения наличия жизнеспособных бактериальных клеток исследуемого штамма, ассоциированных с внутренними тканями корня картофеля, был проведен микробиологический тест на эндофитность (Рисунок 5.6).

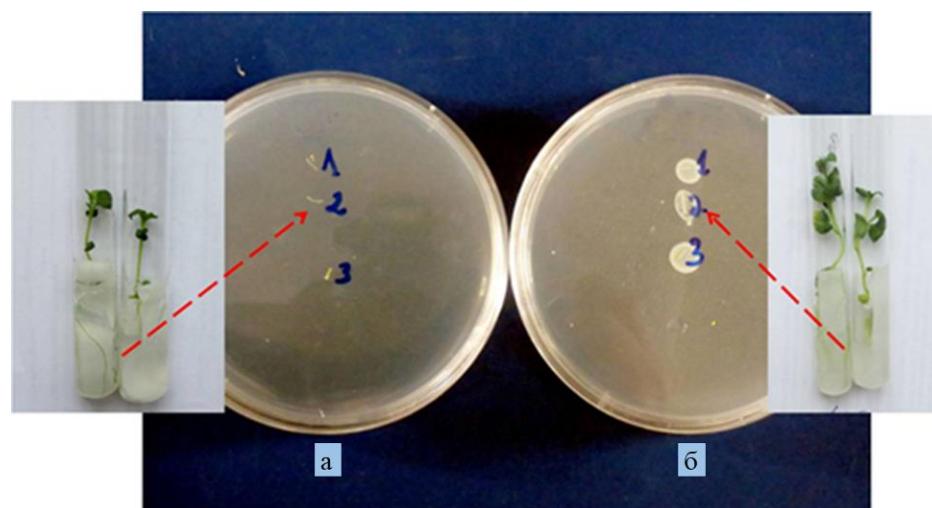


Рисунок 5.6. Микробиологический тест: а - контроль, б – опыт; цифры 1, 2, 3 соответствуют колониям бактерий *A. baldaniorum* Sp245, сформировавшихся вокруг фрагментов корня

Фрагменты корня, обработанные спиртом, помещались на плотную малатную среду для культивирования бактерий. Через сутки в опытном варианте наблюдалось образование колоний бактерий, которые методом ИФА с использованием штаммоспецифичных антител были идентифицированы как *A. baldaniorum* Sp245 (Рисунок 5.7). Это указывает на заселение внутренних тканей корня микроклонов картофеля исследуемым штаммом азоспирилл. В контрольном варианте фрагменты корня не образовали колоний, следовательно, их внутренние ткани не были заселены бактериями *A. baldaniorum* Sp245.

Таким образом, было установлено, что бактерии способны колонизировать поверхность и внутренние ткани корня микрорастений *in vitro*, а для достижения достоверного положительного влияния на морфометрические показатели полученных регенерантов необходим поиск условий инокуляции и культивирования.

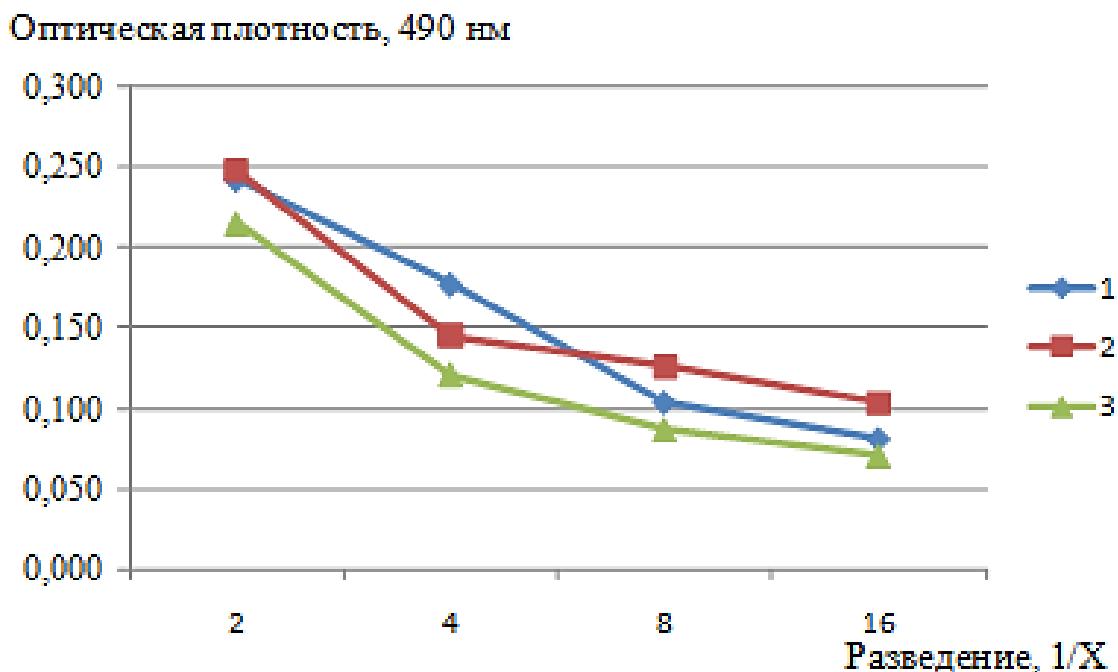


Рисунок 5.7 – Результаты ИФА бактерий, сформировавших колонии в микробиологическом тесте, с антителами на ЛПС *A. baldaniorum* Sp245: цифры на графиках означают номера колоний рисунка 5.6

5.1.2 Подбор оптимальных условий инокуляции для создания растительно-микробных ассоциаций при микроклональном размножении

Предположительно, важным фактором создания растительно-микробной ассоциации должна быть концентрация клеток в суспензии при инокуляции. Поэтому была проведена серия экспериментов по изучению влияния данного фактора.

Для штамма *A. brasiliense* sp7 было изучено три концентрации, различающиеся на порядок: 10^4 , 10^5 и 10^6 клеток в мл питательной среды. Инокуляция проводилась на 7 сутки после черенкования. Морфометрические параметры микрорастений анализировались каждые 5 суток после инокуляции. Было установлено различное влияние данного фактора на темпы роста побегов и корней картофеля и хризантемы.

На количество корней (Таблица 5.1) и длину побега (Таблица 5.2) концентрация бактериальной суспензии не оказала существенного влияния.

На количество узлов на побегах картофеля положительное влияние оказывала бактериальная суспензия в концентрации 10^4 на 20 сутки культивирования (Таблица 5.3).

Таблица 5.1 – Влияние концентрации суспензии *A. brasiliense* sp7 на количества корней у мериклонов картофеля сорта Кондор

Вариант опыта	Количество корней, шт.				
	0 сутки	5 сутки	10 сутки	15 сутки	20 сутки
Контроль	5,5	6,53	7,9	8,3	8,7
10^4	5,3	6,5	6,5	6,5	7,2
10^5	5,9	6,1	6,6	7,1	8,1
10^6	5,9	6,3	6,6	6,6	8,07
F факт.	0,235	0,323	0,987	3,045	0,511
HCP _{0,05}	-	-	-	-	-

Таблица 5.2 – Влияние концентрации суспензии *A. brasiliense* sp7 на длину побегов мериклонов картофеля сорта Кондор

Вариант опыта	Длина побега, см				
	0 сутки	5 сутки	10 сутки	15 сутки	20 сутки
Контроль	5,1	6,04	6,95	7,88	8,9
10^4	4,57	6,8	8,1	8,6	9,8
10^5	4,97	5,28	7,25	8,45	8,6
10^6	4,6	5,3	6,66	6,87	7,4
$F_{\text{факт.}}$	0,149	1,973	3,150	2,393	3,673
$HCP_{0,05}$	-	-	-	-	-

Таблица 5.3 – Влияние концентрации суспензии *A. brasiliense* sp7 на количество узлов на побегах мериклонов картофеля сорта Кондор

Вариант опыта	Количество узлов на побеге, шт.				
	0 сутки	5 сутки	10 сутки	15 сутки	20 сутки
Контроль	5,03	5,9	7,3	7,8	8,8
10^4	5,4	6,6	7,4	8,6	9,5
10^5	5,5	6,5	7,1	8,1	8,16
10^6	6,06	6,87	7,5	8	8,3
$F_{\text{факт.}}$	0,776	0,837	0,078	0,489	12,882*
$HCP_{0,05}$	-	-	-	-	0,4

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{теор.}}$.

Существенное влияние концентрации бактериальной суспензии на микрорастения было обнаружено по показателю «длина корня» (Таблица 5.4). Под действием бактериальной суспензии в концентрации 10^4 длина корня существенно увеличивалась на 15 и 20 сутки культивирования после инокуляции. Суспензия бактерий в концентрации 10^5 на 10 сутки увеличивала длину корня. Суспензия бактерий в кон-

центрации 10^6 отрицательно влияла на темпы роста корней, в том числе на достоверном уровне на 10 сутки. Но к 20 суткам микрочеренки инокулированные этой суспензией выравнивались по данному показателю с контрольными растениями.

Таблица 5.4 – Влияние концентрации суспензии *A. brasiliense* sp7 на длину корней мериклонов картофеля сорта Кондор

Вариант опыта	Длина корня, см				
	0 сутки	5 сутки	10 сутки	15 сутки	20 сутки
Контроль	3,55a	4,91	5,1b	5,3a	6,3b
10^4	4,4b	5,01	5,22b	6,03b	6,61c
10^5	4,6b	4,9	5,44c	5,7ab	5,87a
10^6	3,6a	4,3	4,51a	5,22a	6,3b
$F_{\text{факт.}}$	5,952*	1,025	22,172*	11,733*	11,102*
HCP _{0,05}	0,79	-	0,29	0,71	0,29

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

На рост микрочеренков хризантемы *in vitro* концентрация суспензии *A. brasiliense* sp7 оказала более существенное влияние. Под действием инокуляции бактериями увеличивалось количество корней на микrorастениях хризантемы. Наибольшее влияние оказывала бактериальная суспензия в концентрации 10^6 (Таблица 5.5).

В процессе культивирования на количество узлов на побегах хризантемы бактериальные суспензии существенного влияния не оказывали, но к 20 суткам бактериальная суспензия в концентрации 10^6 увеличивала количество узлов у побегов хризантемы (Таблица 5.6).

Длина корней у побегов хризантемы *in vitro* увеличивалась под действием бактериальной суспензии *A. brasiliense* sp7 в концентрации 10^6 , а также на 15 сутки под влиянием бактериальной суспензии в концентрации 10^5 (Таблица 5.7).

Таблица 5.5 – Влияние концентрации суспензии *A. brasiliense* sp7 на количества корней у мериклонов хризантемы сорта Сноубол

Вариант опыта	Количество корней, шт.				
	0 сутки	5 сутки	10 сутки	15 сутки	20 сутки
Контроль	2	2,2a	2,7a	2,8a	4,5a
10^4	3,3	3,5ab	3,8ab	4ab	4,2a
10^5	3,4	3,8ab	3,8ab	4,3b	4,7a
10^6	3,5	4,1b	4,6b	4,9b	5,9b
$F_{факт.}$	0,782	10,706*	10,590*	10,441*	10,321*
$HCP_{0,05}$	-	1,7	1,5	1,5	1,1

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

Таблица 5.6 – Влияние концентрации суспензии *A. brasiliense* sp7 на количество узлов на побегах мериклонов хризантемы сорта Сноубол

Вариант опыта	Количество узлов на побеге, шт.				
	0 сутки	5 сутки	10 сутки	15 сутки	20 сутки
Контроль	1	1,3	2,4	4,4	4,9ab
10^4	1	1	1,5	3,6	5,3bc
10^5	1	1,5	1,9	2,9	3,9a
10^6	1	1,5	2,3	4	6,5c
$F_{факт.}$	-	4,649	0,788	1,003	12,513*
$HCP_{0,05}$	-	-	-	-	1,3

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

Таблица 5.7 – Влияние концентрации суспензии *A. brasiliense* sp7 на длину корней мериклонов хризантемы сорта Сноубол

Вариант опыта	Длина корня, см.				
	0 сутки	5 сутки	10 сутки	15 сутки	20 сутки
Контроль	1,44	2,5a	2,6a	2,7a	4,1
10^4	1,9	2,4a	2,5a	2,6a	3,4
10^5	1,7	2,4a	2,99ab	3,4b	3,8
10^6	2,4	3,3b	3,6b	3,9b	4,2
$F_{\text{факт.}}$	0,940	10,683*	10,903*	10,916*	0,592
$HCP_{0,05}$	-	0,71	0,81	0,62	-

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

Длина побега хризантемы практически не изменялась в течение 15 суток культивирования. На 20 сутки под действием бактериальной суспензии *A. brasiliense* sp7 в концентрации 10^6 длина побега увеличивалась по сравнению с контролем (Таблица 5.8).

Таким образом, при внесении в пробирки с микроклонами хризантемы бактериальной суспензии *A. brasiliense* sp7, наблюдали повышение интенсивности роста корней и побегов под влиянием бактериальной суспензии в концентрации 10^6 кл./мл. После 20 суток совместного культивирования в условиях *in vitro* растения хризантемы бактеризованные суспензией 10^6 кл./мл превышали контрольные по количеству корней, количеству узлов и длине побега (Рисунок 5.8). Цитологический анализ подтвердил стимулирующее влияние бактерий на закладку и формирование боковых корней (Рисунок 5.9).

Таблица 5.8 – Влияние концентрации суспензии *A. brasiliense* sp7 на длину побега мериклонов хризантемы сорта Сноубол

Вариант опыта	Длина корня, см.				
	0 сутки	5 сутки	10 сутки	15 сутки	20 сутки
Контроль	1,21	1,47	5,69	12,10	16,0b
10^4	1,30	1,85	6,01	8,45	10,7a
10^5	1,09	1,66	6,12	9,47	14,0a
10^6	1,15	2,00	5,86	13,21	25,0c
$F_{\text{факт.}}$	0,312	0,620	0,532	0,781	10,542*
$HCP_{0,05}$	-	-	-	-	4,3

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

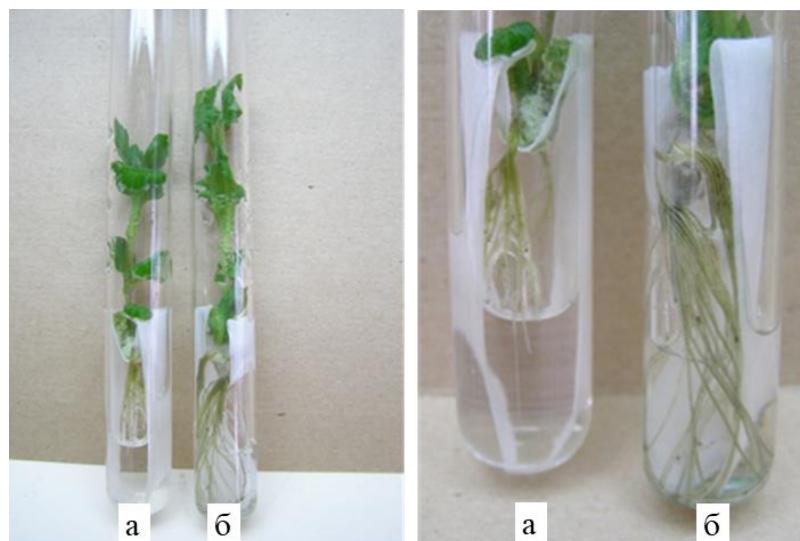


Рисунок 5.8 – Микроклоны хризантемы сорта Сноубол в контроле (а) и инокулированные суспензией *A. brasiliense* sp7 в концентрации 10^6 кл./мл



Рисунок 5.9 – Формирование точек роста на корнях инокулированных микрорастений хризантемы

На следующем этапе растения высаживали в сосуды с почвой для адаптации к естественным условиям выращивания.

У микрорастений картофеля сорта Кондор, инокулированных супензией *A. brasiliense* sp7 в трех концентрациях 10^4 , 10^5 и 10^6 кл./мл на 10 сутки адаптации в почве обнаруживалось достоверное положительное влияние только одного варианта инокуляции 10^6 кл./мл и лишь на один показатель «Ширина листьев растений» (Таблица 5.9). По остальным признакам существенного влияния инокуляции бактериями не наблюдалось: бактеризованные растения не превысили контрольные по соответствующим показателям.

В том же эксперименте микрорастения хризантемы, бактеризованные супензией в концентрации 10^5 , в условиях *ex vitro* превышали контрольные растения по темпам роста (Таблица 5.10). Бактериальная супензия в концентрации 10^5 положительно влияла на длину побега (превышение контроля на 64%), количество листьев (на 53%), длину листьев (на 13%) и ширину листьев (на 13%).

Для сравнения было проведено инокулирование стерильно выращенных микрорастений картофеля непосредственно перед высадкой в условия *ex vitro*. При этом концентрация бактерий в супензии была увеличена до 10^8 кл./мл. На картофеле достоверного влияния такого способа инокуляции обнаружено не было (Таблица 5.11).

Таблица 5.9 – Влияние концентрации суспензии *A. brasiliense* sp7 на морфометрические параметры мериклонов картофеля сорта Кондор на этапе адаптации *ex vitro*

Вариант опыта	Длина побега, см.	Количество листьев, шт.	Ширина листьев, см.	Длина листьев, см.
Контроль	29,78	13,6	7,5a	12,4
10^4	22,72	11,2	5,76a	9,64
10^5	22	10,6	6,3a	10,1
10^6	25,54	12,4	12,4b	9,64
$F_{\text{факт.}}$	1,301	0,891	13,116*	3,136
HCP _{0,05}	-	-	4,51	-

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{meop}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дунканна.

Таблица 5.10 – Влияние концентрации суспензии *A. brasiliense* sp7 на морфометрические параметры мериклонов хризантемы сорта Сноубол на этапе адаптации *ex vitro*

Вариант опыта	Длина побега, см.	Количество листьев, шт.	Ширина листьев, см.	Длина листьев, см.
Контроль	6,08a	9,8a	23,64a	21,52a
10^4	9,14b	12,8b	27,9bb	22,84b
10^5	10,02b	15,0c	28,76	24,36c
10^6	8,6b	12,0b	26,78b	24,06bc
$F_{\text{факт.}}$	4,286*	13,308*	12,151*	15,027*
HCP _{0,05}	2,52	1,81	2,51	1,23

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{meop}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дунканна.

Таблица 5.11 – Влияние инокуляции мериклонов картофеля сорта Кондор сусpenзией *A. brasiliense* sp7 перед высадкой в почву на морфометрические параметры на этапе адаптации *ex vitro*

Вариант опыта	Длина побега, см.	Количество листьев, шт.	Ширина листьев, см.	Длина листьев, см.
Контроль	17,93	8,18	16,56	23,1
10^8	15,84	8,35	15,61	22,71
$F_{\text{факт}}$	0,423	1,234	0,516	0,042
$HCP_{0,5}$	-	-	-	-

Бактеризованные перед высадкой стерильно выращенные микрорастения хризантемы превышали контрольные практически по всем морфологическим признакам за исключением количества листьев на побеге (Таблица 5.12).

Таблица 5.12 – Влияние инокуляции мериклонов хризантемы сорта Сноубол сусpenзией *A. brasiliense* sp7 перед высадкой в почву на морфометрические параметры на этапе адаптации *ex vitro*

Вариант опыта	Длина побега, см	Количество листьев, шт.	Ширина листьев, см.	Длина листьев, см.
Контроль	6,76а	12,5	16,73а	16,81а
10^8	7,3b	13,9	20,07b	22,22b
$F_{\text{факт.}}$	5,60*	0,622	8,19*	7,37*
$HCP_{0,05}$	0,3	-	2,1	2,6

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{meop.}}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

Таким образом, инокуляция побегов *A. brasiliense* sp7 на этапе культивирования *in vitro* и непосредственно перед высадкой в почву на условия *ex vitro* существенно

повышала способность к адаптации и темпы роста у хризантемы, но не влияла на аналогичные показатели у картофеля.

В следующей серии экспериментов инокуляция микрочеренков картофеля проводилась при посадке (на 0 сутки) двумя штаммами *A. brasiliense* sp7 и *A. baldaniorum* Sp245 в двух концентрациях 10^5 и 10^7 кл./мл питательной среды. После 20 суток культивирования проводился анализ морфометрических показателей растений.

Длина побегов картофеля (Таблица 5.13) в отличии от количества узлов на побеге (Таблица 5.14) достоверно не изменялась под влиянием инокуляции.

Таблица 5.13 – Влияние концентрации суспензии *A. brasiliense* sp7 и *A. baldaniorum* Sp245 на длину побега мериклонов картофеля сорта Кондор

Вариант опыта		Длина побега, мм				
		0 сутки	5 сутки	10 сутки	15 сутки	20 сутки
Контроль		44,27	62,5	80,93	87,33	55,3
sp7	10^5	37,33	48,9	54,6	71,83	75,47
	10^7	26,5	39,53	52,47	61,5	61,8
Sp245	10^5	38,33	59,27	69,1	80,5	83,27
	10^7	33,37	44,17	60,53	64,33	70,63
F _{факт.}		1,633	1,623	0,974	1,712	1,660
HCP _{0,05}		-	-	-	-	-

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

Таблица 5.14 – Влияние концентрации суспензии *A. brasiliense* sp7 и *A. baldaniorum* Sp245 на количества узлов на побегах у мериклонов картофеля сорта Кондор

Вариант		Количество узлов на побеге, шт.				
		0 сутки	5 сутки	10 сутки	15 сутки	20 сутки
Контроль		2,77	4,13	5,07	5,5ab	5,8a
sp7	10^5	3,17	3,47	5,1	5,8ab	6,5ab
	10^7	2,03	2,97	4,13	5,13a	5,3a
Sp245	10^5	2,7	3,93	5,2	6,57b	7,03bc
	10^7	2,1	4	4,6	5,43ab	5,9a
F _{факт.}		1,121	3,662	3,209	9,754*	6,557*
HCP _{0,05}		-	-	-	0,84	1,18

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

Достоверное увеличение количества узлов на побегах инокулированных растений отмечено в варианте с *A. baldaniorum* Sp245 (10^5 кл./мл) на 15 и 20 сутки культивирования. Остальные варианты не отличались от контроля. На рост корней положительное влияние инокуляции бактериями обнаружено на 20 сутки культивирования. Причем, количество корней увеличивалось в варианте с инокуляцией *A. brasiliense* sp7 в концентрации 10^7 (Таблица 5.15), а длина – при инокуляции обоими штаммами, но в концентрации 10^5 кл./мл (Таблица 5.16).

На этапе высадки микрорастений в сосуды с почвой был добавлен еще один вариант инокуляции штаммами: замачивание в суспензиях бактерий в концентрации 10^8 кл./мл непосредственно перед высадкой растений в почву. Через 10 суток анализировались морфометрические параметры побегов (Таблица 5.17).

Таблица 5.15 – Влияние концентрации суспензии *A. brasiliense* sp7 и *A. baldaniorum* Sp245 на количества корней у мериклонов картофеля сорта Кондор

Вариант		Количество корней, шт.				
		0 сутки	5 сутки	10 сутки	15 сутки	20 сутки
Контроль		3,13	3,27	4,17	4,67	4,77a
sp7	10^5	3,83	3,87	3,93	4,37	4,7a
	10^7	3,13	3,17	3,57	4,17	6,38b
Sp245	10^5	3,17	3,6	4,03	4,73	4,8a
	10^7	3,17	3,93	4,17	4,4	4,47a
F _{факт.}		0,561	0,330	2,497	0,398	4,751*
HCP _{0,05}		-	-	-	-	1,61

Примечание – «*» показывает достоверность различий опытного варианта с контрольным при уровне достоверности 95% ($p \leq 0,05$).

Таблица 5.16 – Влияние концентрации суспензии *A. brasiliense* sp7 и *A. baldaniorum* Sp245 на длину корней у мериклонов картофеля сорта Кондор

Вариант		Длина корней, мм				
		0 сутки	5 сутки	10 сутки	15 сутки	20 сутки
Контроль		35,5	39,33	43,8	47,43	43,97a
sp7	10^5	39,3	39,83	39,93	41,6	51,83b
	10^7	33,8	39,93	41,97	45,6	49,87ab
Sp245	10^5	31,7	38,2	38,47	46,1	55,83b
	10^7	33,87	36,5	41,1	40,2	49,5ab
F _{факт.}		3,492	3,036	1,196	1,112	7,561*
HCP _{0,05}		-	-	-	-	7,14

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{теор.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

Таблица 5.17 – Влияние инокуляции мериклонов картофеля сорта Кондор сусpenзией *A. brasiliense* sp7 и *A. baldaniorum* Sp245 на морфометрические параметры на этапе адаптации *ex vitro*

Варианты опыта		Длина побега, мм	Количество листьев, шт.	Длина листьев, мм	Ширина листьев, мм	Площадь листьев, мм^2
Контроль		67,40c	3,57	3,04a	2,01a	17,14a
sp7	10^5	63,71bc	3,73	3,67b	2,60b	27,94c
	10^7	32,71a	3,83	3,53ab	2,53b	26,85bc
	10^8	63,63bc	3,49	3,37ab	2,90c	26,77bc
Sp245	10^5	42,06ab	3,47	3,67b	2,28ab	22,80b
	10^7	59,37bc	3,47	3,32ab	2,72bc	24,60b
	10^8	52,25ab	3,47	3,93b	2,63bc	28,14c
$F_{\text{факт}}$		4,041*	1,131	8,349*	3,336*	5,327*
НСР _{0,5}		22,89	-	0,59	0,40	2,47

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{meop.}}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

Было установлено, что в двух вариантах инокуляции штаммами *A. brasiliense* sp7 (10^7) и *A. baldaniorum* Sp245 (10^5) побеги были существенно короче (соответственно на 51,2 и 37,6%), количество вновь образованных листьев не различалось по вариантам опыта, но размер листьев в большинстве вариантов инокуляции достоверно увеличивался.

Существенно увеличивалась ширина листовых пластин, а в ряде случаев и длина, что привело к достоверному превышению площади листьев во всех опытных вариантах по сравнению с контролем. Увеличение площади листьев составило от 33 до 87,5%. Варианты инокуляции *A. brasiliense* sp7 суспензиями с разной концентрацией клеток не различались между собой по данному показателю, а среди вариантов

инокуляции *A. baldaniorum* Sp245 по площади листьев выделился вариант с обработкой бактериями непосредственно при высадке растений в почву.

5.1.3 Зависимость времени инокуляции микрорастений в культуре *in vitro* от свойств бактериального штамма

Азоспириллы не утилизируют сахарозу из питательной среды для культивирования микрорастений и не вызывают контаминацию культуры *in vitro*. Опытным путем показано, что инокуляция этими штаммами может эффективно проводиться на самых ранних этапах культивирования, в том числе при черенковании (на 0 сутки культивирования). Для сравнения были использованы бактерии штамма, способного использовать в качестве углеводов сахарозу, а именно *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. Данный штамм был выделен непосредственно из корней картофеля сорта Невский, выращенного в условиях Саратовской области на каштановых почвах, идентифицирован молекулярно-биологическими методами и депонирован в коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ ФИЦ СНЦ РАН (<http://collection.ibppm.ru/>) под номером IBPPM544 и во Всероссийской коллекции сельскохозяйственных микроорганизмов ВНИИСХМ (<http://www.arriam.spb.ru/eng/lab10/>) под номером RCAM04481 [468].

Микрорастения картофеля сорта Невский, культивируемые на питательной среде М-С с добавлением агар-агара 7 г/л, инокулировали штаммами *A. brasiliense* sp7 и *O. cytisi* IPA7.2. Бактериальные суспензии были добавлены в среду культивирования микрорастений (10^6 кл/мл) на разных этапах культивирования растений *in vitro*: 1) в начале культивирования (при черенковании) – 0 сутки; 2) в середине стадии культивирования *in vitro* – 15 сутки.

В конце культивирования микрорастений в условиях *in vitro* (30 день) производили определение длины побега и корней, а также числа узлов и корней.

Использованные в работе бактериальные культуры ризосферных штаммов обладают разными биохимическим свойствами, проявляющимися, в частности, при внесение бактериальных культур в среду М-С. Штамм *A. brasiliense* sp7 не вызвал помутнение среды культивирования растений на всём протяжении экспе-

римента *in vitro*. О присутствии жизнеспособных бактериальных клеток на 15 и 30 дни после инокуляции можно было судить только в тестерных экспериментах по бактериальному обрастианию фрагментов корней на плотной питательной среде с иммунохимической идентификацией культуры. Бактерии в свободном состоянии в питательной среде не обнаруживались.

Совершенно другой эффект наблюдался после внесения в среду М-С инокулята *O. cytisi* IPA7.2. Вне зависимости от стадии развития микrorастений через сутки после инокуляции визуально выявлялся бактериальный рост с характерным помутнением среды культивирования. Иммунохимическими методами клетки *O. cytisi* IPA7.2 выявлялись и на корнях микrorастений и в среде культивирования.

В связи с этим, продолжение работы было связано с изучением влияния на микrorастения *in vitro* бактериальной инокуляции обоими рост-стимулирующими бактериями при бактеризации в различные сроки их культивирования: на стадии черенкования (0 сутки) и середины стадии *in vitro* (15 сутки).

При инокуляции ризобактериями штамма *A. brasiliense* sp7 микrorастений картофеля на стадии черенкования было выявлено рост-стимулирующее действие микроорганизмов на все исследованные параметры (на 64% – длина побега; на 60% – длина корня; на 33% – количество узлов; и на 58% – количество корней) (Таблица 5.18).

При инокуляции штаммом *A. brasiliense* Sp7 на 15 сутки культивирования микrorастений картофеля *in vitro* был выявлен значительно более слабый рост-стимулирующий эффект: достоверное увеличение наблюдалось только в длине побега (+19%) и в количестве корней (+14%) (Таблица 5.19).

Таким образом, для инокуляции микrorастений рост-стимулирующим штаммом *Azospirillum brasiliense* Sp7 наиболее оптимальным нами был признан вариант с внесением бактерий на стадии черенкования.

Инокуляция микrorастений картофеля *in vitro* на стадии черенкования штаммом *O. cytisi* IPA7.2 приводила к контаминации среды и ингибированию развития мериклонов. К концу стадии *in vitro* инокулированные микrorастения картофеля развивались, но по морфометрическим показателям отставали от стериль-

ных (неинокулированных) микрорастений (на 22% – длина побега; на 52% – длина корня; и на 20% – количество корней) (Таблица 5.20).

Таблица 5.18 – Влияние инокуляции штаммом *A. brasiliense* sp7 (0 сутки) на морфометрические показатели микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Длина побега, мм	Длина корня, мм	Количество узлов, шт.	Количество корней, шт.
Контроль	57,50a	47,25a	7,55a	5,05a
sp7	94,50b	75,50b	10,05b	8,00b
F _{факт.}	4107,000*	2016,158*	1251,327*	3484,690*
HCP _{0,05}	1,84	2,00	0,23	0,16

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

Таблица 5.19 – Влияние инокуляции штаммом *A. brasiliense* sp7 (15 сутки) на морфометрические показатели микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Длина побега, мм	Длина корня, мм	Количество узлов, шт.	Количество корней, шт.
Контроль	89,05a	62,55	9,00	7,65a
sp7	106,00b	64,10	9,15	8,75b
F _{факт}	314,650*	1,321	0,074	33,179*
HCP _{0,05}	12,07	-	-	0,77

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

Таблица 5.20 – Влияние инокуляции штаммом *O. cytisi* IPA7.2 (0 сутки) на морфометрические показатели микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Длина побега, мм	Длина корня, мм	Количество узлов, шт.	Количество корней, шт.
Контроль	51,00 б	42,00 с	5,5	4,5 б
IPA7.2	39,67 а	20,00 а	5,3	3,6 а
F _{факт.}	355,480*	1970,454*	0,354	1083,597*
HCP _{0,05}	2,10	1,5	-	0,09

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

В то же время инокуляция бактериями штамма *O. cytisi* IPA7.2 микрорастений картофеля в середине стадии *in vitro* сопровождается проявлением рост-стимулирующих свойств этих бактерий (на 34% – длина побега; на 7% – количество узлов; и на 16% – количество корней) (Таблица 5.21). Единственным показателем, для которого было выявлено достоверное ингибирование при инокуляции, была длина корня микрорастений (-8%).

По результатам проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что рост-стимулирующий потенциал бактерий *O. cytisi* IPA7.2 проявляется только при инокуляции сформировавшихся микрорастений картофеля. В то время как, бактеризация черенков картофеля отрицательно сказывается на развитии микрорастений. Возможно, быстрое размножение бактерий проводит к усилиению микробного «давления» на растительные клетки, что негативно влияет на формирование микрорастения из черенка.

Таблица 5.21 – Влияние инокуляции штаммом *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки) на морфометрические показатели микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Длина побега, мм	Длина корня, мм	Количество узлов, шт.	Количество корней, шт.
Контроль	53,45а	78,50б	8,05а	7,10а
IPA7.2	71,50 б	72,25а	8,60 б	8,25б
F _{факт.}	3940,408*	101,400*	33,045*	31,117*
HCP _{0,05}	0,92	2,05	0,30	0,66

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

Отсутствие негативного влияния *A. brasiliense* sp7 на растения при инокуляции на стадии черенкования может быть обусловлено как низкой концентрацией бактериальных клеток, в связи с неспособностью азоспирилл развиваться на среде М-С, так и с низким уровнем активации фитоиммунных реакций клетками азоспирилл, обусловленных особенностями строения их биополимеров [27, 224, 334].

Особого внимания заслуживает тот факт, что в экспериментах выявлено положительное влияние ризобактерий штамма *O. cytisi* IPA7.2 при значительном увеличении количества бактерий в среде культивирования растений при инокуляции в середине стадии *in vitro*. Активное размножение рост-стимулирующих бактерий в среде культивирования растений не приводит к ингибированию роста растений, а даже, наоборот, его стимулирует.

5.1.4 Влияние состава питательной среды на создание и функционирование растительно-микробных ассоциаций при микроклональном размножении

В ходе проведенного исследования было изучено влияние состава питательной среды на создание активно функционирующей ассоциации микроклонов картофеля

сорта Кондор с бактериями *A. baldaniorum* Sp245 (концентрация 10^6 кл./мл) в культуре *in vitro*. В эксперименте использовали несколько вариантов питательной среды М-С без гормонов: 1) с полным составом солей по прописи М-С, 2) с уменьшенным в 2 раза содержанием солей по прописи М-С, 3) без соединений азота в составе солей по прописи М-С. Каждый из вариантов использовали в трех комбинациях: а) жидккая среда без агар-агара, б) полужидкая среда с содержанием агар-агара 3,5 г/л и в) твердая среда с содержанием агар-агара 7 г/л. Контролем служили стерильно выращенные микrorастения.

После инокуляции микрочеренков картофеля суспензией бактерий *A. baldaniorum* Sp245 в течение 20 суток наблюдали процесс роста растений. На 5 сутки на всех микрочеренках начиналось образование 1-3 корешков и трогалась в рост пазушная почка.

Проведенные ранее исследования показали, что ризосферные бактерии *A. baldaniorum* Sp245 способны стимулировать рост микrorастений *in vitro*, в первую очередь, по показателю интенсивности закладки и роста корней [83]. В данных экспериментах сравнение морфологических параметров опытных и контрольных вариантов показало, что эффективность ассоциативного взаимодействия зависит от условий культивирования.

По результатам средних данных трех экспериментов установлено, что на питательной среде, не содержащей источники азота, как и предполагалось, наблюдается процесс угнетения роста микрочеренков картофеля. После 20 суток культивирования в стерильных условиях на твердой, полужидкой и жидкой средах сформировалось менее 4 узлов на побеге длиной 1-2 см и 3-5 корней длиной не более 4,5 см (Таблица 5.22).

Инокуляции микрочеренков картофеля суспензией бактерий *A. baldaniorum* Sp245 в этих условиях не привела к стимуляции ростовых процессов. Опытные и контрольные варианты не различались достоверно по количеству узлов на побегах, и по другим признакам. В некоторых вариантах наблюдалось даже уменьшение ростовых параметров. Видимо, в условиях культуры *in vitro* клетки *A. baldaniorum* Sp245 не способны фиксировать достаточное количество атмосферного азота, чтобы обес-

печить потребности растения в этом элементе. Консистенция среды существенного влияния на показатели роста побегов не оказала, только длина корней у побегов на жидкой среде в контрольном варианте достоверно превосходила другие варианты по этому показателю.

Таблица 5.22 – Влияние бактерий *A. baldaniorum* Sp245 на рост микрорастений картофеля в культуре *in vitro* на среде без минерального источника азота

Вариант опыта		Количе-ство узлов, шт.	Длина побега, мм.	Количе-ство корней, шт.	Длина корней, мм.
Без агара (жидкая среда)	контроль	3,74	19,40c	3,47ab	36,81c
	Sp245	3,17	10,34ab	3,42ab	17,41ab
Агар 3,5 г/л (полужидкая среда)	контроль	3,65	16,59bc	4,56b	22,99b
	Sp245	2,51	9,05a	2,58a	15,00a
Агар 7 г/л (твердая среда)	контроль	3,87	14,62abc	3,50ab	17,89ab
	Sp245	3,09	10,22ab	2,66a	11,62a
$F_{\text{факт.}}$		1,099	11,413*	6,114*	17,583*
$HCP_{0,05}$		-	7,33	1,68	6,77

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

На среде с полным составом макро- и микросолей (Таблица 5.23) достоверные различия между бактеризованными и стерильными растениями на 20 сутки культивирования наблюдались по количеству узлов на побеге только в одном варианте (с

твёрдой консистенцией среды), по длине побега и количеству корней во всех вариантах и по длине корней на жидкой и полужидкой среде.

Таблица 5.23 – Влияние бактерий *A. brasiliense* Sp245 на рост микрорастений картофеля в культуре *in vitro* на среде Мурасиге–Скуга с полным и уменьшенным (вдвое) содержанием макро- и микросолей при различном содержании агара

Вариант опыта		Количество узлов, шт.	Длина побега, мм.	Количество корней, шт.	Длина корня, мм.	
MS полная	жидкая среда	контроль	6,46 а	40,29 а	4,63 ab	
		опыт	6,91 а	56,29 с	7,17 gh	
	полужидкая среда	контроль	6,53 а	47,87 b	5,23 b	
		опыт	7,88 ab	75,08 fgh	6,97 fgh	
	твёрдая среда	контроль	7,4 ab	51,26 bc	4,47 a	
		опыт	9,44 cde	62,72 d	6,63 efgh	
	жидкая среда	контроль	7,17 ab	53,93 bc	5,30 bc	
		опыт	7,57 ab	55,27 с	6,40 ef	
	полужидкая среда	контроль	7,2 ab	54,19 bc	6,00 cde	
		опыт	8,58bcd	77,73 h	7,37 h	
	твёрдая среда	контроль	9,62 de	75,07 efgh	6,17 de	
		опыт	10,74 e	75,54 gh	6,37 ef	
$F_{\text{факт.}}$		8,261*	41,328*	6,358*	14,151*	
$HCP_{0,05}$		1,69	8,53	0,90	10,02	

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

Во всех случаях величины показателей у бактеризованных растений превышали аналогичные значения стерильных растений: по количеству узлов на 27,6%; по длине побега на твёрдой среде на 22,3%, на жидкой среде на 39,7%, на полужидкой

среде на 58,8%; по количеству корней на полужидкой среде на 33,3%, на твердой среде на 48,3% и на жидкой среде на 54,9%; по длине корня на полужидкой среде на 27,9% и на жидкой среде на 80,4%.

На обедненной питательной среде с половинным содержанием макро- и микросолей по прописи Мурасиге-Скуга у стерильных растений в ряде вариантов наблюдалось стимулирование ростовых процессов по сравнению с вариантами с полным составом солей, что, возможно, является компенсаторной реакцией на стресс. Достоверное стимулирование ростовых процессов у побегов картофеля в результате инокуляции их азоспириллами наблюдалось по длине побегов и количеству корней на полужидкой питательной среде соответственно на 43,4 и 22,8%, а также по количеству корней на среде без агар-агара на 20,8%.

Полученные данные показали, что при инокуляции микрочеренков картофеля суспензией бактерий *A. baldaniorum* Sp245 в условиях достаточного и оптимального питания наблюдается стимулирование роста микрорастений, что проявляется в увеличении в первую очередь длины побега (в среднем на 40%) и количества корней (в среднем на 36%). Вероятно этот эффект является следствием выделения бактериями ауксинов, что стимулирует закладку корней, и гиббереллинов, вызывающих растяжение побегов без формирования дополнительных узлов и листьев.

Предпочтительное использование полужидкой среды с содержанием агар-агара 3,5 г/л, по-видимому, связано с созданием оптимальных условий для обеспечения подвижности азоспирилл, то есть создания эффекта «роения» (так называемого Swa-фенотипа), что повышает степень колонизации макросимбионта [57].

5.1.5 Сохранность бактерий рода *Azospirillum* на микроклонах картофеля при микроклональном размножении

Была изучена устойчивость ассоциаций картофеля сорта Невский со штаммами рода *Azospirillum* в условиях *in vitro*. Коллекционные штаммы, не растущие на среде с сахарозой, и не вызывающие зарастания среды культивирования мик-

рорастений, были проанализированы на рост-стимулирующую активность по отношению к картофелю в условиях *in vitro*. Культуры штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasiliense* Sp7, S27, SR80 и SR88 были использованы для инокуляции картофеля с последующим клonalным размножением полученных микрорастений в течение 5 поколений. Установлено, что в процессе пассирования все пять штаммов сохранялись в ассоциации с растениями в течение всего эксперимента (Рисунок 5.10). После пятого пассажа наблюдалось обрастание корней, частей стебля и листьев. Это позволяет предполагать, что бактерии являются эндофитами, перемещаются по растению в процессе культивирования в пассаже и сохраняются в тканях растения.

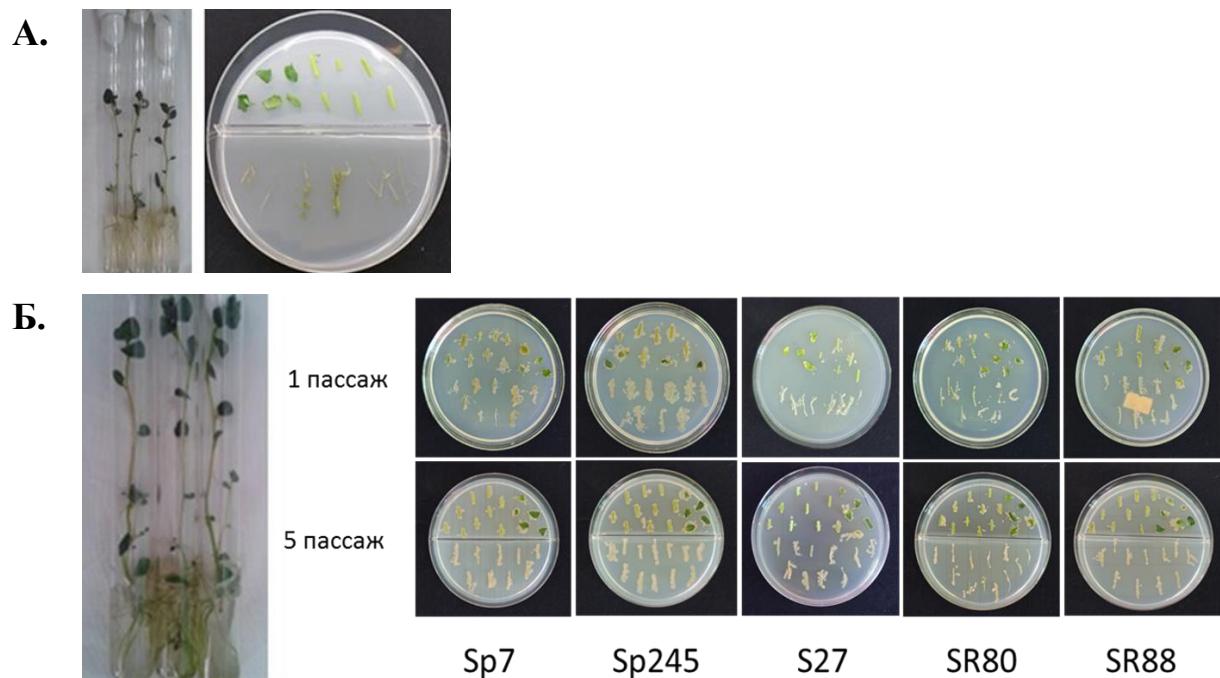


Рисунок 5.10 – Микробиологический тест наличия бактерий в тканях микрорастений: А. – выращенных стерильно (контроль); Б. – инокулированных в 1 пассаже штаммами бактерий *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasiliense* Sp7, S27, SR80 и SR88

Анализ морфометрических параметров растений, инокулированных штаммом *A. baldaniorum* Sp245 в первом и пятом пассажах показал, что они обладают лучшими ростовыми характеристиками по сравнению со стерильно выращенными растениями. В условиях *in vitro* (Таблица 5.24) опытные растения в 1 и 5 пассажах

имели большую длину побегов по сравнению с контролем соответственно на 10,7 и 8,8% и массу побегов на 49,1 и 47,3%. Количество узлов было большим у инокулированных растений в 1 пассаже на 8,7%, а количество корней – в 5 пассаже на 16,6%.

Таблица 5.24. – Анализ морфометрических параметров в ассоциациях картофеля сорта Невский со штаммом *A. baldaniorum* Sp245 в условиях *in vitro*

Вариант	Длина побега, см	Количество узлов, шт.	Количество корней, шт.	Масса растения, г
Контроль	5,65а	6,87а	8,00а	0,55а
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (1 пассаж)	6,26б	7,47б	8,77аб	0,82б
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (5 пассаж)	6,15б	7,30аб	9,33б	0,81б
F _{факт.}	4,91*	3,42*	3,84*	27,1*
HCP _{0,05}	0,41	0,47	0,96	0,08

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

После высадки и выращивания в почве (Таблица 5.25) достоверное превышение инокулированных растений по сравнению с контрольными наблюдалось по длине побега после 1 пассажа культивирования на 10,5% и по количеству листьев после 1 и 5 пассажей культивирования соответственно на 13,0 и 16,4%. Не установлено достоверных отличий контрольных и опытных растений по сырой массе побегов, но после 1 пассажа наблюдалось снижение сырой массы корней на 31,0%, а после 5 пассажей различий с контролем по данному показателю не наблюдалось.

Таблица 5.25. Анализ морфометрических параметров в ассоциациях картофеля сорта Невский со штаммом *A. baldaniorum* Sp245 в условиях *ex vitro*

Вариант	Длина побега, см	Количество листьев, шт.	Сырая масса побегов, г	Сырая масса корней, г
Контроль	19,0a	6,33a	6,22	1,81b
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (1 пассаж)	21,0b	7,15b	6,55	1,25a
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (5 пассаж)	20,1ab	7,37b	6,24	1,72b
F _{факт.}	5,59*	6,70*	0,36	6,49*
HCP _{0,05}	1,28	0,59	-	0,35

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

В результате исследований показано, что бактерии рода *Azospirillum* сохраняются в ряду последовательных пассажей при однократной инокуляции, что делает методику стимулирования роста растений при микроклональном размножении с применением ассоциативных микроорганизмов высоко технологичной. Кроме того, ассоциированные бактерии сохраняют ростостимулирующую способность в отношении микрорастений в процессе пассирования и в культуре *in vitro* и при адаптации микрорастений в условиях *ex vitro*.

5.1.6 Влияние *Azospirillum baldaniorum* Sp245 на микроклоны картофеля различных генотипов при микроклональном размножении

Данные о стимулирующем эффекте ризосферных рост-стимулирующих бактерий на рост микрорастений картофеля в культуре *in vitro* и адаптационную способность микроклонов на этапе адаптации к условиям *ex vitro* в почве позво-

лили предположить возможность оптимизации технологии получения оздоровленного посадочного материала картофеля (микро-клубней) с использованием PGPR-бактерий. Для проверки гипотезы были проведены трехлетние (2012-2014 гг.) исследования влияния активно функционирующей ассоциации микроклонов картофеля четырех сортов (Невский, Кондор, Розара и Аврора) с бактериями *A. baldaniorum* Sp245 в культуре *in vitro* и оценка влияния бактеризации на эффективность адаптации и выращивания растений в условиях *ex vitro*, в том числе продуктивность растений в открытом грунте. Инокуляция бактериями проводилась на этапе микрочеренкования суспензией с получением концентрации бактерий в пробирках с растениями 10^6 кл./мл.

После инокуляции микрочеренков картофеля суспензией бактерий *A. baldaniorum* Sp245 в течение 20 суток наблюдали процесс роста растений. На 5 сутки на всех микрочеренках начиналось образование 1-3 корешков и трогалась в рост пазушная почка. Образования помутнения вокруг черенков, бактериальных пленок на поверхности среды или иных признаков контаминации в опытных пробирках не наблюдалось.

На 20 сутки культивирования были измерены морфологические параметры опытных и контрольных вариантов. В результате проведения двухфакторного дисперсионного анализа было установлено, что бактеризованные растения всех четырех сортов на 20 сутки культивирования сформировали большее число узлов и корней по сравнению со стерильными побегами (Таблица 5.26). Кроме того, бактеризованные растения сортов Кондор, Розара и Невский превосходили стерильные и по средней длине корней. Только у сорта Аврора средняя длина корней опытных растений достоверно не отличалась от контрольных вариантов.

По длине побега различия между вариантами достоверно не различались. Но анализ по фактору А (влияние бактерий) показал, что в среднем по всем генотипам бактеризация оказывает существенное положительное влияние на все рассмотренные параметры, в том числе и на длину побега.

Таблица 5.26 – Влияние *A. baldaniorum* Sp245 на рост микрорастений четырех сортов картофеля в культуре *in vitro*

Сорт	Вариант опыта	Количество узлов, шт.		Длина побега, мм		Количество корней, шт.		Длина корня, мм			
		по вариантом	в среднем по фактору А	по вариантом	в среднем по фактору А	по вариантом	в среднем по фактору А	по вариантом	в среднем по фактору А		
Кондор	контроль	4,76a	5,43a	38,53	47,23	5,16a	6,21b	48,32cd	51,23c		
	опыт	6,18cd		55,92		7,25cde		54,14e			
Аврора	контроль	6,13bcd	6,81d	44,03	48,44	5,03a	6,18ab	37,32a	39,55a		
	опыт	7,48f		52,85		7,33de		41,78a			
Невский	контроль	4,91a	5,82b	48,58	51,51	4,80a	5,66a	41,75a	44,54b		
	опыт	6,72de		54,43		6,52bcde		47,33bcd			
Розара	контроль	4,80a	6,06c	66,98	69,96	4,92a	6,15ab	41,90a	45,17b		
	опыт	7,32ef		72,93		7,37e		48,43d			
В среднем по фактору В	контроль	5,94a			47,83a			44,85a			
	опыт	6,14b			60,73b			45,39b			
$F_{\text{факт. по вариантам}}$		27,646*			2,266			19,243*			
$HCP_{0,05}$ по вариантам		0,71			-			0,90			
								4,69			

Продолжение таблицы 5.26

$F_{\text{факт.}}$ фактор А (генотип)	7,862*	5,868*	12,378*	10,294*
$HCP_{0,05}$ фактор А (генотип)	0,12	12,59	0,14	0,37
$F_{\text{факт.}}$ фактор В (инокуляция)	56,630*	2,251	43,322*	21,033*
$HCP_{0,05}$ фактор В (инокуляция)	0,50	-	0,63	3,31
$F_{\text{факт.}}$ взаимодействие АВ	7,256*	1,080	0,784	13,025*
$HCP_{0,05}$ взаимодействие АВ	0,71	-	-	4,685

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{теор.}}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана; фактор А – генотип, фактор В – инокуляция бактериями.

Эффект генотипа (фактор В) также был существенным по большинству показателей, кроме длины побега (Рисунок 5.11).

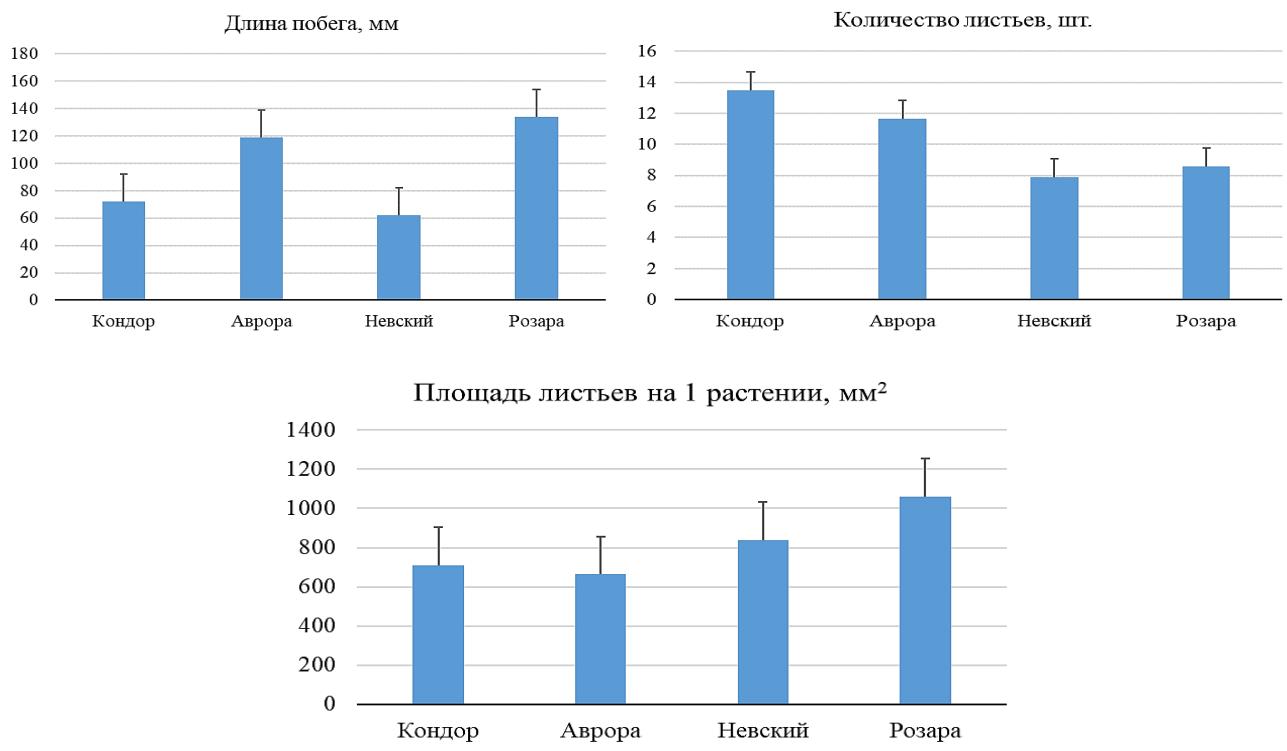


Рисунок 5.11 – Эффект генотипа микрорастений сортов картофеля на влияние *A. baldaniorum* Sp245 в культуре *in vitro*

На 20 сутки культивирования был определен митотический индекс клеток корневых меристем микроклонов картофеля сорта Кондор контрольных и опытных вариантов. Было установлено, что митотический индекс меристематических клеток корня бактеризованных растений был в 1,8 раза выше, по сравнению с контрольными вариантами (Рисунок 5.12).

На 20 сутки культивирования проводили также выявление бактерий на корнях микроклонов картофеля. В микробиологическом тесте было показано, что в опытных вариантах сегменты корней покрывались бактериальным налетом на 3 сутки культивирования в чашках Петри на среде MSM (Рисунок 5.13а). В иммунохимической тест-системе с использованием штамм-специфичных антител (Рисунок 5.13б) эти бактерии были идентифицированы как штамм *A. baldaniorum* Sp245.



Рисунок 5.12 – Митотический индекс меристематических клеток корня бактеризованных растений

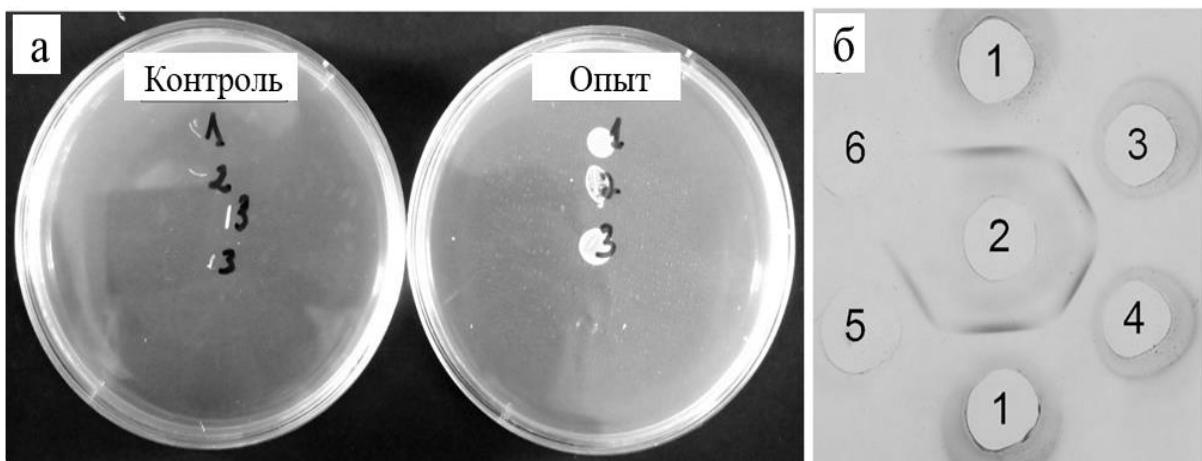


Рисунок 5.13 – Выявление бактерий *A. baldaniorum* Sp245 в микробиологическом тесте (а) и иммунохимической тест-системе (б). а: 1,2,3, – сегменты корней из 20-суточных микроклонов картофеля в культуре *in vitro*; б: 1 – экстракт контрольных бактерий; 2 – антитела; 3,4,5, – экстракти бактерий из зон обрастаания корней

На этапе высадки микrorастений в сосуды с почвой в оранжерее были созданы достаточно благоприятные условия, позволяющие снизить стресс акклиматизации. В связи с этим все растения в течение суток после переноса в сосуды с почвой восстановили тургор. На 3 сутки появились признаки формирования нового листа. Приживаемость составила 100%, что не позволило судить о влиянии бактерий на данном этапе. Но после 10 суток акклиматизации между бактеризованными и стерильными растениями наблюдались некоторые различия (Таблица 5.27).

Таблица 5.27 – Влияние *A. baldaniorum* Sp245 на рост микрорастений четырех сортов картофеля на этапе адаптации к условиям *ex vitro*

Сорт	Вариант опыта	Количество листьев, шт.		Длина побега, мм		Площадь листьев на 1 расстении, мм ²		
		по вариантуам	в среднем по фактору А	по вариантуам	в среднем по фактору А	по вариантуам	в среднем по фактору А	
Кондор	контроль	11,92de	13,47c	68,65a	71,98a	595,50a	663,83b	
	опыт	15,02f		75,31a		732,15ab		
Аврора	контроль	10,98cde	11,66b	96,03b	118,84b	691,50ab	382,26a	
	опыт	12,34e		141,65e		73,01ab		
Невский	контроль	7,31a	7,87a	59,90a	62,27a	903,00b	1060,5c	
	опыт	8,42ab		64,64a		1218,00c		
Розара	контроль	7,25a	7,98a	133,40de	133,98c	696,90ab	839,7bc	
	опыт	8,70bc		134,56cde		982,50bc		
В среднем по фактору В	контроль	9,13a	89,81a		721,72a			
	опыт	11,43b	103,75b		915,91b			
$F_{\text{факт. по вариантам}}$		21,096*	41,786*		6,218*			
$HCP_{0,05}$ по вариантам		1,68	15,24		272,71			
$F_{\text{факт. фактор А (генотип)}}$		24,369*	13,511*		11,344*			

Продолжение таблицы 5.27

HCP _{0,05} фактор А (генотип)	0,84	7,62	136,36
F _{факт.} фактор В (инокуляция)	39,747*	85,059*	9,470*
HCP _{0,05} фактор В (инокуляция)	1,19	10,77	192,84
F _{факт.} взаимодействие AB	1,353	7,937*	1,258
HCP _{0,05} взаимодействие AB	-	15,237	-

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{теор.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дунканна; фактор А – генотип, фактор В – инокуляция бактериями.

В частности, у бактеризованных растений сортов Аврора и Розара отмечено статистически достоверное различие в увеличении количества узлов и листьев, у сорта Кондор – длины побега, а у сорта Невский – площади листьев по сравнению с контрольными вариантами. В среднем по всем генотипам создание ассоциации между растениями и ризосферными бактериями (фактор А) существенно повысило скорость роста побегов как за счет увеличения их длины, так и формирования новых узлов с листьями, а также площади поверхности листьев.

В результате после 10 дней выращивания микрорастений в сосудах с почвой в оранжерее наблюдалось не только восстановление тургора стеблей и листьев, но и формирование новых 2-3 листьев. Это позволило судить о завершении процесса акклиматизации растений, полученных *in vitro* к условиям выращивания в почве (*ex vitro*).

Средние значения признаков по генотипам представлены на рисунке 5.14.

Далее растения высаживали в открытый грунт. В неконтролируемых стрессовых условиях наблюдалась значительная гибель растений от 75 до 88%. Результаты исследований показали, что бактеризованные растения намного лучше перенесли стрессовое воздействие окружающей среды. У всех исследуемых генотипов и в среднем по генотипам показатель приживаемости (доля в процентах) бактеризованных растений превысил аналогичный показатель для стерильных растений в 1,5 раза (Рисунок 5.15).

Растения, которые адаптировались к условиям выращивания в открытом грунте, приступили к формированию новых листьев и стеблей. В фазу бутонизации и начала цветения при окончании формирования вегетативной массы была измерена площадь листьев растений и установлено статистически значимое превышение этого показателя у бактеризованных растений по сравнению с контрольными (Таблица 5.28). Этот факт установлен как для всех сортов по отдельности, так и в среднем по генотипам.

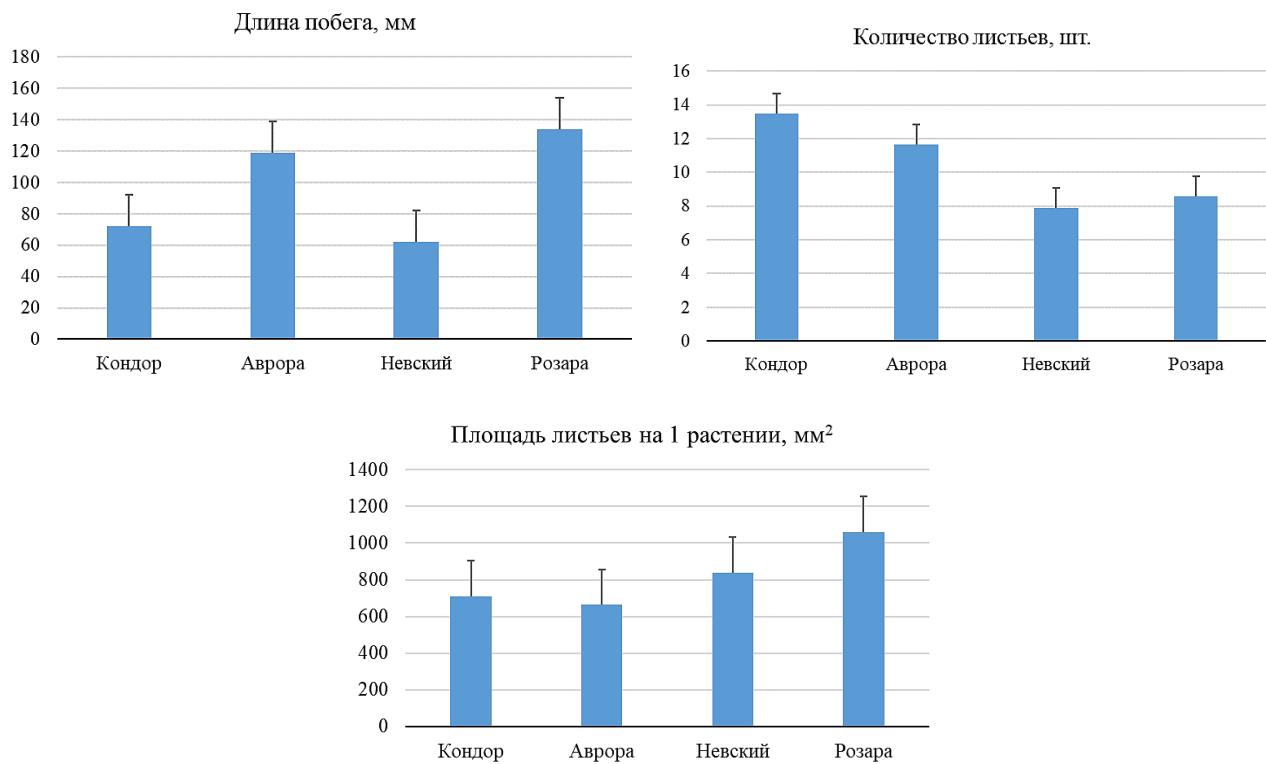


Рисунок 5.14 – Эффект генотипа микрорастений сортов картофеля на влияние *A. baldaniorum* Sp245 в условиях *ex vitro*

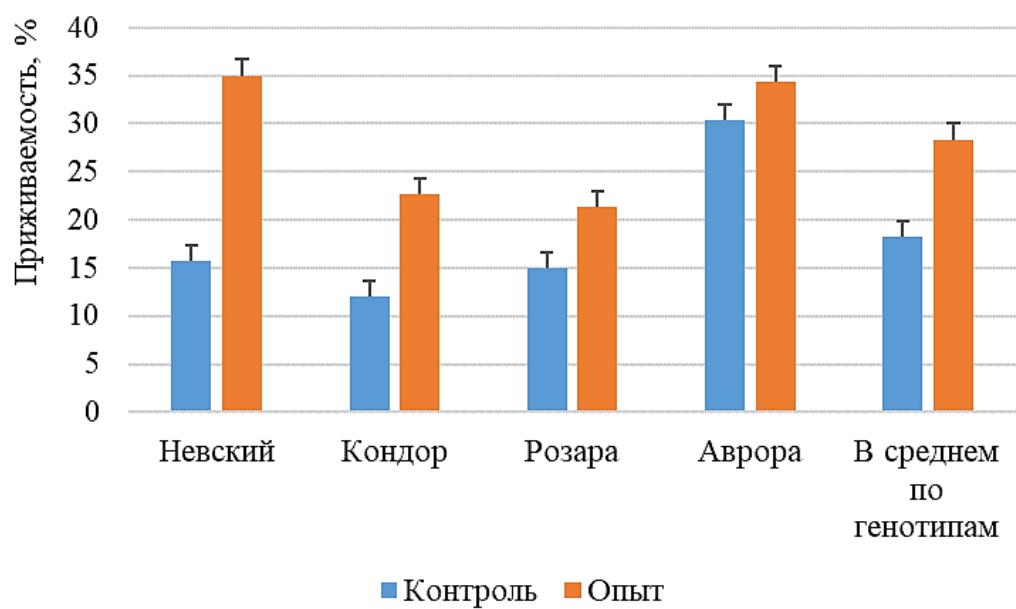


Рисунок 5.15 – Влияние *A. baldaniorum* Sp245 на приживаемость микрорастений четырех сортов картофеля в открытом грунте (*in vivo*)

Таблица 5.28 – Влияние *A. baldaniorum* Sp245 на рост, урожайность и элементы структуры урожая четырех сортов картофеля в открытом грунте (*in vivo*)

Сорт	Вариант опыта	Площадь листьев на 1 растении, дм ²		Количество клубней с 1 растения, шт.		Масса клубней с 1 растения, кг		Урожайность клубней, кг с 1 м ²		
		по вариантам	в среднем по фактору A	по вариантам	в среднем по фактору A	по вариантам	в среднем по фактору A	по вариантам	в среднем по фактору A	
Кондор	контроль	5,99a	10,58a	7,75a	9,10a	0,32ab	0,42a	2,25b	3,48a	
	опыт	15,16b		10,45ab		0,52cd		4,70e		
Аврора	контроль	6,78a	10,65a	11,06ab	14,41b	0,28ab	0,42a	2,78c	5,91ab	
	опыт	14,52b		17,75d		0,56cd		9,04f		
Невский	контроль	7,96a	16,98b	6,25a	8,00a	0,29a	0,36a	1,55a	2,64a	
	опыт	25,99b		9,75ab		0,42b		3,73d		
Розара	контроль	6,87a	8,61a	14,62c	15,50b	0,73d	0,75b	9,82g	10,41b	
	опыт	10,35b		16,38cd		0,76d		11,00h		
В среднем по фактору B	контроль	6,90a			10,36a			3,83a		
	опыт	16,50b			13,14b			7,12b		

Продолжение таблицы 5.28

$F_{\text{факт. по вариантам}}$	4,013*	6,934*	9,143*	6,841*
$HCP_{0,05}$ по вариантам	1,10	4,588	0,22	0,51
$F_{\text{факт. фактор A (генотип)}}$	2,326	11,566*	31,254*	12,381*
$HCP_{0,05}$ фактор A (генотип)	-	2,29	0,23	3,01
$F_{\text{факт. фактор B (инокуляция)}}$	16,189*	6,374*	12,771*	9,365*
$HCP_{0,05}$ фактор B (инокуляция)	5,60	2,49	0,32	4,80
$F_{\text{факт. взаимодействие AB}}$	1,642	1,367	2,365	6,582*
$HCP_{0,05}$ взаимодействие AB	-	-	-	1,24

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{теор.}}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дунканна; фактор A – генотип, фактор B – инокуляция бактериями.

В фазу увядания ботвы было определено количество клубней и их масса в расчете на одно растение картофеля (Таблица 5.28). Полученные данные показали, что для большинства генотипов, кроме сорта Аврора, количество сформированных клубней у опытных и контрольных растений существенно не различалось, и в большей степени зависело от особенностей генотипа сорта (Рисунок 5.16). При этом анализ по фактору А (влияние бактерий) все же показал, что в среднем по генотипам бактеризация приводила к повышению числа клубней на одном растении (Таблица 5.28). У всех исследуемых генотипов (кроме сорта Розара), а также в среднем по сортам бактеризованные растения формировали биомассу клубней «масса клубней с 1 растения», в среднем на 40% превышающую соответствующий показатель контрольных растений. При пересчете урожайность клубней с 1 м² достоверно увеличивалась по всем сортам и в среднем по каждому генотипу более, чем на 45% в результате бактеризации микрорастений в культуре *in vitro*.

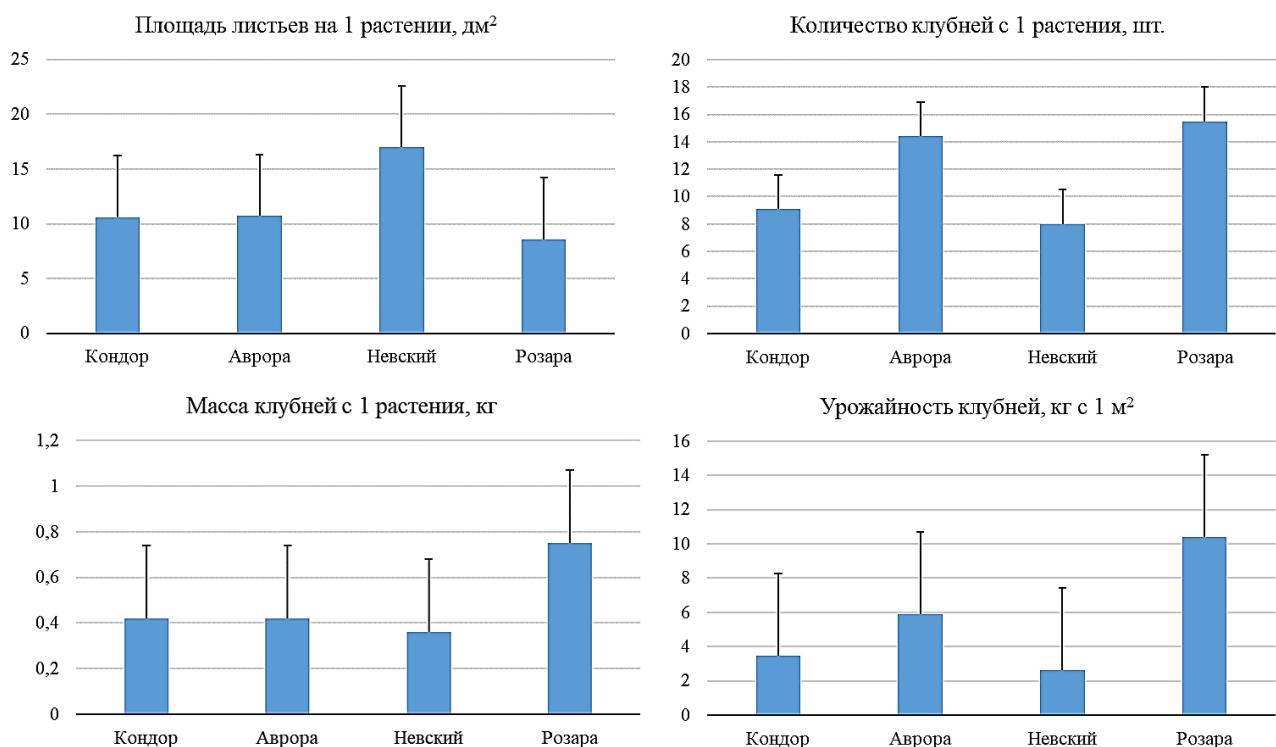


Рисунок 5.16 – Эффект генотипа микрорастений сортов картофеля на влияние *A. baldaniorum* Sp245 в открытом грунте (*in vivo*)

В данной работе исследовалось влияние на растения взаимодействий бактерий *A. baldaniorum* Sp245 с микроклонами картофеля в условиях *in vitro* и в процессе дальнейшей адаптации полученных регенерантов к условиям *ex vitro*. Для этого использовалось комбинирование методов микробной колонизации и микреклонального размножения растений *in vitro*. Следует заметить, что инокуляция бактериями проводилась не на стадии завершения этапа культивирования *in vitro* перед высадкой растений в почву, а еще в процессе их культивирования в культуре *in vitro*, в условиях отсутствия возможной конкуренции с нежелательными микроорганизмами, что способствовало образованию прочной ассоциативной связи бактерий с корневой системой микроклонов картофеля (Рисунок 5.13).

В частности, было показано, что азоспириллы усиливали митотическую активность клеток корневых меристем микроклонов картофеля (Рисунок 5.12), что согласуется с данными, полученными ранее при бактеризации проростков пшеницы в экспериментах *in vivo* [152, 224], а также в экспериментах по бактеризации микрорастений картофеля и хризантемы, описанных выше. Можно предположить, что усиление митотической активности клеток корневых меристем микроклонов картофеля приводило к активизации морфогенетической программы развития регенерантов, что и наблюдалось при определении морфологических параметров бактеризованных растений на 20 сутки культивирования (Таблица 5.26). Следует отметить также, что полученные нами данные согласуются с результатами работы [24], также посвященной созданию и изучению активно функционирующих растительно-микробных ассоциаций с участием азоспирилл в культуре *in vitro*. В частности, по данным [24] инокуляция микроклонов картофеля бактериями рода *Azospirillum* приводила к повышению интенсивности развития побегов в 1,5-2 раза и корней в 2-2,5 раза. По данным проведенных экспериментов, темпы роста растений, инокулированных бактериями, также увеличивались по сравнению с контрольными вариантами. В частности, бактеризованные растения отличались более развитой корневой системой с большим количеством точек роста (Таблица 5.26).

В отличии от работы [24] исследование влияния бактерий рода *Azospirillum* было расширено на рост различных генотипов картофеля в культуре *in vitro* и оценена их адаптация к условиям *ex vitro*.

В результате бактеризации *in vitro* на следующем этапе из культуры в почву были высажены нестерильные растения, а активно функционирующая стабильная ассоциативная система «растение – микроорганизм». По полученным данным растения картофеля достаточно успешно перенесли высадку в грунт в контролируемых условиях оранжереи. При этом в жестких стрессовых условиях после высадки в открытый грунт при значительном колебании суточных температур, существенном снижении влажности воздуха и повышенной интенсивности солнечного света эффект бактеризации проявился в значительной степени (Рисунок 5.15). По-видимому, разветвленная корневая система бактеризованных растений позволила им быстрее укорениться и обеспечить себя водой и минеральными компонентами.

Кроме рост-стимулирующего действия некоторые штаммы бацилл, метиlobактерий и псевдомонад оказывают влияние на формирование устойчивости растений к стрессовым факторам [20, 157]. Известно, что бактерии *A. baldaniorum* Sp245 повышают устойчивость пшеницы к осмотическому стрессу, улучшая способность к поглощению воды и элементов питания, а также способствуют формированию корневых волосков у томата [212].

Предположительно, кроме рост-стимулирующего действия, азоспириллы, также как метиlobактерии и псевдомонады, способны индуцировать у полученных регенерантов картофеля системную устойчивость к стрессовым факторам. В экспериментах бактеризованные растения быстрее перешли на стадию вегетативного роста за счет повышенной адаптационной способности, сформировали большее число листьев с увеличенной площадью поверхности (Таблица 5.27). Более развитая ассимиляционная поверхность листьев позволила синтезировать большее количество органических веществ. Результаты экспериментов показали, что существенного влияния на закладку клубней бактерии практически не оказывали. При этом масса клубней у опытных растений существенно увеличилась по

сравнению с контрольными (Таблица 5.28). Следовательно, повышение адаптационной способности растений в ассоциации с бактериями не только позволило повысить их приживаемость, но привело также к увеличению урожайности клубней (Таблица 5.28).

5.1.7 Изучение ответных реакций растений на инокуляцию чистыми культурами бактерий и ко-инокуляцию двумя штаммами бактерий различных таксономических групп

В серии экспериментов, описанных выше, было показано, что чистые культуры ассоциативных ризобактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2. обладают способностью стимулировать рост микрорастений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro* [341, 468]. Некоторые авторы отмечают, что совместная инокуляция растений двумя и более штаммами ризосферных стимулирующих рост растений бактерий (PGPR) может быть более эффективной по сравнению с чистыми культурами [357]. При инокуляции консорциумами штаммов важно учитывать совместимость бактериальных культур [133]. В следующей серии экспериментов изучались ассоциации картофеля сорта Невский с бактериальными штаммами по отдельности и совместно двумя штаммами ризобактерий различных таксономических групп в условиях *in vitro*.

Коллекционные штаммы *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 были использованы для инокуляции картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Невский. Растений культивировали в стерильных условиях (контроль), инокулировали штаммом *A. baldaniorum* Sp245 при черенковании или штаммом *O. cytisi* IPA7.2 на 14 сутки после черенкования, или коинокулировали обоими штаммами *A. baldaniorum* Sp245 при черенковании и *O. cytisi* IPA7.2 на 14 сутки после черенкования. Культивирование микрорастений *in vitro* проводилось по описанной выше методике 30 суток в условиях *in vitro* и еще 30 суток *ex vitro* в сосудах с почвой.

Результаты морфометрического анализа растений в культуре *in vitro* (Таблица 5.29) показывают достоверное стимулирование роста микрорастений ризосферными штаммами по отдельности и совместно по сравнению с контролем.

Таблица 5.29. – Анализ морфометрических параметров в ассоциациях картофеля сорта Невский со штаммами *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 в условиях *in vitro*

Вариант	Длина побега, см	Количество узлов, шт.	Количество корней, шт.	Масса растений, г
Контроль	5,65a	6,87a	8,00a	0,55a
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	6,26b	7,47b	8,77ab	0,82c
<i>O. cytisi</i> IPA7.2	6,58b	7,83b	9,73bc	0,79bc
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 + <i>O. cytisi</i> IPA7.2	7,56c	7,63b	9,93c	0,71b
Fфакт.	16,86*	4,87*	4,76*	12,62*
HCP _{0,05}	0,48	0,46	1,00	0,09

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{теор.}}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

По показателю длина побега установлено стимулирующее действие по сравнению с контролем штамма *A. baldaniorum* Sp245 на 10,8%, штамма *O. cytisi* IPA7.2 на 16,5%, а двух штаммов одновременно на 33,8, что существенно превышает действие каждого штамма по отдельности. По количеству узлов инокулированные растения превышали контрольные в примерно равной степени во всех вариантах инокуляции на 8,7-14,0%. Количество корней на растениях увеличивалось в вариантах с инокуляцией штаммом *O. cytisi* IPA7.2 на 21,6% и совместно штаммами *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 на 24,1%. Все инокулированные растения имели большую массу растений по сравнению с контролем на 49,1 (*A. baldaniorum* Sp245), 43,6 (*O. cytisi* IPA7.2) и 29,1% (*A. baldaniorum* Sp245 + *O. cytisi* IPA7.2).

После высадки и выращивания растений в почве (Таблица 5.30) были получены следующие результаты морфометрического анализа. Инокуляция штаммом *A. baldaniorum* Sp245 приводила к формированию более высоких растений по сравнению с контролем на 26,4% и с большим количеством листьев на 13,0%, но с меньшей сухой массой побегов на 17,1% при равной с контролем массе корней. Инокуляция штаммом *O. cytisi* IPA7.2 приводила к аналогичным данным: микрорастения превышали контроль по длине побега на 17,9%, по количеству листьев – на 21,2% и были меньше по сухой массе побегов и корней соответственно на 23,3 и 26,9%. Коинокулирование одновременно двумя штаммами приводило к формированию растений с меньшей длиной побегов (на 11,1% по сравнению с контролем), но с большим количеством листьев (на 15,8%) и сухой массой корней (на 34,1%).

Таблица 5.30. – Анализ морфометрических параметров в ассоциациях картофеля сорта Невский со штаммами *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 в условиях *ex vitro*

Вариант	Длина побега, см	Количество листьев, шт.	Сухая масса побегов, г	Сухая масса корней, г
Контроль	19,0b	6,33a	0,617bc	0,182b
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	21,1c	7,15b	0,527ab	0,172b
<i>O. cytisi</i> IPA7.2	22,4c	7,67b	0,473a	0,133a
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 + <i>O. cytisi</i> IPA7.2	16,9a	7,33b	0,662c	0,244c
Fфакт.	17,19*	4,50*	13,856*	22,4*
HCP _{0,05}	1,42	0,66	0,079	0,031

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{meop.}}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

Эффект ко-инокуляции микрорастений картофеля сорта Невский в культуре

in vitro одновременно двумя штаммами *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 в целом соответствовал действию каждого штамма ризосферных бактерий по отдельности. Не установлено антагонистического действия штаммов. Синергический эффект коинокуляции наблюдался только по показателю длины побега в культуре *in vitro*.

Кроме того, изучалась инокуляция штаммом *A. baldaniorum* Sp245 совместно с штаммами *Enterobacter cloacae* K7 и *Kocuria rosea* T1Ks19 (Таблица 5.31).

Таблица 5.31. – Анализ морфометрических параметров в ассоциациях картофеля сорта Невский со штаммами *A. baldaniorum* Sp245, *O. cytisi* IPA7.2, *E. cloacae* K7 и *K. rosea* T1Ks19 в условиях *in vitro*

Вариант	Длина побега, см	Количество узлов на побеге, шт.	Длина корней, см	Сырая масса		Сухая масса	
				побега, г	корней, г	побега, г	корней, г
Контроль	6,59а	6,79с	4,62а	1,93а	0,84а	0,28	0,12а
<i>A. baldaniorum</i> Sp 245+ <i>O. cytisi</i> IPA7.2	8,38bc	4,32а	4,07а	2,44а	0,67а	0,37	0,12а
<i>A. baldaniorum</i> Sp245+ <i>E. cloacae</i> K7	8,86с	4,01а	4,01а	2,49а	0,60а	0,32	0,10а
<i>A. baldaniorum</i> Sp245+ <i>K. rosea</i> Ks19	7,52ab	5,60b	5,60b	3,16b	1,62b	0,33	0,16b
F _{факт.}	8,580*	23,558	12,825	6,945	22,507	0,885	8,220
HCP _{0,05}	1,02	0,77	0,606	0,56	0,29	-	0,02

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

Растения сорта Невский культивировали в стерильных условиях (контроль), инокулировали штаммом *A. baldaniorum* Sp245 и *K. rosea* T1Ks19 при черенковании, а также *A. baldaniorum* Sp245 при черенковании и штаммом *O. cytisi* IPA7.2 или *E. cloacae* K7 на 14 сутки после черенкования. Культивирование микrorастений *in vitro* проводилось по описанной выше методике 30 суток в условиях *in vitro*.

Максимальный положительный эффект от ко-инокуляции микrorастений картофеля в культуре *in vitro* наблюдали в варианте *A. baldaniorum* Sp245 + *K. rosea* T1Ks19. У бактеризованных растений по сравнению с контрольными длина корней увеличивалась на 21,2%, а масса корней сырья в 1,9 раза, сухая – на 33,3%. При этом длина побега оставалась на уровне контроля, а количество узлов на побеге даже снижалось на 17,5%, хотя масса побега сырья была больше, чем в контроле в 1,6 раза.

В вариантах ко-инокуляции *A. baldaniorum* Sp245 + *O. cytisi* IPA7.2 и *A. baldaniorum* Sp245 + *E. cloacae* K7 наблюдалось достоверное стимулирование растяжения побега соответственно на 27,2 и 34,4% при одновременном уменьшении числа узлов на побеге соответственно на 36,4 и 40,9%.

Исследования показали, что для стимулирования роста микrorастений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro* могут быть использованы ассоциативные ризобактерии *A. baldaniorum* Sp245 [341]. Способность бактерий рода *Azospirillum* стимулировать рост и продуктивность картофеля, в том числе в системе производства семян, хорошо известна [228, 468]. При этом [545] показано, что эффективность применения этих бактерий выше в оптимальных условиях *in vitro*, но снижается на этапе выращивания растений в поле. Результаты данного исследования также показывают, что инокуляция чистой культурой *A. baldaniorum* Sp245 по сравнению с остальными вариантами обработки стимулировала рост микrorастений сорта Невский в оптимальных условиях *in vitro*, *ex vitro* и в почве. Штамм *A. baldaniorum* Sp245 был выделен из корней пшеницы [303] и является модельным для многих исследований. По данным проведенных исследований этот штамм обладает высокой способностью к производству гормона индолилук-

усной кислоты, что объясняет его стимулирующее влияние на корни микрорастений [468].

Штамм *O. cytisi* IPA7.2, выделенный непосредственно из корней картофеля и являющийся аборигенным для почв Саратовской области, является более устойчивым к стрессовым воздействиям, чем азоспиреллы [468]. Он выдерживает большие колебания температуры, содержания соли и гербицидов, что объясняет его способность защищать растения от стресса, в том числе осмотического [247].

Комбинирование разных штаммов, в том числе азоспирелл с другими микросимбионтами, для инокуляции растений считается перспективным благодаря возможному синергетическому эффекту и большей устойчивости многокомпонентной системы [482, 593]. Но при использовании ко-инокуляции важное значение имеет совместимость разных штаммов, их способность сохраняться на растении одновременно и не вызывать антагонистических проявлений. Эффективность бактеризации зависит от генотипа растения, этапа развития, внешних и внутренних условий [246].

5.1.8 Механизмы влияния азоспирелл на микроклоны картофеля при инокулировании *in vitro*

5.1.8.1 Изменение гормонального статуса

Выявленные эффекты ризобактерий на микрорастения в культуре *in vitro* могут определяться различными факторами влияния. Хорошо известно, что PGPR-бактерии не только улучшить условия питания растений, но также изменить гормональный баланс, вызвать фитоиммунные реакции, стимулировать антиоксидантную систему и выработку специфических компонентов (стрессовых белков, осмолитиков, каллозы, лигнина и других веществ).

Для изучения влияния бактерий на баланс гормонов в растениях картофеля в ФГБУН Уфимский институт биологии УФИЦ РАН была проведена оценка содержания ИУК, АБК, зеатина, N6-изопентениладенозина (ИПА) в микрорастениях и питательной среды на 5 сутки после инокулирования. Содержание гормонов в водном остатке, полученном после экстракции гормонов из растительного мате-

риала 80 % этианолом и упаривания спирта, анализировали после их разделения и очистки. ИУК и АБК очищали с помощью экстракции в диэтиловый эфир (при pH 2-3), последующей экстракции в 1 % гидрокарбонат натрия и вторичной реэкстракции этиловым эфиром из подкисленного (соляной кислотой до pH 2-3) водного экстракта с уменьшением объема на каждой стадии экстракции и реэкстракции, что обеспечивало уменьшение объема и освобождение экстракта от части сопутствующих соединений [446]. Цитокинины из водного остатка концентрировали на картридже C-18 (Waters, USA), разделяли с помощью тонкослойной хроматографии, как описано [119] и в элюате из зон, соответствующих положению метчиков, определяли производные зеатина и изопентениладенина (свободные основания и их рибозиды) с помощью антител к рибозиду зеатина и изопентениладенозину, как описано [577]. Надежность метода была подтверждена сравнением ее результатов с данными, полученными с помощью ВЭЖХ в сочетании с массспектрометрией [119, 577].

Анализ питательной среды и растений в процессе культивирования с бактериями показал, что в процессе жизнедеятельности бактерии выделяли в культуральную жидкость фитогормоны. Из изученных фитогормонов в культуральной жидкости бактерий наиболее высокой была концентрация ИУК (Таблица 5.32).

Таблица 5.32 – Содержание индолил-3-уксусной кислоты (нг/мл культуральной жидкости) в питательной среде после 36 и 102 часов культивирования бактерий, нг/мл

Штамм бактерий	Продолжительность культивирования, час.	
	36	102
<i>O. cytisi</i> IPA7.2	6,3	12,1
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	9,7	192,4

Содержание ИУК возрастало в процессе культивирования во всех вариантах. Особенно активно синтезировали ИУК *A. baldaniorum* Sp245, содержание гормона возросло в период с 36 по 102 сутки культивирования почти в 20 раз. Ци-

токинины и АБК содержались в следовых количествах (1-2 нг/мл), и их содержание в среде не менялось в процессе культивирования бактерий.

В растениях содержание гормонов также изменялось. Как видно из рисунка 5.17, оба штамма увеличивали содержание ИУК в листьях и не влияли на содержание ИУК в корнях. Бактерии также вызывали увеличение уровня АБК в листьях примерно в 1,5 раза (Рисунок 5.18). Присутствие бактерий в питательной среде повышало содержание производных зеатина (сумму свободного основания и рибозида) в стеблях растений (Рисунок 5.19). Накопление ИПА было наиболее заметным в стеблях под влиянием обеих бактерий и в листьях – под влиянием *A. baldaniorum* Sp245 (Рисунок 5.20).

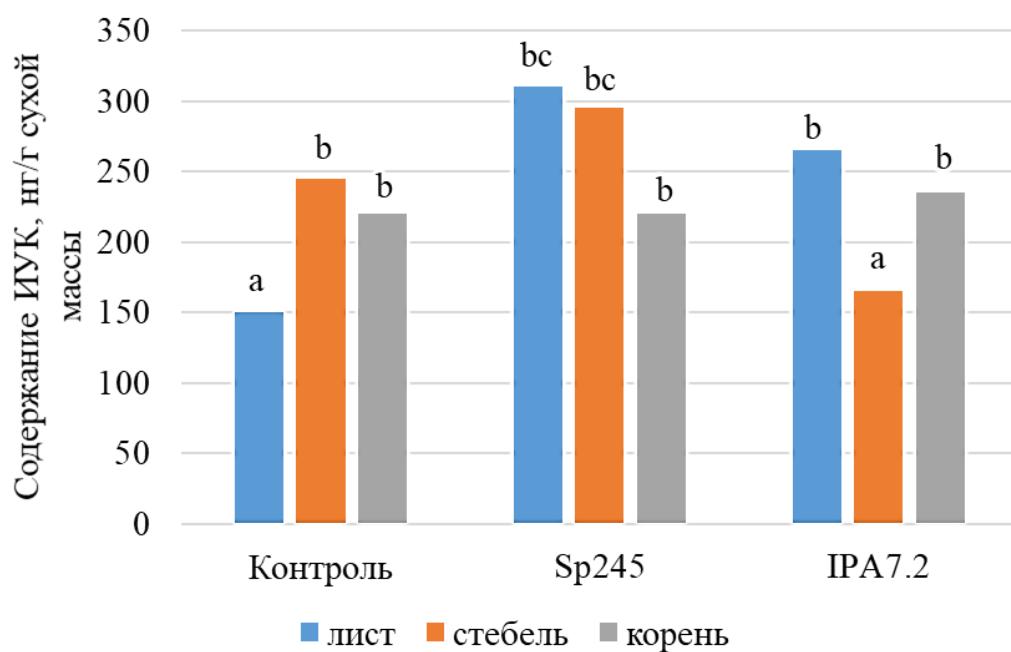


Рисунок 5.17 – Влияние бактерий на содержание ИУК в органах растений картофеля, культивируемых *in vitro*. Контроль – культивирование без бактерий, Sp245 – *A. baldaniorum* Sp245, IPA7.2 – *O. cytisi* IPA7.2. Буквы а, б, с – ранжирование по тесту Дункана

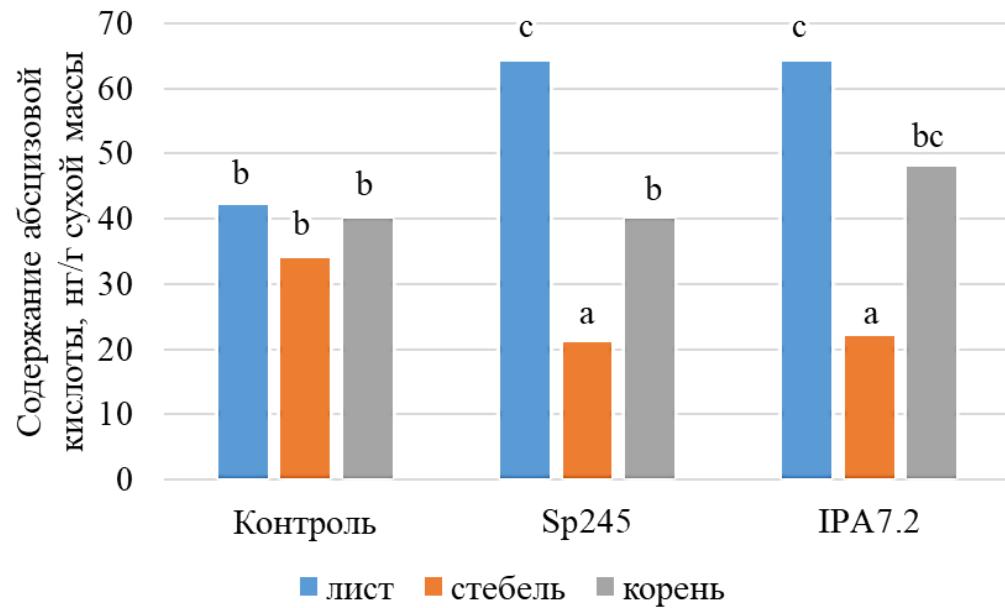


Рисунок 5.18 – Влияние штаммов бактерий на содержание АБК в органах растений картофеля, культивируемых *in vitro*. Контроль – культивирование без бактерий, Sp245 – *A. baldaniorum* Sp245, IPA7.2 – *O. cytisi* IPA7.2. Буквы а, б, с – ранжирование по тесту Дункана

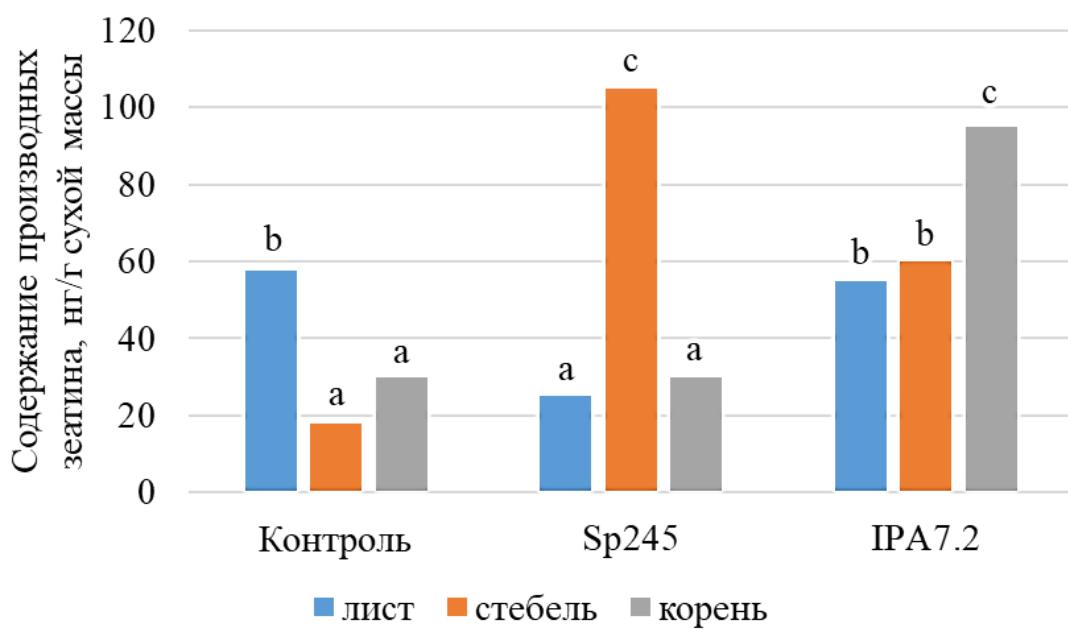


Рисунок 5.19 – Влияние бактерий на содержание производных зеатина в органах растений картофеля, культивируемых *in vitro*. Контроль – культивирование без бактерий, Sp245 – *A. baldaniorum* Sp245, IPA7.2 – *O. cytisi* IPA7.2. Буквы а, б, с – ранжирование по тесту Дункана

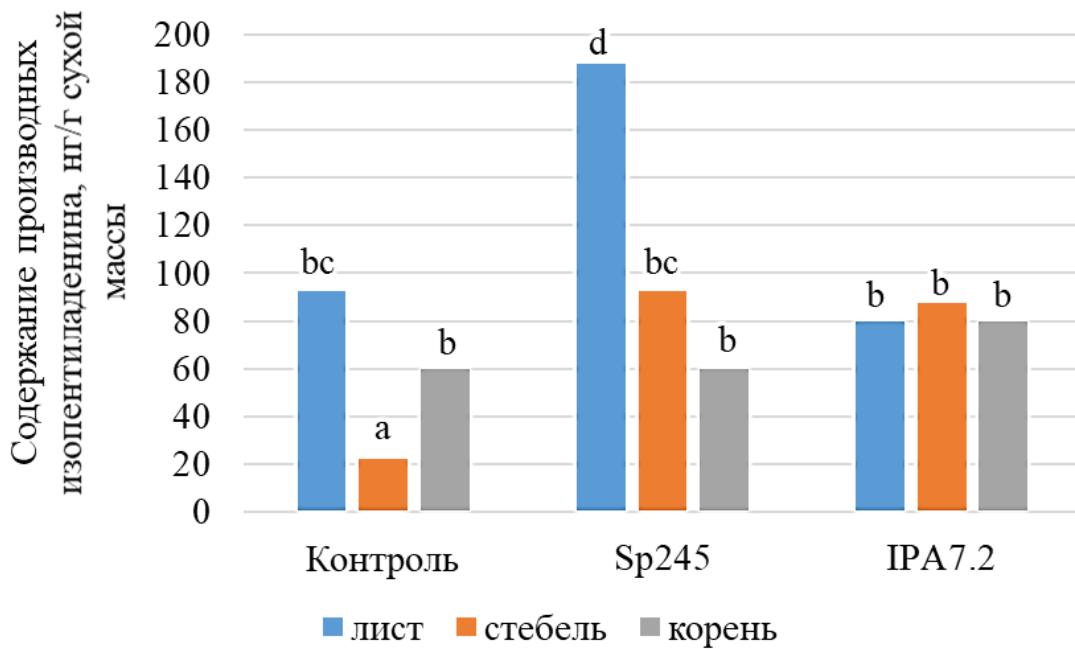


Рисунок 5.20 – Влияние бактерий на содержание производных ИПА в органах растений картофеля, культивируемых *in vitro*. Контроль – культивирование без бактерий, Sp245 – *A. baldaniorum* Sp245, IPA7.2 – *O. cytisi* IPA7.2. Буквы а, б, с – ранжирование по тесту Дункана

Как видно из анализа полученных результатов, присутствие бактерий влияет на содержании гормонов в растениях. Проще всего объяснить повышение уровня ауксинов в растениях тем, что бактерии способны синтезировать эти гормоны. Этому объяснению соответствует тот факт, что уровень ауксинов выше в присутствии *A. baldaniorum* Sp245, которые накапливали больше ауксинов в культуральной жидкости. Кроме того, ризобактерии могут влиять на метаболизм растения-хозяина, тем самым изменяя его фитогормональный статус. В частности, было показано, что ризобактерии понижают активность деградации ИУК в растениях [99, 204], и продукцию этилена [540].

На содержание ИУК в корнях ни одна из бактерий не влияла, что соответствует данным о том, что при более длительном культивировании гормоны, производимые бактериями, могут увеличивать концентрацию гормонов в побегах растений, а не в корнях [5].

Концентрация цитокининов и АБК в культуральной жидкости была значительно ниже, чем ауксинов. Это не позволяет связать накопление цитокининов или АБК в растениях со способностью бактерий продуцировать эти гормоны. Однако известно, что продукция гормонов бактериями может увеличиваться под влиянием растительных компонентов, входящих в состав питательной среды [22]. Таким образом, нельзя исключить того, что продукция АБК и цитокининов могла увеличиваться при совместном культивировании бактерий с растениями, а уровень этих гормонов в растениях – возрастать за счет поглощения растениями этих гормонов, продуцируемых бактериями. Альтернативное объяснение изменения содержания гормонов можно найти в работах, где было показано влияние бактерий на способность самих растений метаболизировать гормоны [99, 234, 531].

Активация удлинения стебля под влиянием бактерий соответствует повышенному содержанию ауксинов в стеблях растений. Эти результаты согласуются с данным литературы о том, что ауксины стимулируют удлинение клеток стебля [596].

Накопление АБК часто рассматривают как индикатор стресса. По данным Авальбаева с соавторами (2010), небольшое накопление АБК в отсутствии стресса способствует запуску адаптивных реакций, в результате чего уровень стресс-индуцированного накопления АБК меньше, чем у неадаптированных растений. Именно это наблюдается при анализе изменений уровня АБК под влиянием бактерий.

Присутствие бактерий, в основном, способствовало увеличению уровня цитокининов в растениях. В листьях бактерии повышали уровень производных ИПА, а в стебле – зеатина. Поскольку есть сведения о том, что цитокинины в листьях синтезируются в виде производных ИПА, и преимущественно в корнях они превращаются в производные зеатина [556], повышенное содержание производных ИПА в листьях скорее связано с их синтезом самим растением, чем транспортом из корней цитокининов, которые могли синтезироваться бактериями и поступать в корни из питательного раствора.

5.1.8.2 Экспрессия ауксин-зависимых генов

Известно, что за синтез и редукцию ауксинов отвечает большое число генов, также экспрессия многих генов зависит от экзогенной и эндогенной индолил-3-уксусной кислоты [116]. Семейство генов ауксин/индол-3-уксусной кислоты (*Aux/IAA*) кодируют короткоживущие ядерные белки, о которых известно, что они участвуют в первичных клеточных реакциях на ауксин [526]. Junpeng Gao с соавторами (2016) провели систематический анализ 26 генов *Aux/IAA* картофеля. Кроме того, хорошо известна роль генов *AMI*, *TIR1*, *GH3.1*, *IPAM*, *GH3* [417].

Методом обратной транскрипции РНК с последующим ПЦР в реальном времени изучали экспрессию генов *Aux/IAA*: *StIAA3*, *StIAA15*, *StIAA20*, а также генов *AMI*, *TIR1*, *GH3.1*, *IPAM*, *GH3*. В качестве контроля экспрессии использовали 2 референсных гена *TUB*, *GAP*.

Было проведено изучение их экспрессии в 10-суточных микrorастениях картофеля сорта Невский подвергнутых воздействию в течение 2 суток суспензии бактерии *A. baldaniorum* Sp245 в концентрации 10^6 кл/мл питательной среды, а также экзогенной ИУК в концентрации 1, 0,1 и 0,01 мг/л (5,7, 0,57, 0,057 μM). В качестве контроля использовали растения без обработки.

Результаты определения относительной экспрессии 8 ауксин-зависимых генов представлены на рисунке 5.21.

Анализ полученных данных показал, что после 2 суток воздействия ИУК в разных концентрациях относительная экспрессия всех генов различалась незначительно, что можно объяснить продолжительной экспозицией, так как известно, что экспрессия данных генов начинается буквально через несколько минут после воздействия экзогенной ИУК [105]. Вероятно, поэтому несколько выше экспрессия генов на фоне самой низкой концентрации ИУК.

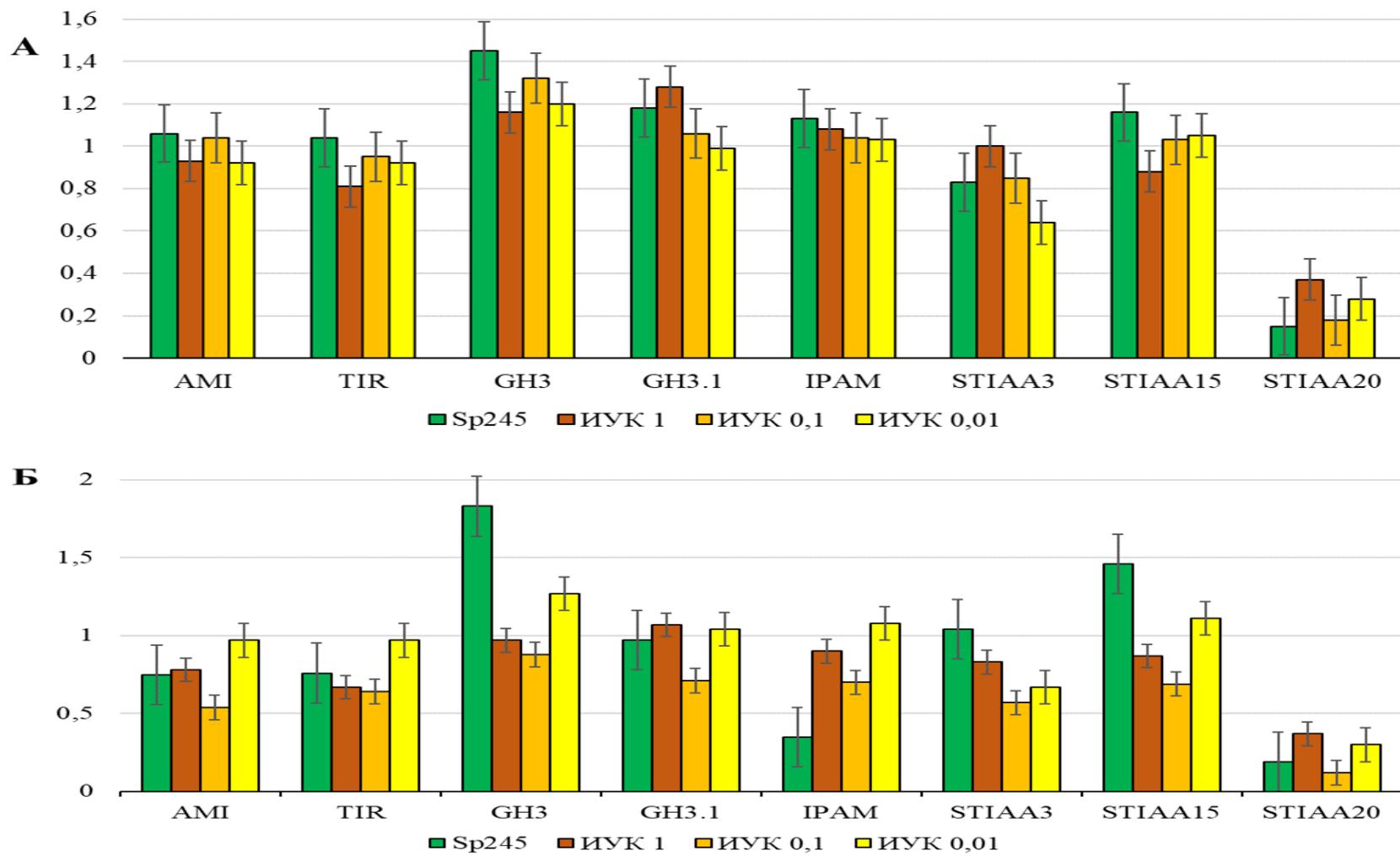


Рисунок 5.21 – Относительный уровень экспрессии ауксин-зависимых генов в микрорастениях картофеля сорта Невский при действии бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и ИУК в концентрации 1, 0,1, 0,01 мг/л. Уровень экспрессии определен: А – по отношению к уровню экспрессии гена *TUB*; Б – по отношению к уровню экспрессии гена *GAP*

В целом реакция экспрессии генов в ответ на экзогенную ИУК и бактерии совпадала. Из восьми генов, относительный уровень экспрессии которых оценивался, наиболее информативными в отношении влияния бактерий оказались гены *GH3* и *STIAA15*. Экспрессия этих генов существенно увеличивалась в присутствии бактерий по сравнению с воздействием ИУК (Рисунок 5.21). Поскольку данные гены связаны с деградацией ИУК [417], можно предположить, что ко вторым суткам под действием бактерий происходит накопление эндогенной ИУК в тканях микрорастений картофеля, что специфически стимулирует экспрессию указанных генов.

5.1.8.3 Индукция системной устойчивости (стимулирование синтеза каллозы)

Воздействие на клетки растений как патогенных, так и симбиотических микроорганизмов через активацию рецептор-подобных киназ запускает комплекс физиологических и биохимических реакций, объединяемых общим понятием «индуцированные механизмы защиты». Самым сильным ответом растения – является реакция сверхчувствительности, приводящая к синтезу лигнина и суберина, и гибели клеток в точке контакта с микроорганизмом, что позволяет изолировать клетки патогена некротировавшими клетками хозяина. Кроме того, индуцированный механизм защиты включает синтез каллозы, активных форм кислорода, особенно O_2 , H_2O_2 , и токсинов, которые убивают клетки патогена. Параллельно синтезируются ферменты антиоксидантной системы, а также фитоалексины, лектины, дефензины. Универсальность ответных реакций в растениях на различные типы контактирующих микроорганизмов позволяет стимулировать иммунные реакции и повышать устойчивость к патогенам путем воздействия симбиотическими, в том числе ризосферными бактериями.

Каллоза – полисахарид, молекула которого состоит приблизительно из 100 остатков глюкозы, соединенных между собой β -1,3-связями. Она функционирует в растении как универсальный изолирующий материал [45]. Большие количества каллозы могут синтезироваться на плазмалемме как ответная реакция на поражение. У поврежденных клеток плазмодесмы и ситовидные трубки закупориваются

каллозой, чтобы предотвратить повреждение других клеток. Синтез ее стимулируется повышением концентрации кальция в цитозоле [168]. Накопление каллозы в клеточных стенках растений входит в комплекс реакций, индуцируемых салициловой кислотой [392].

Анализ микрорастений картофеля сорта Невский, инокулированных *Azospirillum baldaniorum* Sp245 методом флуоресцентной микроскопии, показал, что в корнях на вторые сутки наблюдается фрагментарное отложение каллозы, которое к седьмым суткам становится сплошным в тканях ксилемы (Рисунок 5.22).

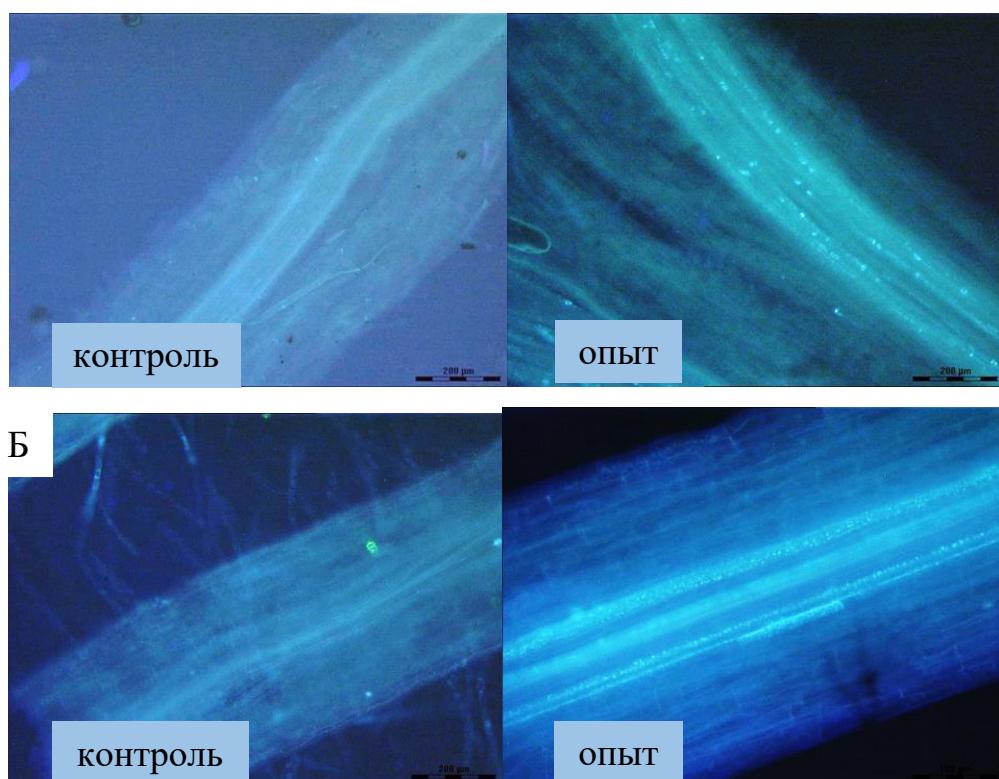


Рисунок 5.22 – Влияние бактерий *Azospirillum baldaniorum* Sp245 на синтез каллозы в корнях микроклонов картофеля на 2-ые (А) и 7-ые (Б) сутки инокуляции

В листьях инокулированных растений на седьмые сутки также значительно увеличивается содержание каллозы как в проводящих пучках, так и фрагментарно в клеточных стенках паренхимы (Рисунок 5.23).

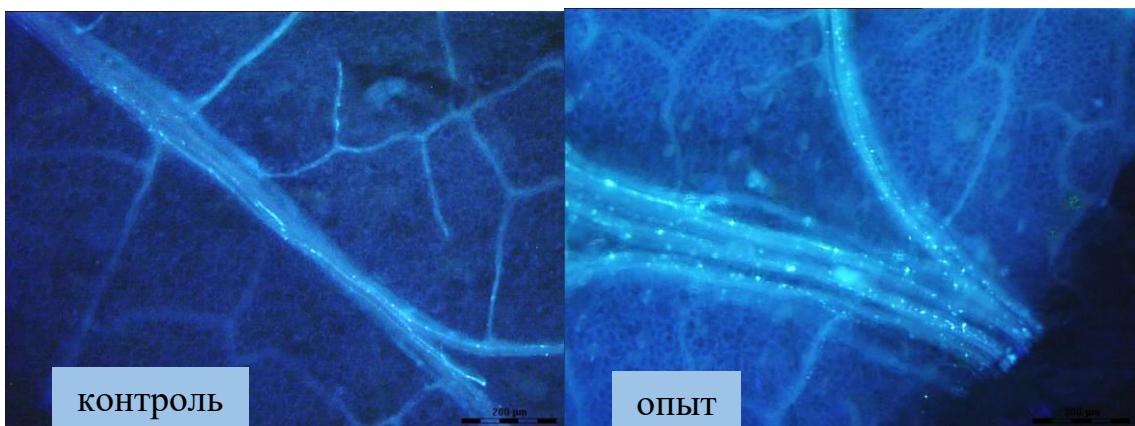


Рисунок 5.23 – Влияние бактерий *Azospirillum baldaniorum* Sp245 на синтез каллозы в листьях микроклонов картофеля на 7-ые сутки инокуляции

Таким образом, бактерии *A. baldaniorum* Sp245 не только стимулируют ростовые процессы в растениях картофеля и пшеницы, но и способствуют повышению отдельных показателей (содержание каллозы), связанных с устойчивостью этих растений к биотическому стрессу, что, вероятно, может повышать адаптивный потенциал микрорастений в условиях *ex vitro*.

5.2 Изучение влияния липополисахаридов ризосферных бактерий на микроклоны картофеля в культуре *in vitro*

Сравнительное изучение эффектов действия живых бактерий и липополисахаридов клеточных стенок бактерий показало, что оказываемое влияние однозначенно и в большинстве случаев совпадает по величине.

ЛПС *A. brasiliense* Sp7, так же, как и сами живые бактерии *A. brasiliense* Sp7 (Таблица 5.34), стимулировали рост и количество корней у микрорастений картофеля сорта Кондор в культуре *in vitro*, причем увеличение количества корней происходило на 11% эффективнее действия бактериальных клеток.

Стимулирующее влияние бактерий на рост корней может быть вызвано ответными реакциями, возникающими в клетках корней, в ответ на инокуляцию бактериями, в том числе иммунными реакциями, определяемыми контактом с липополисахаридами. Подтверждением этого предположения может служить наличие

стимулирующего влияния на рост корней, вызванного действием ЛПС *Pectobacterium sp.* (Таблица 5.34).

Таблица 5.34 – Влияние живых бактерий *A. brasiliense Sp7* и липополисахаридов бактерий *A. brasiliense Sp7* и *Pectobacterium sp.* на рост микrorастений картофеля сорта Кондор в культуре *in vitro*

Вариант	Длина побега, мм	Количество узлов, шт.	Длина корня, мм	Количество корней, шт.
Контроль	82,62	9,00	53,00a	9,75a
Бактерии <i>A. brasiliense Sp7</i>	78,25	7,75	62,35c	10,90b
ЛПС <i>A. brasiliense Sp7</i>	73,75	8,38	61,08bc	12,07c
ЛПС <i>Pectobacterium sp.</i>	77,93	8,00	61,75c	10,18ab
F факт.	-	-	17,109*	7,697*
HCP 0,05	-	-	3,14	1,00

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

Морфометрические параметры микrorастений картофеля сорта Кондор после 20-и дневной инкубации с клетками (10^6 кл./мл) *Ochrobactrum cytisi IPA7.2* и липополисахаридами (10 мкг/мл) штаммов *Ochrobactrum cytisi IPA7.2* и *Azospirillum baldaniorum Sp245* также показали сходное стимулирующее влияние живых клеток ризосферных бактерий и липополисахаридов (Таблица 5.35).

Положительное влияние ЛПС *O. cytisi IPA7.2* по сравнению с контролем обнаруживалось по всем изученным признакам побегов и корней, тогда как стимулирующий эффект бактериальных клеток не был установлен по показателям «количество корней» и «сырая масса корней». ЛПС клеточных стенок *A. baldaniorum Sp245* также стимулировал большинство показателей (кроме сырой массы кор-

ней), причем наблюдалось более эффективное увеличение длины побегов на 8% по сравнению с действием ЛПС *O. cytisi* IPA7.2 и на 11,7% – по сравнению с действием живых клеток *O. cytisi* IPA7.2.

Таблица 5.35 – Влияние живых бактерий *O. cytisi* IPA7.2 и липополисахаридов *O. cytisi* IPA7.2 и *A. baldaniorum* Sp245 на рост микrorастений картофеля сорта Кондор в культуре *in vitro*

Варианты	Длина побега, см	Количество узлов, шт.	Количество корней, шт.	Сырая масса побега, мг	Сырая масса корней, мг
Контроль	4,70 а	6,93 а	9,60 а	0,219 а	0,302 а
<i>O. cytisi</i> IPA7.2	5,66 б	8,47 б	10,60 а	0,289 б	0,299 а
ЛПС <i>O. cytisi</i> IPA7.2	5,84 бс	9,07 б	12,63 б	0,275 б	0,451 б
ЛПС <i>A. baldaniorum</i> Sp245	6,32 с	8,50 б	12,87 б	0,286 б	0,388 аб
F _{факт.}	10,03*	14,80*	6,97*	7,76*	4,81*
HCP _{0,05}	0,60	0,67	1,68	0,034	0,098

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{meop.}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

Сравнение влияния ЛПС разных таксономических видов бактерий (Таблица 5.36) показало, что характер воздействия ЛПС может быть связан со строением их О-антитела.

Анализ результатов измерения длины побегов микrorастений показал, что достоверное стимулирование роста наблюдалось только в вариантах с ЛПС штаммов T1Kr02 (+13,2 %), SR88 (+13,6 %) и BV-S (+16,6 %). ЛПС других трех штаммов статистически не влияли на длину побега. При этом для ЛПС штаммов SR88 и BV-S был выявлен эффект снижения у микrorастений количества узлов на

28 и 21,9 % соответственно. Можно констатировать, что ЛПС штаммов SR88 и BV-S способствовали развитию более высоких микрорастений с меньшим, чем в контроле, количеством узлов, т.е. с более длинными междуузлиями. ЛПС других штаммов достоверно не влияли на среднее количество узлов относительно контрольных растений. При этом наибольшее значение узлов было отмечено для вариантов: контроль, ЛПС штаммов T1Kr02 и K3.

Таблица 5.36 – Влияние липополисахаридов *O. quorumnocens T1Kr02*, *P. chlororaphis K3*, *A. brasiliense SR80*, *A. brasiliense SR88*, *A. thiophilum BV-S* и *A. zae N7* на рост микрорастений картофеля сорта Кондор в культуре *in vitro*

Варианты	Длина побега, мм	Количество узлов, шт.	Количество корней, шт.	Длина корней, мм	Сухая масса побега, мг	Сухая масса корней, мг
Контроль	70,5 а	7,3 bc	8,7 abc	238 b	38,4 c	12,5 ab
ЛПС <i>O. quorumnocens T1Kr02</i>	79,8 bc	7,2 bc	9,4 c	315 c	47,1 e	16,4 bc
ЛПС <i>P. chlororaphis K3</i>	74,2 ab	8,5 c	9,1 bc	185 a	24,8 a	8,3 a
ЛПС <i>A. brasiliense SR80</i>	74,7 ab	6,6 ab	8,87 abc	213 ab	34,6 b	13,8 b
ЛПС <i>A. brasiliense SR88</i>	80,1 bc	5,2 a	7,4 a	203 a	39,0 c	15,1 b
ЛПС <i>A. thiophilum BV-S</i>	82,2 c	5,7 a	9,1 bc	316 c	43,6 d	20,6 c
ЛПС <i>A. zae N7</i>	69,9 a	6,6 ab	7,5 ab	215 ab	40,2 c	13,6 ab
F _{факт.}	5,63*	3,21*	2,96*	7,36*	12,5*	4,39*
HCP _{0,05}	6,2	1,5	1,7	33	2,1	5,4

Примечание – «*» различия достоверны при $P = 0,05$, поскольку $F_{факт.} \geq F_{meop}$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.

Измерение сухой массы побегов продемонстрировало ингибирование этого параметра у растений, выращенных в присутствии ЛПС штамма K3 на 35,4 % и SR80 на 9,9 %. Увеличение сухой массы побегов относительно контрольных микrorастений было выявлено при действии ЛПС штамма BV-S на 13,5 % и T1Kr02 на 22,7 %.

Более сильные эффекты ЛПС были выявлены на рост и развитие корневой системы микrorастений. Количество корней было наименьшим в варианте с ЛПС штамма SR88, а наибольшим с ЛПС штамма T1Kr02, причем эти варианты между собой достоверно различались (см. Таблицу 5.36). Следует отметить, что ни один из вариантов с ЛПС не демонстрировал достоверных различий с микrorастениями из контрольной группы. На длину корней положительное влияние оказывали препараты ЛПС штаммов T1Kr02 и BV-S (для обоих вариантов +32,4 % от контроля). Наоборот, у микrorастений, выращенных в присутствии ЛПС штаммов SR88 и K3, суммарная длина корней снижалась на 14,7 и 22,3 % соответственно. При этом в варианте с ЛПС штамма K3 наблюдалось формирование большого числа коротких и тонких корней. При действии ЛПС штамма SR88 более низкое значение суммарной длины корней относительно контрольных микrorастений связано с уменьшением количества корней ($P \leq 0,1$), в то время как сформированные корни были сопоставимы с контролем. Вариант с ЛПС штамма BV-S был единственным, для которого отмечено существенное (64,8 %; $P < 0,05$) повышение сухой массы корней. Действие ЛПС штамма T1Kr02 на сухую массу корней микrorастений достоверно не отличалось от действия ЛПС штамма BV-S, но существенно не отличалось и от контроля.

Таким образом, препараты ЛПС штаммов *Ochrobactrum quorumnocens* T1Kr02 и *Azospirillum thiophilum* BV-S оказывали достоверно положительное влияние на наибольшее количество исследованных параметров микrorастений картофеля сорта Кондор, что может быть связано с химическим строением их повторяющихся звеньев О-полисахаридов. Так, олигосахаридное повторяющееся звено О-полисахарида штамма *O. quorumnocens* T1Kr02 состоит из остатков D-фукозы, а штамма *Azospirillum thiophilum* BV-S – из пентасахарида, в котором четыре остат-

ка *L*-рамнозы и в боковом положении один остаток *D*-ксилозы. Соответственно доминирующими для ЛПС обоих штаммов являются остатки 6-дезоксигексоз (фукозы и рамнозы), в отличие от ЛПС других исследованных штаммов, в составе которых также содержатся остатки фукозы и рамнозы (кроме ЛПС штамма К3), но в меньшем количестве.

То, как растения воспринимают ЛПС бактерий, ассоциированных с растениями, и различают полезные и патогенные микробы, является вопросом открытых. Предполагается, что модификации О-антитела ЛПС влияют на свойства мембран и модулируют распознавание растением-хозяином ризосферных симбионтных и патогенных клеток [415].

Заключение

В современных агробиотехнологиях широко используются методы культуры клеток, тканей и органов растений *in vitro*. Морфогенетические процессы, протекающие в данных условиях, определяются генотипом донорных растений и зависят от ряда факторов:

- наличие в растительных эксплантах морфогенетически компетентных клеток (клеток меристематического типа, способных к инициации клеточного деления с формированием дедифференцированных тканей или меристематических тканей точек роста и эмбриоидов);
- стрессовое воздействие, способное изменить состояние клеток в клеточном цикле и спровоцировать клетки к делению и изменению дифференциации;
- генетические особенности донорного растения, определяющие способность клеток и тканей к реализации путей морфогенеза и регенерации органов и целых растений.

Генетический контроль морфогенеза определяется наличием специальных генетических систем, контролирующих процессы полового и вегетативного размножения растений, а также плейотропными эффектами генов, регулирующих биохимические и физиологические процессы в клетках и на уровне целого растения.

В качестве стессового фактора в первую очередь выступает травматическое воздействие на этапе выделения экспланта и связанное с этим снятие организменного контроля, клеточной и тканевой полярности, градиентов питательных веществ и фитогормонов. Вторым важным стрессовым фактором являются химические и физические факторы культивирования в условиях *in vitro*: фитогормоны, осмотическое воздействие компонентов питательной среды (сахаров и неорганических компонентов питания), температура, влажность и другие факторы. Кроме того, могут быть введены специальные компоненты, обладающие стрессовым воздействием, описанные выше. Чаще всего в качестве стрессовых компонентов среды применяют низкомолекулярные химические вещества. Возможная роль по-

лимерных молекул в регуляции морфогенетических процессов изучена недостаточно.

Культивируемые *in vitro* клеточные линии или ткани традиционно рассматриваются как гнотобионтные. Естественные биологические объекты, в том числе симбиотические микроорганизмы или их компоненты клеток, вызывающие фитоиммунные реакции в условиях *in vivo*, применяются в культуре *in vitro* достаточно редко из-за технологических особенностей асептической культуры. В последние годы такой подход несколько меняется. Накопленные знания о растениях как гнотобионтных системах поддерживают роль микроорганизмов в регуляции морфогенетических процессов в естественных условиях среды обитания и позволяют предположить их возможное применение в искусственных условиях культуры *in vitro*.

Примеры успешного использования ассоциативных микроорганизмов, в том числе рост-стимулирующих ризосферных бактерий, для повышения регенерационной активности каллусных тканей, укоренения побегов и повышения адаптационной способности микроклонов позволяют предположить, что биологические факторы могут быть перспективными с точки зрения развития прикладных агробиотехнологий в селекции и производстве посадочного материала сельскохозяйственных растений, в том числе пшеницы мягкой и картофеля, методика создания растительно-микробных ассоциаций в культуре *in vitro* на данный момент не разработана.

В период с 2001 по 2024 гг. проведены исследования по влиянию ризосферных рост-стимулирующих бактерий и липополисахаридов клеточных стенок этих бактерий на культуру соматических клеток и тканей однодольных и двудольных растений в культуре *in vitro*. В качестве материала для исследований использованы модельные объекты: сорт яровой мягкой пшеницы Саратовская 29 и набор почти изогенных линий на ее основе, альтернативных по генам короткостебельности и различающихся по способности к морфогенезу в каллусной ткани, а также районированные и перспективные сорта картофеля отечественной (Невский, Жуковский ранний) и иностранной селекции (Кондор, Розара, Аврора, Ред Скарлетт).

Эксперименты проведены по стандартным методикам культивирования каллусов и клональному микроразмножению растений на этапах *in vitro* и *ex vitro*. Все эксперименты повторены трижды и содержат не менее трех повторностей в опытах. Данные, полученные в ходе всех экспериментов, подвергнуты статистическому анализу.

Подробно методики культивирования бактериальных клеток, растительных тканей и проведения различных анализов описаны в методических рекомендациях: Применение ризосферных бактерий при микреклональном размножении картофеля. Методические рекомендации / Составители: О.В. Ткаченко, Н.В. Евсеева, М.В. Загоруйко, Г.Л. Бурыгин, – Саратов: Амирит, 2021. – 44 с.

По результатам исследований создана и апробирована генетическая модель, состоящая из набора почти изогенных линий, альтернативных по генам короткостебельности и отличающихся различной активностью морфогенетических процессов. Наиболее альтернативная по характеру проявления морфогенетических процессов в культуре клеток и тканей является пара почти изогенных сестринских линий, различающихся по гену *RhtB1c*. Данная модель далее была использована для оптимизации метода культивирования клеток пшеницы *in vitro* спомощью новых химических веществ тетрагид-рат(+)гидротартрата(+)цис-[2S, 5R-1,5-диметил-2-(1-окси-3-пропил)]-пирролидиния (Патент на изобретение RU № 2186768), а также изучения механизмов взаимодействия бактериальных и растительных клеток в искусственной системе культуры соматических тканей *in vitro*.

Анализ мировой научной литературы показывает, что подход к изучению морфогенетических процессов в культуре клеток и тканей *in vitro*, основанный на использовании изогенного анализа, используется крайне редко. Серьезным ограничением такого подхода является сложность и длительность процесса создания наборов почти изогенных линий. Тем не менее, изучение эффектов конкретных генов позволит дать ответ на вопрос о генетической детерминации и механизмах процессов пролиферации и дифференциации, протекающих в культуре клеток и тканей *in vitro*, а также прогнозировать и управлять реакцией сортов и линий растений при культивировании *in vitro* на основе знания особенностей генотипа. Это

позволит более эффективно применять биотехнологии на основе культуры растительных клеток и тканей в практике селекции сельскохозяйственных культур, в том числе пшеницы.

Проведенные исследования показали, что живые PGPR рода *Azospirillum* не могут быть использованы для улучшения роста каллусной ткани пшеницы и повышения её морфогенной активности, так как в результате фитоиммунных реакций клеток растений запускается процесс их деградации. В отличии от живых клеток убитые клетки могут оказывать стимулирующее влияние, которое может объясняться контактными реакциями между клетками растений и молекулярными компонентами клеточных клеток бактерий. В качестве таких компонентов были изучены липополисахариды клеточных стенок бактерий рода *Azospirillum*.

В результате исследования морфогенетической активности каллусных тканей и анатомо-гистологических исследований установлено, что ЛПС ассоциативных бактерий *A. baldaniorum* Sp245 стимулирует процессы вторичной дифференциации и регенерационную способность каллусных клеток пшеницы, повышая тем самым эффективность культивирования генотипов с низким морфогенным потенциалом. Наибольшей физиологической активностью в отношении каллусных клеток обладает ЛПС, присутствующий в среде культивирования в концентрации 10 мкг/мл.

Введение в состав питательной среды липополисахарида бактерий *E. coli* K12 не влияло на морфогенетическую активность каллусных клеток. Показатели выхода морфогенных каллусов и растений-регенерантов при действии липополисахарида *E. coli* K12 не отличались от контрольных вариантов. Предполагается, что такое различие действия ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *E. coli* K12 определяется специфичностью механизмов действия липополисахаридов ассоциативных бактерий.

Установлено, что ЛПС не всех штаммов *Azospirillum* spp. одинаково эффективны в активации морфогенеза культуры растительной ткани. В отличии от ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 ЛПС *A. baldaniorum* sp7 в большей мере стимулировали процессы морфогенеза в каллусах, а ЛПС *Azospirillum* sp. SR66 стимули-

ровали регенерационную способность каллусов. Существенно положительное влияние на морфогенную активность каллусов пшеницы оказывали ЛПС штамма *A. lipoferum* SR65, подобно действию ЛПС штамма *A. baldaniorum* Sp245. По предварительным данным эффективность регенерации растений можно повысить применением ЛПС штамма *A. lipoferum* SR65 не только на этапе каллусогенеза, но и вводя его в состав питательной среды на этапе регенерации растений.

Исследование ЛПС штаммов *E. adhaerens* T1Ks14, *O. quorumnocens* T1Kr02 и *P. chlororaphis* K3 уступают ЛПС штаммов *A. baldanoirum* Sp245 и *A. lipoferum* SR65 в способности повышать выход растений-регенерантов. В то же время они обладают биологической активностью на уровне ЛПС штаммов *A. brasiliense* SR55 и SR75 и могут быть использованы для повышения эффективности отдельных стадий получения растений-регенерантов.

По совокупности полученных данных можно утверждать, что бактериальные ЛПС являются биологически активными молекулами. Они играют важную роль в формировании растительно-микробных взаимодействий и оказывают существенное влияние на морфогенетические процессы в культуре соматических тканей *in vitro*. Воздействие ЛПС на растительные объекты (клетки, ткани, органы) является очень перспективным направлением биотехнологии растений.

Полученные результаты свидетельствуют о специфичности действия на растения бактериальных липополисахаридов в данных экспериментах и могут быть использованы для исследования молекулярных механизмов взаимного распознавания партнеров в ассоциативном растительно-микробном симбиозе. На основании представленных результатов можно утверждать, что ЛПС азоспирилл могут быть использованы для повышения морфогенного потенциала растительных объектов, в частности пшеницы, в культуре клеток и тканей *in vitro* для усовершенствования соответствующих методов, применяемых в клеточной селекции и генной инженерии растений.

По результатам проведенных исследований установлено, что при микроклональном размножении растений в культуре *in vitro* возможно формирование эффективного растительно-микробного ассоциативного комплекса

между микрорастениями картофеля и живыми ризосферными рост-стимулирующими бактериями. В отличии от дедифференцированных каллусных клеток ткани корня и других органов растений взаимодействуют с живыми бактериями ряда штаммов без негативных эффектов.

Установлено, что при совместном культивировании бактерий *A. brasiliense* sp7 с микрочеренками растений в культуре *in vitro* возможно возникновение растительно-микробных взаимодействий, но инокулирование микрочеренков картофеля бактериями *A. brasiliense* sp7 в выбранных концентрациях не оказывало достоверного влияния на качество микрочеренков, а также на способность их к адаптации к условиям *in vivo*, тогда как использование бактерий этого штамма оказывало положительное влияние на рост мериклонов хризантемы как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo*, достоверно повышая скорость роста корней, побегов и листьев.

В серии экспериментов показано, что инокуляция микрорастений штаммами *A. brasiliense* sp7 и *A. baldaniorum* Sp245 в условиях *in vitro* в целом положительно влияла на рост побегов *in vitro* и скорость адаптации к условиям *ex vitro*. Не установлено негативного влияния какой-либо концентрации бактерий, и, по совокупности экспериментов, можно считать оптимальной среднюю из изученных концентраций – 10^6 клеток в мл питательной среды. Показано, что пролонгирование периода совместного культивирования микрорастений и ризосферных бактерий оказывает положительное влияние на морфометрические показатели побегов и корней.

Оптимальными условиями для проявления рост-стимулирующей для растений активности бактериальной культуры *A. baldaniorum* Sp245 является полужидкая питательная среда с содержанием агар-агара 3,5 г/л и полным составом солей по прописи Мурасиге-Скуга. Показано, что в условиях культивирования *in vitro* бактерии *A. baldaniorum* Sp245 не способны обеспечить фиксацию атмосферного азота на уровне, необходимом для развития микрорастений картофеля. В то же время в оптимальных условиях питания они стимулируют рост побегов

предположительно за счет синтеза фитогормонов ауксинового и гиббереллинового ряда.

Установлено, что стимулирующий эффект не связан с улучшением азотного питания растений за счет фиксации азота бактериями, так как на среде без азота рост растений существенно угнетался. Эти результаты согласуются с исследованиями ряда авторов, которые считают основной функцией азоспирилл в условиях ассоциативного симбиоза не фиксацию атмосферного азота, а продуцирование ростстимулирующих веществ [24, 152]. Однако доминирование той или иной функции азоспирилл зависит, по-видимому, от экологической ситуации или от специфичности взаимодействия бактерий с различными видами растений.

Установлено, что рост-стимулирующий эффект ризосферных бактерий при инокуляции ими микrorастений картофеля в культуре *in vitro* специфичен в отношении условий инокуляции. Бактерии, неспособные к самостоятельному росту на питательной среде для культивирования микrorастений (в данном случае *Azospirillum brasiliense* sp7), могут эффективно инокулировать микрочеренки картофеля с первых дней культивирования *in vitro* для стимулирования роста побегов и корней. Бактерии, активно растущие в питательной среде, могут использоваться как ростстимулирующие, но инокуляцию микrorастений необходимо проводить во второй половине периода культивирования *in vitro*. При разработке агробиотехнологии микроклонального размножения растений введение приема бактеризации микrorастений может быть эффективным с учетом специфики методики инокуляции применяемого штамма рост-стимулирующих ризобактерий.

Бактеризация ростстимулирующими бактериями значительно повышает качество выращиваемых растений как в культуре *in vitro*, так и в условиях *ex vitro* по сравнению с существующей традиционной техникой их микроклонального размножения. Зафиксированная лучшая приживаемость инокулированных бактериями растений в условиях *ex vitro* и, вероятно, эффективная защита их от

фитопатогенов создают основу для развития перспективной агробиотехнологии с уменьшением количества используемых пестицидов и удобрений.

Бактерии *Azospirillum* сохраняются в ряду последовательных пассажей при однократной инокуляции, что делает методику стимулирования роста растений при микроклональном размножении с применением ассоциативных микроорганизмов высоко технологичной. Кроме того, ассоциированные бактерии сохраняют рост-стимулирующую способность в отношении микrorастений в процессе пассирования и в культуре *in vitro* и при адаптации микrorастений в условиях *ex vitro*.

Обнаружен положительный эффект ко-инокуляции микrorастений картофеля в культуре *in vitro* бактериальными штаммами разных таксономических групп. Максимальный положительный эффект от ко-инокуляции микrorастений картофеля в культуре *in vitro* наблюдали в варианте *A. baldaniorum* Sp245 + *K. rosea* T1Ks19. У бактеризованных растений по сравнению с контрольными длина корней увеличивалась на 21,2%, а масса корней сырья в 1,9 раза, сухая – на 33,3%. При этом длина побега оставалась на уровне контроля, а количество узлов на побеге даже снижалось на 17,5%, хотя масса побега сырья была больше, чем в контроле в 1,6 раза. В вариантах ко-инокуляции *A. baldaniorum* Sp245 + *O. cytisi* IPA7.2 и *A. baldaniorum* Sp245 + *E. cloacae* K7 наблюдалось достоверное стимулирование растяжения побега соответственно на 27,2 и 34,4% при одновременном уменьшении числа узлов на побеге соответственно на 36,4 и 40,9%.

Показано, что стимулирующее действие бактерий на рост и адаптацию связано с их влиянием на содержание гормонов в растениях. Повышение уровня ауксинов и цитокининов в листьях и побегах растений под влиянием бактерий, очевидно, играет важную роль в стимуляции роста растений. Существенное влияние штамма *A. baldaniorum* Sp245, является следствием особенностей его влияния на гормональную систему растений в условиях *in vitro*.

Бактерии *A. baldaniorum* Sp245 не только стимулируют ростовые процессы в растениях картофеля и пшеницы, но и способствуют повышению отдельных показателей (содержание каллозы), связанных с устойчивостью этих растений к

биотическому стрессу, что, вероятно, может повышать адаптационный потенциал микrorастений в условиях *ex vitro*.

Стимулирующее влияние ризосферных бактерий на микrorастения картофеля в культуре *in vitro* в какой-то мере может определяться действием липополисахаридов их клеточных стенок. Чистые препараты ЛПС могут с успехом быть применены для симулирования роста микrorастений, что имеет преимущества по сравнению с живыми бактериями, так как исключает риск контаминации культуры. При этом установлено, что препараты бактериальных ЛПС, в которых доля остатков фукозы и рамнозы была максимальной (ЛПС *Ochrobactrum quorumocens* T1Kr02 и *Azospirillum thiophilum* BV-S), оказывали наибольшее положительное влияние на рост и развитие микrorастений картофеля, как побегов, так и корней. Препарат ЛПС штамма *Pseudomonas chlororaphis* K3, продемонстрировавший ингибирующее действие на рост побега микrorастений картофеля, характеризовался наличием О-полисахарида, состоящего из остатков N-ацетилированных аминосахаридов.

Несомненным преимуществом использования ризосферных бактерий является низкая стоимость биопрепаратов на основе живых микроорганизмов, что не приведет к существенному удорожанию технологии микроклонального размножения, а в купе с повышением эффективности метода позволит повысить рентабельность производства оздоровленного посадочного материала. Широкое разнообразие возможных применений полезных микробов в культуре растительных тканей открывает новые возможности для выявления подходящих кандидатов, которые будут использоваться на разных стадиях микроразмножения, с особым вниманием к созданию консорциумов сочетаемых штаммов для обеспечения преимуществ их функциональной взаимной дополняемости.

На основании полученных результатов предлагается оптимизировать методику получения ассоциативных растительно-микробных комплексов с целью повышения эффективности технологии микроклонального размножения картофеля, в том числе в системе семеноводства оздоровленного посадочного материала. Схема оптимизации метода микроклонального размножения в рамках

технологии производства оздоровленного посадочного материала выглядит следующим образом (Рисунок 5.24).

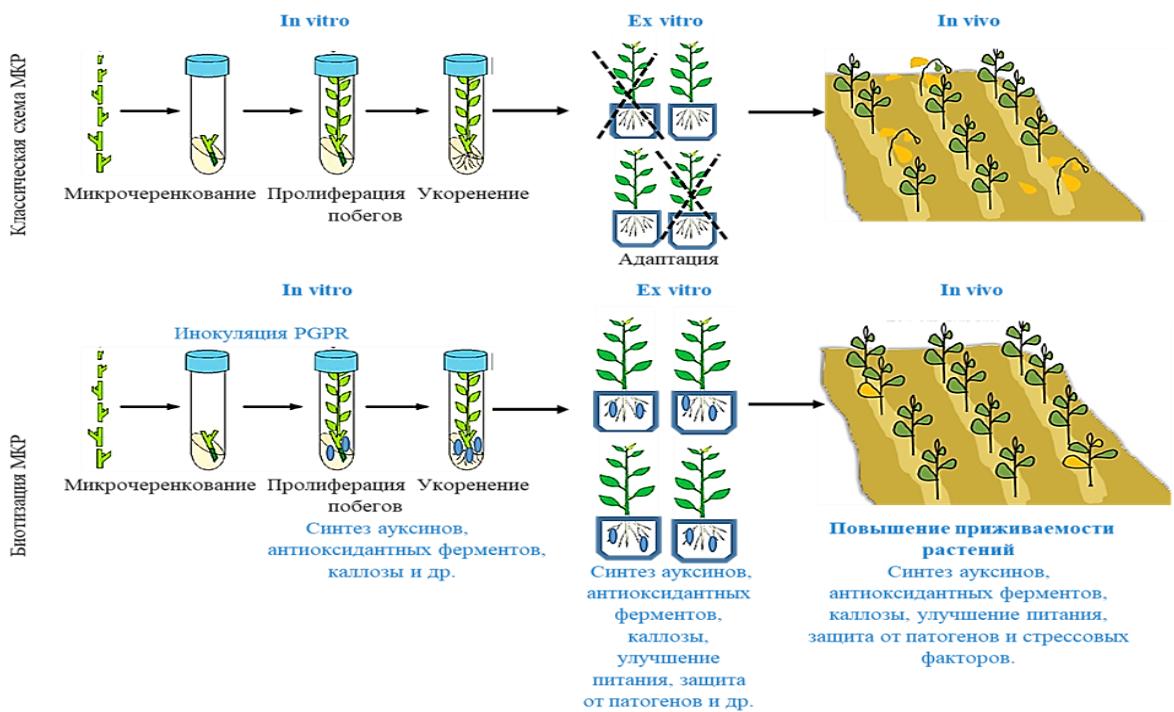


Рисунок 5.24 – Схема оптимизации метода микроклонального размножения в рамках технологий производства оздоровленного посадочного материала картофеля

Выводы

1. Впервые предложена генетическая модель, состоящая из набора почти изогенных линий в генофоне сорта мягкой пшеницы Саратовская 29, альтернативных по гену короткостебельности *RhtB1c*, и отличающихся различной активностью морфогенетических процессов, которая может быть использована для изучения влияния различных факторов в культуре соматических тканей *in vitro*.
2. Предложен новый подход к повышению морфогенной активности соматических каллусов пшеницы: ризобактерии рода *Azospirillum* убитые нагреванием могут оказывать стимулирующее влияние на выход морфогенных каллусов и регенерантов, в отличии от живых клеток, которые вызывают фитоиммунные реакции и некроз клеток каллусов.
3. Впервые установлено, что липополисахариды бактерий *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasiliense* sp 7 и *A. lipoferum* SR65 стимулируют процессы вторичной дифференциации и регенерационную способность каллусных клеток пшеницы, повышая эффективность культивирования генотипов с низким морфогенным потенциалом. Наибольшей физиологической активностью в отношении каллусных клеток обладает ЛПС, присутствующий в среде культивирования в концентрации 10 мкг/мл. Способность ЛПС ризосферных бактерий рода *Azospirillum* spp. стимулировать морфогенез соматических тканей пшеницы определяется специфичностью механизмов действия ЛПС ассоциативных бактерий и зависит от особенностей строения полисахаридов.
4. Определены оптимальные условия для проявления рост-стимулирующей для растений активности бактерий: концентрация бактерий 10^6 клеток в мл полужидкой питательной среды с содержанием агар-агара 3,5 г/л и полным составом солей по прописи Мурасиге-Скуга. Бактерии, неспособные к самостоятельному росту на питательной среде для культивирования микрорастений (например, *A. brasiliense* sp7, *A. baldaniorum* Sp245), могут эффективно инокулировать микрочеренки картофеля с первых дней культивирования *in vitro* и стимулировать рост побегов и корней. Бактерии,

активно автономно растущие в питательной среде (например, *O. cytisi* IPA7.2), могут использоваться как рост-стимулирующие только во второй половине или в конце периода культивирования *in vitro*.

5. Бактеризация бактериями *A. baldaniorum* Sp245 повышает качество выращиваемых растений как в культуре *in vitro*, так и в условиях *ex vitro* по сравнению с существующей традиционной техникой их микроклонального размножения. На этапе культивирования *in vitro* у бактеризованных растений достоверно увеличивается число узлов на побегах и корней. На этапе адаптации к условиям *ex vitro* у бактеризованных растений существенно повышается скорость роста побегов за счет увеличения их длины и формирования новых узлов с листьями, а также площади поверхности листьев. Приживаемость инокулированных бактериями растений в естественных условиях в среднем по генотипам повышается по сравнению со стерильными растениями в 1,5 раза. Урожайность мини-клубней с 1 растения у бактеризованных растений в среднем по сортам увеличивается на 40% по сравнению с контролем.

6. После однократной инокуляции микрорастений картофеля в культуре *in vitro* бактерии рода *Azospirillum* сохраняются в ряду последовательных пассажей, что делает методику стимулирования роста растений при микроклональном размножении с применением ассоциативных микроорганизмов высоко технологичной. Бактерии сохраняют рост-стимулирующую способность в отношении микрорастений в процессе пассирования в культуре *in vitro* и при адаптации микрорастений в условиях *ex vitro*.

7. Обнаружен положительный эффект ко-инокуляции микрорастений картофеля в культуре *in vitro* бактериальными штаммами разных таксономических групп. Максимальный положительный эффект от ко-инокуляции микрорастений картофеля в культуре *in vitro* наблюдали в варианте *A. baldaniorum* Sp245 + *K. rosea* T1Ks19.

8. Показано, что стимулирующее действие бактерий *A. baldaniorum* Sp245 на рост и адаптацию микрорастений картофеля в условиях *in vitro* связано с повышением уровня ауксинов и цитокининов в листьях и побегах. Бактерии *A.*

baldaniorum Sp245 способствуют накоплению каллозы в листьях и корнях, что может повышать адаптационный потенциал микрорастений в условиях *ex vitro*.

9. Липополисахариды ризобактерий, например, *Ochrobactrum quorumnocens* T1Kr02 и *Azospirillum thiophilum* BV-S, могут быть применены для симулирования роста микрорастений, что исключает риск контаминации культуры по сравнению с использованием живых бактерий.

10. Создана модернизированная технология производства оздоровленного посадочного материала картофеля, основанная на формировании эффективного растительно-микробного ассоциативного комплекса между микрорастениями картофеля и живыми ризосферными рост-стимулирующими бактериями.

Практические предложения

Рекомендуется при использовании культуры соматических каллусов пшеницы для повышения морфогенетической и регенерационной активности вводить в состав индукционной питательной среды ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 в концентрации 10 мг/л. В системе семеноводства оздоровленного посадочного материала картофеля на этапе микроклонального размножения следует инокулировать микрочеренки на этапе культивирования *in vitro* суспензиями бактерий *A. brasiliense* sp7 и *A. baldaniorum* Sp245 или комбинацией *A. baldaniorum* Sp245 + *K. rosea* T1Ks19 в концентрации 10^6 клеток на мл питательной среды для стимулирования роста микрорастений и повышения их адаптационной способности.

Перспективы дальнейшей разработки темы

В дальнейших исследованиях может быть расширен перечень изучаемых ризосферных бактерий для поиска эффективных инокулянтов. Необходимо продолжать исследовать механизмы воздействия ризобактерий на клетки и ткани растений *in vitro*, *ex vitro* и *in vivo*, а также их роль в повышении толерантности растений к биотическим и абиотическим стрессам.

Список сокращений и условных обозначений

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота;
6-БАП – 6-бензиламинопурин;
АБК – абсизовая кислота;
ИПА – N6-изопентениладенозин (iPA)
ИУК – индолил-3-уксусная кислота;
ИФА – иммуноферментный анализ;
ЛПС – липополисахарид;
МС – питательная среда Мурасиге и Скуга;
ПАИ – пролиферативный антиген инициалей;
ПЦР-РВ – метод полимеразной цепной реакции в реальном времени;
PGPB – ризосферные рост-стимулирующие бактерии (plant growth-promoting bacteria).

Словарь терминов

Биоценотический способ культивирования клеток и тканей растений *in vitro* – способ, основанный на создании в условиях *in vitro* активных растительно-микробных ассоциаций, основанных на мутуалистических отношениях симбионтов;

Гнотобионтная культура – способ асептического выращивания организма, клеток или тканей;

Голобионтная культура – система организмов, включающая эукариотический макросимбионт с микроорганизмами экзо- и эндосимбионтами (микросимбионтами);

Липополисахарид (ЛПС) – макромолекула, состоящая из полисахарида, ковалентно-соединённого с липидом, основной компонент внешней мембраны грамотрицательных бактерий. ЛПС включает 3 ковалентно-связанных компонента: липид А, центральный олигосахарид, О-антителен;

Метод клонального микроразмножения (микроклонального размножения) *in vitro* – метод вегетативного размножения растений с использованием технологии культивирования клеток, тканей и органов растений *in vitro*;

Пролиферативный антиген инициалей (ПАИ) – цитозольный белок, являющийся молекулярным маркером меристематических клеток пшеницы;

Ризосферные рост-стимулирующие бактерии (plant growth-promoting bacteria, PGPB) – бактерии различных таксономических групп, обитающие в ризосфере и способные стимулировать рост растений;

Эмбриоидогенез и органогенез в культуре соматических клеток – направление морфогенеза в культуре соматических клеток и тканей растений *in vitro* приводящее к формированию соматических эмбриоидов или органов (почек, побегов);

Список литературы

1. Авксентьева, О.А. Биотехнология высших растений: культура *in vitro*: учебно-методическое пособие / О.А. Авксентьева, В.А. Петренко. – Х.: ХНУ имени В. Н. Каразина. – 2011. – 60 с.
2. Авксентьева, О.А. Роль генотипа, состава среды и типа экспланта в формировании первичного каллюса изогенных линий пшеницы / О.А. Авксентьева, В.А. Петренко // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2009. – Вип. 9, № 856. – С. 56–62.
3. Акимова, Е.Е. Влияние бактерий *Pseudomonas* sp. B-6798 на фитопатологическое состояние картофеля в полевых экспериментах / Е.Е. Акимова, О.М. Минаева // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2009. – Т. 2, № 6. – С. 42–47.
4. Андреева, В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений / В.А. Андреева – М.: Наука. – 1988. – 128 с.
5. Архипова, Т.Н. Влияние инокуляции растений пшеницы цитокининпродуцирующими микроорганизмами на рост растений при повышении уровня минерального питания / Т.Н. Архипова, Н.Л. Анохина // Физиология растений. – 2009. – Т.56, № 6. – С. 899–906.
6. Батыгина, Т.Б. Репродукция растений: теоретические разработки и инновационные технологии / Т.Б. Батыгина, Г.Е. Титова, В.Е. Васильева // Инновации. – 2007. – Т. 2, № 100. – С. 39–46.
7. Биохимическая оценка морфогенетического потенциала каллусных клеток пшеницы *in vitro* / Н.В. Евсеева, О.В. Ткаченко, Ю.В. Лобачев, [и др.] // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 2. – с. 306–311.
8. Бишимибаева, Н.К. Изучение клеточных механизмов индукции и длительного поддержания totipotentности *in vitro* у зерновых злаков / Н.К. Бишимибаева // Тезисы X Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» Казань. – 2013. – С. 99.

9. Бишимбаева, Н.К. Роль отложения каллозы в процессе соматического эмбриогенеза пшеницы / Н.К. Бишимбаева, А.К. Амирова, И.Р. Рахимбаев // Биотехнология. Теория и практика. – 2007. – № 2. – С. 44–49.
10. Бишимбаева, Н.К. Сомаклональная вариабельность как источник получения новых форм пшеницы с ценными признаками / Н.К. Бишимбаева // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2012. – Т. 55, №3. – С. 41–46.
11. Боронин, А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений / А.М. Боронин // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 10. – С. 25–31.
12. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК–ПРЕСС. – 1999. – 160 с.
13. Бутенко, Р.Г. Индукция морфогенеза в культуре тканей растений. Гормональная регуляция онтогенеза растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука. – 1984. – 54 с.
14. Бутенко, Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука. – 1964. – 272 с.
15. Бутенко, Р.Г., Специфика антигенов в цикле клеточных превращений в культуре ткани табака / Р.Г. Бутенко, А.Д. Володарский // Физиология растений. – 1967. – № 14. – С. 965–971.
16. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями: механизмы образования и факторы эффективности ассоциативных симбиозов (обзор) / А.И. Шапошников, А.А. Белимов, Л.В. Кравченко, Д.М. Виванко // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 3. – С. 16–22.
17. Влияние 6-бензиламинопурина на рост и гормональную систему проростков пшеницы в условиях солевого стресса / А.М. Авальбаев, Р.А. Юлдашев, Ю.В. Сафутдинова и др. // Агрохимия. – 2010. – № 9. – С. 60–65.
18. Влияние активирующегося при эмбриогенезе гена NtDCN1 на органогенез в культуре тканей табака / Ю.И. Долгих, А.Ю. Степанова, Е.С. Оsipova [и др.] // Физиология растений. – 2010. – Т. 57, № 1. – С. 125–130.

19. Влияние ассоциативных микроорганизмов на устойчивость томатов к фитопатогенам *in vitro* и *in vivo* / Н.С. Захарченко, М.А. Чепурнова, Л.С. Карнова [и др.]// Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2010а. – № 1. – С. 175–185.
20. Влияние ассоциативных псевдомонад и метилобактерий на рост и устойчивость растений к фитопатогенам и ксенобиотикам / Н.С. Захарченко, С.В. Пиголева, В.В. Кочетков [и др.]// Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 1. – С. 89.
21. Влияние аэробных метилотрофных бактерий на морфогенез пшеницы мягкой (*Triticum aestivum*) *in vitro* / М.А. Каляева, Е.Г. Иванова, Н.В. Доронина [и др.]// Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 3. – С. 354–359.
22. Влияние микроорганизмов, производящих цитокинины, на рост растений / Т.Н. Архипова, С.Ю. Веселов, А.И. Мелентьев [и др.] // Биотехнология. – 2006. – № 4. – С. 50–55.
23. Влияние ризосферных бактерий *Pseudomonas aureofaciens* на устойчивость растений к фитопатогенам при микроразмножении / Н.С. Захарченко, В.В. Кочетков, Я.И. Бурьянов, А.М. Боронин // Биотехнология. – 2010. – № 5. – С. 81–88.
24. Волкогон, В.В. Особенности взаимоотношений бактерий рода *Azospirillum* с растениями картофеля, культивируемыми *in vitro* / В.В. Волкогон, С.Б. Димова, А.Е. Мамчур // Сельскохозяйственная микробиология. – 2006. – № 3. – С. 19–25.
25. Володарский, А.Д. Антигенный состав клеток апикальной меристемы клеток ржи при торможении ее ростовых процессов эфетоном / А.Д. Володарский, Н.В. Курушина, О.И. Романовская // Физиология растений. – 1986. – Т. 33, № 1. – С. 116–121.
26. Выявление специфических RAPD- и ISSR-фрагментов у сомаклонов кукурузы (*Zea mays L.*) и создание на их основе SCAR-маркеров / Е.С. Осипова, З.Г. Кокаева, А.В. Троицкий [и др.] // Генетика. – 2003. – Т. 39, № 12. – С. 1664–1672.

27. Выявление чехла на поверхности полярного жгутика *Azospirillum brasilense* / Г.Л. Бурыгин, А.А. Широков, А.В. Шелудько [и др.] // Микробиология. – 2007. – Т. 76., № 6. – С. 822–829.
28. Галеева, Е.И. Влияние салициловой кислоты на некоторые морфофизиологические показатели и белковый состав каллусов гречихи татарской: дисс. ...канд. биол. наук: 03.00.12 / Екатерина Инсафовна Галеева – Казань, 2003. – 116 с.
29. Генетика развития растений: для биологических специальностей университетов / Л.А. Лутова, Т.А. Ежова, И.Е. Додуева, [и др.]. – 2-е изд. перераб. и доп. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. – 432 с.
30. Генетические основы селекции растений. Том 3 Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия / В.С. Анохина [и др.]. – Минск: Белорусская наука, 2012. – 490 с.
31. Горбунова, В.Ю. Индукция андрогенеза *in vitro* у яровой мягкой пшеницы. Баланс экзогенных и эндогенных фитогормонов / В.Ю. Горбунова, Н.Н. Круглова, С.Н. Абрамов // Изв. РАН. Сер. биол. – 2001. – № 1. – С. 31–36.
32. ГОСТ 33996-2016. Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества. – М.: Стандартинформ, 2017. – 31 с.
33. ГОСТ Р 59551-2021. Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов. – М.: Стандартинформ, 2021. – 23 с.
34. Гусев, М.В. Ассоциированная культура клеток табака *Nicotiana tabacum* и цианобактерии *Anacystis nidulans* / М.В. Гусев, Т.Г. Корженевская, И.Б. Ягодина // Физиология растений. – 1982. – Т.29, № 3. – С. 550–556.
35. Деменко, В.И. Адаптация растений, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям / В.И. Деменко, В.Г. Лебедев // Изв. ТСХА. – 2011. – Вып. 1. – С. 60–70.
36. Деменко, В.И. Укоренение – ключевой этап размножения растений *in vitro* / В.И. Деменко, К.А. Шестибраторов, В.Г. Лебедев // Известия ТСХА. – 2010. – Вып. 1. – С.73–85.
37. Дитченко, Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений: Курс лекций / Т.И. Дитченко. – Минск: БГУ, 2007. – 102 с.

38. Добровольская, Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв / Т.Г. Добровольская. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2002. – 282 с.
39. Дорошенко, Н.П. Применение салициловой кислоты на этапе ввода в культуру *in vitro* подвойных сортов винограда / Н.П. Дорошенко // Мобилизация и сохранение генетических ресурсов винограда, совершенствование методов селекционного процесса: сборник научных статей. ГНУ Всероссийского НИИ виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко Россельхозакадемии. [Электронный ресурс] – Новочеркасск: Издательство ГНУ ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко, 2008. – Режим доступа: <https://vinograd.info/stati/stati/primenie-salicilovoy-kisloty-na-etape-vvoda-v-kulturu-in-vitro-podvoynyh-sortov-vinograda.html>
40. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). 5-е изд., доп. и перераб. / Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
41. Дунаева, С.Е. Бактериальные микроорганизмы, ассоциированные с тканями растений в культуре *in vitro*: идентификация и возможная роль (Обзор) / С.Е. Дунаева, Ю.С. Оследкин // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т.50, № 1. – С. 3–15.
42. Евсеева, Н.В. Иммунохимическое исследование пролиферативного антигена инициалей апикальной меристемы побега у пшениц с различной устойчивостью к экстремальным факторам внешней среды: Автореф. дис. ...канд. бiol. наук. – М.: ИФР РАН, 1993. – 24с.
43. Евстигнеева, С.С. Биотехнологический потенциал бактерий рода *Azospirillum*: Характеристика флокулирующих культур как наиболее перспективных форм для инокуляции растений / С.С. Евстигнеева, Ю.П. Федоренко // Актуальная биотехнология. – 2018. – Т. 3, № 26. – С. 98–102.
44. Ежова, Т.А. Генетический контроль totipotentности растительных клеток в культуре *in vitro* / Т.А. Ежова // Онтогенез. – 2003. – №. 34. – С. 245–252.
45. Заботин, А.И. Исследование регуляции метabolизма каллозы в клетках высших растений *in vitro* // А.И. Заботин, Т.С. Барышева // Физиология растений. – 2002. – Т. 49, № 6. – С. 890–897.

46. Зинатуллина, А.Е. Цитофизиологические особенности контрастных типов каллусов *in vitro*/ А.Е. Зинатуллина // Успехи соврем. биол. – 2020. – Т. 140., № 1. – С. 183–194.
47. Игнатова, С.А. Морфогенез в культуре незрелых зародышей изогенных линий ячменя / С.А. Игнатова, Г.П. Бондарь, К.В. Литовкин // Цитология и генетика. – 1999. – № 5. – С.14–19.
48. Идентификация двух ризосферных изолятов стрептомицетов и изучение *in vitro* их колонизирующей активности / Я.И. Назарова, И.Г. Широких, А.В. Бакулина [и др.]// Теоретическая и прикладная экология. – 2019. – № 3. – С. 72–79.
49. Изучение генетической обусловленности и наследуемости каллусообразующей и регенерационной способности пшеницы / М.К. Карабаев, Ж.К. Джардемалиев, Г.Е. Дарканбаева, О.Ш. Шегебаев // Материалы Всесоюзной научной конференции по сельскохозяйственной биотехнологии: Тезисы докл. – Целиноград, 1991. – С. 29–30.
50. Изучение росторегулирующей и протекторной активности внеклеточных полисахаридов из культуры клеток пшеницы / А.К. Парменова, Г.А. Кампитова, Н.К. Бишимибаева, С.К. Казыбекова // Іздністер, нэтижелер. Исследования, результаты. – 2015. – № 1. – С. 313–316.
51. Ильчуков, В.В. Культивирование каллусной ткани пшеницы с азотофиксирующими бактериями рода *Azospirillum* / В.В. Ильчуков // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2012. – №. 6. – С. 28–29.
52. Калашникова, Е. А. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии / Е.А. Калашникова, Е.З. Кошева, О.Ю. Миронова – М.: Колос, 2006. – 144 с.
53. Калинин, Ф.Л. Метод культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев: Наукова думка, 1980. – 399 с.
54. Карабаев, М.К. Культивируемые клетки пшеницы и кукурузы. Морфогенез и толерантность / М.К. Карабаев, Ж.К. Джардемалиев // Физиология растений. – 1994. – Т. 41, № 6. – С. 807–814.

55. Катаева, Н.В. Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1983. – 96 с.
56. Катасонова, А.А. Этапы биотехнологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы путем эмбриоидогенеза в каллусной культуре *in vitro* / А.А. Катасонова, И.Ф. Шаяхметов, Н.Н. Круглова // Известия Челябинского научного центра. – 2006. – Вып. 2, № 32. – С. 78–82.
57. Колонизация корней пшеницы бактериями *Azospirillum brasiliense* с различной подвижностью / А.В. Шелудько, А.А. Широков, М.К. Соколова [и др.] // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 5. – С. 696–704.
58. Копертех, Л.Г. Ацетон как нетрадиционная добавка к среде культивирования клеток пшеницы / Л.Г. Копертех, Р.Г. Бутенко. – 1995. – С. 115–118.
59. Костина, Е.Е. Морфогенетический потенциал короткостебельных линий подсолнечника в культуре соматических тканей *in vitro* / Е.Е. Костина, Ю.В. Лобачев, О.В. Ткаченко // Современные проблемы науки и образования. [Электронный ресурс] – 2016. – № 2. – Режим доступа: URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24256>
60. Куликов, И.М. Рентабельность клонального микроразмножения винограда и ягодных кустарников / И.М. Куликов, В.А. Высоцкий, А.А. Шипунова // Современные достижения биотехнологии в виноградарстве и других отраслях сельского хозяйства. – 2005 – С. 163–169.
61. Лобакова, Е.С. Особенности инфицирования растений и их культивируемых тканей ассоциативными цианобактериально-бактериальными комплексами микросимбионтов / Е.С. Лобакова, А.Г. Щелманова, Т.Г. Корженевская, М.В. Гусев // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 3. – С. 352–359.
62. Лобачев, Ю.В. Влияние консистенции питательной среды и генетических факторов на морфогенез подсолнечника *in vitro* / Ю.В. Лобачев, Е.Е. Костина, О.В. Ткаченко / Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – № 3. – С. 60–61.
63. Лобачев, Ю.В. Проявление генов низкорослости у яровых пшениц в Нижнем Поволжье / Ю.В. Лобачев. – Саратов: Изд-во СГАУ, 2000. – 264 с.

64. Лутова, Л.А. Биотехнология высших растений / Л.А. Лутова. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2010. – 238 с.
65. Лутова, Л.А. Генная и клеточная инженерия в биотехнологии высших растений: учебник / Л.А. Лутова, Т.В. Матвеева; под ред. Акад. И.А. Тихоновича. – СПб.: Эко-Вектор, 2016. – 168 с.
66. Мамонтова, В.Н. Сорта яровой пшеницы саратовской селекции и методы их выведения / В.Н. Мамонтова // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1977. – № 12. – С. 32–39.
67. Мартынов, С.П. Пакет программ статистического биометрико-генетического анализа Agros версия 2.10 / С.П. Мартынов, Н.Н. Мусин, Т.В. Кулагина. – 1993–2000.
68. Мирошниченко, Д.Н. Оптимизация условий для эффективного соматического эмбриогенеза и регенерации растений *in vitro* яровых сортов мягкой пшеницы / Д.Н. Мирошниченко, М.В. Филиппов, С.В. Долгов // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2012. – № 6. – С. 22–26.
69. Новикова, Т.И. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* центрального сибирского ботанического сада / Т.И. Новикова, А.Ю. Набиева, Т.В. Полубоярова // Вестник ВОГиС. – 2008. – Т. 12, № 4. – С. 564–572.
70. Омельянчук, Н.А. Использование изогенных линий для изучения каллусообразования и регенерации / Н.А. Омельянчук, А.В. Гвоздев // I Всесоюзное совещание «Использование изогенных линий в селекционно-генетических экспериментах»: Тезисы докл. – Новосибирск, 1990. – С. 96–98.
71. Оптимизация метода индукции регенерации *in vitro* инбредных линий и гибридов подсолнечника / С.И. Михальская, А.Г. Комисаренко, А.Е. Малина [и др.]// Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – 41. – С. 255–262.
72. Патент № 2380886 Российская Федерация С1 МПК A01G13/00 (2006.01), A01N63/00 (2006.01). Способ защиты посадочного материала растений против заболеваний, вызываемых фитопатогенными микроорганизмами: № 2008122008/12: заявл. 03.06.2008: опубл. 10.02.2010 / Н.С. Захарченко, В.В. Ко-

четков, Я.И. Бурянов, А.М. Боронин; заявитель ИБФР им. Г.К. Скрябина РАН, ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. – 9 с.

73. Пузанков, О.П. Методические указания по оздоровлению семенного картофеля / О.П. Пузанков, А.К. Гришанович [и др.]. – Минск: Урожай, 1988. – С. 29.

74. Реакция каллусной культуры и регенерантных растений ячменя на бактеризацию *Methylobacterium mesophylicum* / И.Г. Широких, О.Н. Шуплецова, С.Ю. Огородникова, А.А. Широких // Теоретическая и прикладная экология. – 2010. – № 4. – С. 54–62.

75. Ризосферные бактерии / Н.В. Феоктистова, А.М. Марданова, Г.Ф. Хадиева, М.Р. Шарипова // Ученые записки Казанского университета. Серия естественные науки. – 2016. – Т. 158, № 2. – С. 207–224.

76. Роговаяя, В.В. Особенности микроклонального размножения косточковых культур в условиях *in vitro* / В.В. Роговаяя, М.А. Гвоздев // Известия РГПУ им. А. И. Герцена. [Электронный ресурс] – 2005. – №13. – Режим доступа: URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-mikroklonalnogo-razmnozheniya-kostochkovyh-kultur-v-usloviyah-in-vitro> (дата обращения: 20.05.2021).

77. Рост ассоциативной культуры клеток женьшеня и цианобактерии *Chlorogloea fritschii* в темноте и на свету / Р.Г. Бутенко, М.В. Гусев, Т.Г. Корженевская, Е.С. Лобакова // Физиология растений. – 1982. – Т. 29, № 6. – С. 995–1001.

78. Руководство по апробации полевых культур в Поволжье. / Под ред. Ю.Д. Козлова, В.А. Морозова. – Саратов: Приволж. кн. изд-во, 1980. – 120 с.

79. Симаков, Е.А. Новые технологии производства оздоровленного исходного материала в элитном семеноводстве картофеля / Е.А. Симаков, А.И. Усков, Ю.А. Варицев. – М.: ГПУ «Агропрогресс», 2000. – С. 23.

80. Скрининг регенерационного потенциала ди-, тетра- и гексапloidных сортов и видов пшеницы в культуре *in vitro* / Д.Н. Мирошниченко, Р.Н. Соколов, О.В. Аликина, С.В. Долгов // Биотехнология. – 2014. – № 1. – С. 38–51.

81. Смирнова, Ю.Д. Приемы повышения эффективности микроклонального размножения картофеля (обзор) / Ю.Д. Смирнова, Е.А. Подолян // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2024. – Т. 25, № 3. – С. 319–329.
82. Соболева, М.И. Статистические характеристики, маркирующие морфогенез в каллусных культурах яровой мягкой пшеницы / М.И. Соболева, И.В. Логинов // Физиология растений. – 2004. – Т. 51, № 2. – С. 287–296.
83. Создание ассоциации *in vitro* картофеля с бактериями рода *Azospirillum* / Н.В. Бойкова, О.В. Ткаченко, Н.В. Евсеева [и др.] // Аграрный научный журнал. – 2015. – № 7. – С. 3–7.
84. Соловых, Н.В. Клональное размножение ягодных культур *in vitro* / Н.В. Соловых, С.А. Муратова, М.Б. Янковская // «Актуальные проблемы размножения ягодных культур и пути их решения»: мат. Междунар. научн.-метод. дистанционной конф. [Электронный ресурс], 2010. – Режим доступа: <http://konferenc2010.narod.ru>.
85. Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro* и криоколлекциях / С.Е. Дунаева, Г.И. Пендинен, О.Ю. Антонова, [и др.] / Метод. указ. Под ред. Т.А. Гавриленко – СПб: ГНУ ВИР Россельхозакад, 2011. – 64 с.
86. Сравнительный анализ содержания пролиферативного антигена инициальных клеток в культуре *in vivo* и *in vitro* пшеницы / О.В. Ткаченко, Ю.В. Лобачев, Н.В. Евсеева [и др.] // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2007. – № 1. – 27–31.
87. Стендифер, Д.К. Иммуноферментный анализ гаптенов и антигенов с разделением компонентов (гетерогенный анализ) / Д.К. Стендифер // В кн. Иммуноферментный анализ: Пер. с англ. / Под редакцией Т. Нго и Г. Ленхоффа. – М.: Мир, 1988. – С. 172–192.
88. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам (Обзор) / И.В. Максимов, С.В. Веселова, Т.В. Нужная [и др.] // Физиология растений. – 2015. – Т.62, № 6. – С. 763–775.

89. Стимуляция метанотрофными бактериями морфогенеза пшеницы *in vitro* / М.А. Каляева, Е.Г. Иванова, Н.В. Доронина [и др.] // Доклады Академии наук. – 2003а. – Т. 388, № 6. – С. 847–849.
90. Стимуляция роста и морфогенеза растений *in vitro* ассоциативными аэробными метилотрофными бактериями *Methylobacterium extorquens* D10, образующими цитокинины, ауксины и витамин В12 / Н.В. Доронина, Д.Н. Федоров, М.В. Шихсаидов, О.Н. Пономарева // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2010. – Вып. 1. – С. 215–225.
91. Стимуляция роста и морфогенеза растений *in vitro* ассоциативными метилотрофными бактериями / М.А. Каляева, Н.С. Захарченко, Н.В. Доронина, Е.Б. Рукавцова [и др.] // Физиология растений. – 2001. – Т. 48, № 4. – С. 596–599.
92. Страхова, М.В. Влияние гена ntsm10 на органогенез в культуре тканей табака / М.В. Страхова, И.А. Дудникова // Ломоносов: Секция «Биология», 2008. – С. 28–29.
93. Тимина, О.О. Признак "переключение фаз репродукции" и особенности методологии его изучения у *Capsicum annuum var. Annuum L* / О.О. Тимина // Вестник Приднестровского университета. Серия: Медико-биологические и химические науки. – 2011. – Т. 2, № 38. – С. 97–107.
94. Тихонович, И.А. Принципы селекции растений на взаимодействие с симбиотическими микроорганизмами / И.А. Тихонович, Н.А. Проворов // Вестник ВОГиС. – 2005. – Т. 9, № 3. – С. 295–305.
95. Ткаченко, О.В. Разработка эффективных методов культивирования клеток и тканей *in vitro* / О.В. Ткаченко, Ю.В. Лобачев // Вестник Саратовского госагроуниверситета. – 2012. – № 10. – С.95–97.
96. Тырышкин, Л.Г. Каллусогенез и регенерация в культуре тканей пшеницы / Л.Г. Тырышкин, О.Г. Козырева // Генетические механизмы устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды: Тезисы сообщ. –Иркутск, 1991. – С. 110.
97. Умаров, М.М. Ассоциативная азотфиксация / М.М. Умаров – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1986. –133 с.

98. Умаров, М.М. Микробиологическая трансформация азота в почве / М.М. Умаров, А.В. Кураков, А.Л. Степанов – М.: ГЕОС, 2007. – 137 с.
99. Участие фитогормонов в формировании взаимоотношений проростков пшеницы с эндофитным штаммом *Bacillus subtilis* 11ВМ // А.А. Егоршина, Р.М. Хайруллин, А.Р. Сахабутдинова, М.А. Лукьянцев // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 1. – С.148–155.
100. Фадеев, В.С. Индукционная, регенерационная и баллистическая восприимчивость различных генотипов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / В.С. Фадеев, Х.Р. Шимшилашвили, А.К. Гапоненко // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 9. – С. 1257–1267.
101. Хотылева, Л.В. Изучение генетической регуляции каллусообразования и стеблевого органогенеза из каллуса у пшеницы / Л.В. Хотылева, А.П. Ермишин // 3-я Всесоюзная конференция «Культура клеток растений»: Тезисы докл., 1979. – С. 180.
102. Цитофизиологические особенности экспериментальной системы «зародыш *in vivo* – каллус *in vitro*» хлебных злаков / Н.Н. Круглова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдимирова, А.Е. Зинатуллина // Онтогенез. – 2021. – Т. 52, № 4 – С. 237–253.
103. Широких, И.Г. Бактеризация микрорастений картофеля *in vitro* ризобактериями *Streptomyces* повышает эффективность культивирования / И.Г. Широких, С.Э. Мокрушина, Р.И. Абубакирова // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2024. – Т. 25., №5. – С. 855–864. – doi: 10.30766/2072-9081.2024.25.5.855-864.
104. Широких, И.Г. Индукция морфогенеза в каллусной ткани ячменя / И.Г. Широких, А.В. Бакулина, Г.А. Баталова // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2014. – № 3. – С. 6–10.
105. Экспрессия ранних ауксинзависимых генов в корнях проростков арабидопсиса / М.Ф. Шишова, М. Пахлер, Ф. Шталь, Г. Шерер // Экологическая генетика. – 2014. – Т. 12., № 2. – С. 35–46.
106. Эндофитные микроорганизмы как промоутеры роста растений в культуре *in vitro* (обзор) / Л.С. Самарина, В.И. Маляровская, Е.В. Рогожина, Л.С. Ма-

люкова // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т. 52, № 5. – С. 917–927. – doi: 10.15389/agrobiology.2017.5.917rus.

107. Яблонская, М.И. Биотизация растений *in vitro* / М.И. Яблонская, М.С. Гинс, М.А. Молчанова // Вестник РУДН, серия Агрономия и животноводство. – 2016. – № 1. – С. 15–20.

108. 2-chloroethylphosphonic acid and morphogenesis. Symposium F10rize187 ArIon-Belgium / C.D. Cachita, F. Achim, V. Cristea, K. Gerley // Plant micropropagation in horticultural industries. – 1987. – P. 234–237.

109. A century of Azospirillum: plant growth promotion and agricultural promise / R. Pelagio-Flores, G. Ravelo-Ortega, E. García-Pineda, J. López-Bucio // Plant Signaling & Behavior. – 2025. – V. 20, N 1. – 2551609.

110. A comparison of epiblast callus and scutellum callus induction in wheat: the effect of embryo age, genotype and medium / D.G. He, Y.M. Yang, G. Dahler, K.J. Scott // Plant Sci. – 1988. – V. 57. – P. 225–233.

111. A GH3 family member, OsGH3-2, modulates auxin and abscisic acid levels and differentially affects drought and cold tolerance in rice / H. Du, N. Wu, J. Fu [et al.] // J. Exp. Bot. – 2012. – V. 63. – P. 6467–6480.

112. A Leucine Rich Repeat Containing Receptor Like Kinase Marks Somatic Plant Cells Competent to Form Embryos / E.D.L. Schmidt, F. Guzzo, M.A.J. Toonen, S.C. de Vries // Development. – 1997. – V. 124. – P. 2049–2062.

113. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos / E.D. Schmidt, F. Guzzo, M.A. Toonen, S.C. de Vries // Development. – 1997. – V. 124. – P. 2049–2062.

114. A passion fruit putative ortholog of the SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE1 gene is expressed throughout the *in vitro* de novo shoot organogenesis developmental program / D.I. Rocha, C.C. Monte-Bello, L.C.B. Aizza, M.C. Dornelas // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2016. – V. 125. – P. 107–117.

115. Abd El-Daim, I. Improved heat stress tolerance of wheat seedlings by bacterial seed treatment / I. Abd El-Daim, S. Bejai, J. Meijer // Plant and Soil. – 2014. – V. 379. – P. 337–350.

116. Abel, S. Early genes and auxin action / S. Abel, A. Theologis // Plant Physiol. – 1996. – V. 111. – P. 9–17.
117. Abscisic acid induces somatic embryogenesis and enables the capture of high-value genotypes in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* [MIRB.] Franco) / M. Walther, I. Wagner, J. Raschke, K. Zoglauer [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2022. – V. 148. – P. 45–59.
118. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land / S. Chandra, R. Bandopadhyay, V. Kumar, R. Chandra // Biotechnol. Lett. – 2010. – V. 32. – P. 1199–1205.
119. Accumulation of cytokinins in roots and their export to the shoots of durum wheat plants treated with the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) / G.R. Kudoyarova, A.V. Korobova, G.R. Akhiyarova [et al.] // J. Exp. Bot. – 2014. – V. 65. – P. 2287–2294.
120. Acemi, A. Chitosan versus plant growth regulators: a comparative analysis of their effects on *in vitro* development of *Serapias vomeracea* (Burm.f.) Briq. / A. Acemi // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2020 – V. 141. – P. 327–338.
121. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms / A.E. Richardson, J.M. Barea, A.M. McNeill, C. Prigent-Combaret // Plant Soil. – 2009. – V. 321, N 1–2. – P. 305–339.
122. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013) / Y. Bashan, L.E. de-Bashan, S.R. Prabhu, J.-P. Hernandez // Plant Soil. – 2014. – V. 378. – P. 1–33.
123. Ahmadi, B. Proline and chitosan enhanced efficiency of microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration in *Brassica napus* L. / B. Ahmadi, M.E. Shariatpanahi // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2015. – V. 123, N 1. – P. 57–65.
124. Aitken, J. Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissues of *Pinus radiata* / J. Aitken, K.J. Horgan, T.A. Thorpe // Can. J. Forest Res. – 1981. – V. 11. – P. 112–117.

125. Amoo, S.O. The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems / S.O. Amoo, J.F. Finnie, J. Van Staden // Plant Growth Regul. – 2011. – V. 63. – P. 197–206.
126. Appelgren, M. Effect of light quality on stem elongation of *Pelargonium in vitro* / M. Appelgren // Sci. Hortic. – 1991. – V. 45. – P. 345–351.
127. Appelgren, M. Regeneration in *Streptocarpus* leaf discs and its regulation by temperature and growth substances / M. Appelgren, O. Heide // Physiol. Plant. – 1972. – V. 27. – P. 417–423.
128. Application of meta-topolin for improving micropropagation of gooseberry (*Ribes grossularia*) / D. Kucharska, T. Orlikowska, R. Maciorowski [et al.] // Sci. Hortic. – 2020. – V. 272. – 109529.
129. Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells / T. Lotan, M. Ohto, K.M. Yee [et al.] // Cell. – 1998. – V. 93. – P. 1195–1205.
130. Arditti, J. Micropropagation of orchids / J. Arditti / Second edition. Blackwell Pub, 2008. – 1547 p.
131. Arslan, E. Biotization of *Arabidopsis thaliana* with *Pseudomonas putida* and assessment of its positive effect on *in vitro* growth / E. Arslan, Ö. Akkaya // In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant. – 2020. – V. 56. – P. 184–192.
132. Artificial associations between *Daucus* and nitrogen-fixing *Azotobacter* cells *in vitro* / S.S. Varga, P. Koranyi, E. Preininger, I. Gyurjan // Physiologia Plantarum. – 1994. – V. 90, N 4. – P. 786–790.
133. Assessing the efficacy of co-inoculation of wheat seedlings with the associative bacteria *Paenibacillus polymyxa* 1465 and *Azospirillum brasilense* Sp245 / I.V. Yegorenkova, K.V. Tregubova, G.L. Burygin, L.Y. Matora [et al.] // Can. J. Microbiol. – 2016. – V. 62. – P. 279–285.
134. Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and symbiotic acclimatization of the Mexican threatened orchid *Stanhopea tigrina* / L.J. Castillo-Pérez, D. Martínez-Soto, J. Fortanelli-Martínez [et al.] // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2021. – V. 146. – P. 249–257.

135. At Wuschel promotes formation of the embryogenic callus in *gossypium hirsutum* / W. Zheng, X. Zhang, Z. Yang, J. Wu [et al.] // PLoS. – 2014. – V. 9, N 1. – e87502.
136. Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins / W.M. Gray, S. Kepinski, D. Rouse [et al.] // Nature. – 2001. – V. 414. – P. 271–276.
137. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking / N. Geldner, J. Friml, Y.D. Stierhof [et al.] // Nature. – 2001. – V. 413. – P. 425–428.
138. Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis* / Y.H. Su, X.Y. Zhao, Y.B. Liu, C.L. Zhang [et al.] // Plant J. – 2009. – V. 59. – P. 448–460.
139. Aydin, M. Plant regeneration in wheat mature embryo culture / M. Aydin, M. Tosun, K. Haliloglu // African Journal of Biotechnology. – 2011. – V. 10, N 70. – P. 15749–15755.
140. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels / A.C. Cohen, R. Bottini, M. Pontin [et al.] // Physiol Plantarum. – 2015. – V. 153. – P. 79–90.
141. *Azospirillum brasilense* Sp7 produces an outer-membrane lectin that specifically binds to surface-exposed extracellular polysaccharide produced by the bacterium / P. Mora, F. Rosconi, L.F. Fraguas, S. Castro-Sowinski // Arch. Microbiol. – 2008. – V. 189. – P. 519–524.
142. *Azospirillum* sp. as a Challenge for Agriculture / A. Rodrigues, A. Bonifacio, F. Araujo, M.L. Junior [et al.] // Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem, Sustainable Development and Biodiversity / D.K. Maheshwari (ed.) – Switzerland: Springer International Publishing, 2015. – V. 12. – P. 29–51.
143. Azospirillum-plant interaction: from root colonization to plant growth promotion / F. Wisniewski-Dyé, B. Drogue, S. Borland, C. Prigent-Combaret // In: Beneficial plant-microbial interactions: ecology and applications / M.B. Rodelas González, J. González-López (eds). – London: CRC Press, 2013 – P. 13.

144. Babalola, O.O. The use of microbial inoculants in African agriculture: current practice and future prospects / O.O. Babalola, B.R. Glick J. // Food Agri Environ. – 2012. – V. 10, N 3–4. – P. 540–549.
145. Bacterial endophytes from rice cut grass (*Leersia oryzoides* L.) increase growth, promote root gravitropic response, stimulate root hair formation, and protect rice seedlings from disease / S.K. Verma, K. Kingsley, M. Bergen, C. English [et al.] // Plant Soil. – 2018. – V. 422. – P. 223–238.
146. Bacterial Extracellular Polysaccharides / K. Bazaka, R.J. Crawford, E.L. Nazarenko, E.P. Ivanova / In: Linke D., Goldman A. (eds) // Bacterial Adhesion. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer, Dordrecht, 2011. – V. 715. – P. 213–226.
147. Bajaj, Y.P.S. *In vitro* regeneration of diverse plants and the cryopreservation of germplasm in wheat (*Triticum aestivum* L.) / Y.P.S. Bajaj // Cereal Res. Commun. – 1986. – V. 14. – P. 305–311.
148. Balandreau, J. Microbiology of the association / J. Balandreau // Can. J. Microbiol. – 1983. – V. 29, N 8. – P. 851–859.
149. Balla, I. Acclimation results of micropropagated black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) improved by symbiotic micro-organisms / I. Balla, J. Vertesy, K. Koves-Pechy [et al.] // Plant cell, tissue and organ culture. – 1998. – V. 152, N 1–2. – P. 113–115.
150. Barro, F. Genomic influence on somatic embryogenesis in the Triticeae / F. Barro, A. Canalejo, A. Martin // Plant Cell. Rep. – 1999. – V. 18. – 769–772.
151. Bashan, Y. An improved selection technique and medium for the isolation and enumeration of *Azospirillum brasiliense* / Y. Bashan, H. Levanony // Can. J. Microbiol. – 1985. – V. 31. – P. 947–952.
152. Bashan, Y. Contribution of *Azospirillum brasiliense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation / Y. Bashan, M. Singh, H. Levanony // Can. J. Bot. – 1989. – V. 67, N 8. – P. 2429–2434.

153. Bashan, Y. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment / Y. Bashan, L.E. De-Bashan // *Adv. Agron.* – 2010. – V. 108. – P. 77–136.
154. Bashan, Y. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment / Y. Bashan, L.E. de-Bashan // *Adv. Agron.* – 2010. – V. 108. – P. 77–136.
155. Bashan, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture / Y. Bashan // *Biotechnol. Adv.* – 1998. – V. 16. – P. 729–770.
156. Bednarek, P.T. Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes / P.T. Bednarek, R. Orłowska // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* – 2020. – V. 140. – P. 245–257.
157. Behaviour of plant material issued from *in vitro* tuberization / J. Nowak, S. Bensalim, C.D. Smith [et al.] // *Potato Res.* – 1999. – V. 42. – P. 505–519.
158. Bennaceur, M. Callus formation and plant regeneration from young wheat spikes: Effect of genotypes / M. Bennaceur / In : C. Royo (ed.), M. Nachit (ed.), N. Di Fonzo (ed.), J.L. Araus (ed.). // *Durum wheat improvement in the Mediterranean region: New challenges*. In CIHEAM, 2000. – P.121–124.
159. Berg, R.H. The biology of *Azospirillum*-sugarcane association. 2. Ultrastructure / R.H. Berg, V. Vasil, I.K. Vasil // *Protoplasma*. – 1979. – V. 101. – P. 143–163.
160. Bhatia, S. Application of Plant Biotechnology / S. Bhatia // In: *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* / Editors S. Bhatia, K. Sharma, R. Dahiya, T. Bera – Academic Press, 2015. – P. 157–207.
161. Bilous, S. Formation of meristematic structure in callus of *Populus tremula* L. in indirect morphogenesis *in vitro* / S. Bilous, A. Likhanov, A. Klyvadenko // *Miskininkyste*. – 2014. – V. 1. – P. 61–66.
162. Biochemical changes by *Azospirillum brasiliense* enhance jojoba rooting under salt stress / A.J. Gonzalez, M.E. Yarte, B.E. Llorente [et al.] // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* – 2024. – V. 156. – P. 56.

163. Biohardening of micropropagated plants with PGPR and endophytic bacteria enhances the protein content / S. Panigrahi, K. Aruna Lakshmi, Y. Venkateshwarulu, N. Umesh // In: Biotechnology and bioforensics, forensic and medical bioinformatics. – Singapore: Springer, 2015. – P. 51–55.
164. Biological activity of extracellular polysaccharides in suspension culture cells of wheat / N.K. Bishimbayeva, A.K. Amirov, A.S. Murtazina [et al.] // Physiological, biochemical and genetic and breeding plant research in Kazakhstan / Collection of articles, 2010. – P. 103–111.
165. Biology of Azospirillum-sugarcane association: enhancement of nitrogenase activity / R.H. Berg, M.E. Tyler, N.J. Novick [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1980. – V. 39. – P. 642–649.
166. Biotization and *in vitro* plant cell cultures: plant endophyte strategy in response to heavy metals knowledge in assisted phytoremediation / M.R. Espinoza-Mellado, E.O. López-Villegas, M.F. López-Gómez [et al.] // In: Microbe Mediated Remediation of Environmental Contaminants. Chapter 3. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. – 2021. – P. 27–36.
167. Biotization of *in vitro* calli and embryogenic calli of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) with diazotrophic bacteria *Herbaspirillum seropedicae* (Z78) / S.-L. Lim, S. Subramaniam, I. Zamzuri, H.G. Amir // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2016. – V. 127, N 1. – P. 251–262.
168. Boller, T. Ethylene and the Regulation of Antifungal Hydrolases in Plants / T. Boller // OxfSurv. Plant Mol. Cell Biol. – 1988. – V.5. – P. 145–174.
169. Bottini, R. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase / R. Bottini, F. Cassan, P. Piccoli // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – V. 65. – P. 497–503.
170. Bradley, P.M. Co-culture of carrot cells and a green alga on medium deficient in nitrogen / P.M. Bradley // Z. Pflanzenphysiol. – 1980. – V. 100. – P. 65–67.
171. Brand, U. Meyerowitz E.M., Simon R. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loopregulated by CLV3 activity / U. Brand, J.C. Fletcher, M. Hobe // Science. – 2000. – V. 289, N 5479. – P. 617–619.

172. Braybrook, S.A. LECs go crazy in embryo development. / S.A. Braybrook, J.J. Harada // Trends Plant Sci. – 2008. – V. 13, N 12. – P. 624–630.
173. Bud endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures / A.M. Pirttilä, P. Joensuu, H. Pospiech, J. Jalonen [et al.] // Physiologia Plantarum. – 2004. – V. 121. – P. 305-312.
174. Bueter, C.L. Innate sensing of chitin and chitosan / C.L. Bueter, C.A. Specht, S.M. Levitz // PLoS Pathog. – 2013. – V. 9. – e1003080.
175. Bunn, E. Microbial contaminants in plant tissue culture propagation / E. Bunn, B. Tan // In: Microorganisms in plant conservation and biodiversity / K. Sivasithamparama, K.W. Dixon, R.L. Barrett (eds) – Dordrecht: Springer, 2002. – P. 307–335.
176. Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures / M.A.K. Jansen, H. Booij, J.H.N. Schel, S.C. de Vries // Plant Cell Rep. – 1990. – V. 9. – P. 221–223.
177. Callus cultures and plant regeneration from mature embryos in winter wheat / I. Racz, E. Raldi, D. Lalztity, B. Buzas [et al.] // Acta Agronomica Hungarica. – 1993. – V. 42. – P. 255–260.
178. Callus Induction, Proliferation, and Plantlets Regeneration of Two Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes under Saline and Heat Stress Conditions / L. Benderradjji, F. Brini, K. Kellou [et al.] // International Scholarly Research Notices. – 2012. – V. 367851. – 8.
179. Callus initiation and plant regeneration form Triticale embryos / G.C. Sharma, L.L. Bello, V.T. Sarpa, C.M. Peterson // Crop Sci. – 1981. – V. 21. – P. 113–118.
180. Calvo Velez, P. Agricultural uses of plant biostimulants / P. Calvo Velez, L. Nelson, J. Kloepper // Plant and Soil. – 2014. – V. 383.
181. Carbohydrate polymers exhibit great potential as effective elicitors in organic agriculture: a review / F. Zheng, L. Chen, P. Zhang, J. Zhou [et al.]// Carbohydr. Polym. – 2020. – V. 230. – 115637.

182. Carlson, P.S. Forced association between higher plant and bacterial cells *in vitro* / P.S. Carlson, R.S. Chaleff // Nature. – 1974. – V. 252. – P. 393–395.
183. Caroff, M. LPS structure, function, and heterogeneity / M. Caroff, A. Novikov // In: K. Williams (eds) / Endotoxin detection and control in pharma, limulus, and mammalian systems. – Springer. Cham., 2019. – P. 53–93.
184. Cassells, A.C. Contamination and its impact in tissue culture / A.C. Cassells // Acta Hort. – 2001. – V. 560. – P. 353–359.
185. Cassells, A.C. Detection and elimination of microbial endophytes and prevention of contamination in plant tissue culture / A.C. Cassells // In: Plant tissue culture, development, and biotechnology / R.N. Trigiano, D.J. Gray (eds) – Boca Raton: CRC Press, 2011. – P. 223–238.
186. Catalogue of gene symbols for wheat / R.A. McIntosh, Y. Yamazaki, J. Dubcovsky [et al.] // 12th International Wheat Genetics Symposium 8-13 September. – Yokohama. Japan, 2013.
187. cDNA sequence, genomic organization and differential expression of three *Arabidopsis* genes for germin/oxalate oxidase-like proteins / N. Membre, A. Berna, G. Neutelings, A. David [et al.] // Plant Mol. Biol. – 1997. – V. 35. – P. 459–469.
188. Cell Fate Switch during *In Vitro* Plant Organogenesis / X.Yu. Zhao, Y.H. Su, Z.J. Cheng, X.S. Zhang // Journal of Integrative Plant Biology. – 2008. – V. 50, N 7. – P. 816–824.
189. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene / P. Sterk, H. Booij, G.A. Schellekens, A. van Kammen [et al.] // Plant Cell. – 1991. – V. 3. – P. 907–921.
190. Cellular and Morpho-histological foundations of *in vitro* plant regeneration / D.I. Rocha, L.M. Vieira, A.D. Koehler [et al.] // Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology. – New York, NY: Humana Press, 2018. – V. 1815. – P. 47–68.
191. Chandra, S. Natural plant genetic engineer Agrobacterium rhizogenes: Role of T-DNA in plant secondary metabolism / S. Chandra // Biotechnology letters. – 2011. – V. 34. – P. 407–415.

192. Changes in the formation of an extracellular matrix surface network during early stages of indirect somatic embryogenesis in *Drosera spathulata* / A. Blehová, M. Bobák, J. Šamaj, E. Hlinková // Acta Botanica Hungarica. – 2010. – V. 52, N 1–2. – P. 23–33.
193. Chanway, C.P. Tissue culture bioassay for plant growth promoting rhizobacteria / C.P. Chanway, L.M. Nelson // Soil Biology and Biochemistry. – 1991. – V. 23, N 4. – P. 331–333.
194. Characterization and expression analysis of WOX2 homeodomain transcription factor in *Aegilops tauschii* / S. Zhao, Q.-T. Jiang, J. Ma [et al.]// Genet. Mol. Biol. – 2015. – V. 38. – P. 79–85.
195. Characterization and expression analysis of WOX5 genes from wheat and its relatives / S. Zhao, Q. Jiang, J. Ma [et al.] // Gene. – 2014. – V. 537. – P. 63–69.
196. Characterization of a germin-like protein gene expressed in somatic and zygotic embryos of pine (*Pinus caribaea* Morelet) / G. Neutelings, J.M. Domon, N. Membre [et al.] // Plant Mol. Biol. – 1998. – V. 38. – P. 1179–1190.
197. Characterization of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from andean soils of peru and their potential PGPR characteristics / P. Calvo, E. Ormeño-Orrillo, E. Martínez-Romero, D. Zúñiga // Brazilian Journal of Microbiology. – 2010. – V. 41. – P. 899–906.
198. Cheong, E.J. The effect of endophytic bacteria on *in vitro* shoot growth of *Prunus yedoensis* and its identification and elimination / E.J. Cheong, M. Na, U. Jeong // In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant. – 2019. – V. 56. – P. 200–206.
199. Child, J.J. Nitrogen fixation by *Rhizobium* sp. In association with non-leguminous plant cell cultures / J.J. Child // Nature. – 1975. – V. 253. – P. 350–351.
200. Chitosan and its oligosaccharides, a promising option for sustainable crop production – a review / K. Ahmed, M. Khan, H. Siddiqui, A. Jahan // Carbohydr Polym. – 2020. – V. 227. – 115331.
201. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture / K.L. Nge, N. Nwe, S. Chandrkrachang, W.F. Stevens // Plant Sci. – 2006. – V. 170. – P. 1185–1190.

202. Chitosan in plant protection / A. El Hadrami, L.R. Adam, I. El Hadrami, F. Daayf // Mar Drugs. – 2010. – V. 8. – P. 968–987.
203. Chitosan induces Ca^{2+} -mediated programmed cell death in soybean cells / A. Zuppini, B. Baldan, R. Millioni, F. Favaron [et al.]// New Phytol. – 2003. – V. 161. – P. 557–568.
204. Chou, J.C. The gene for indole-3-acetyl-L-aspartic acid hydrolase from *Enterobacter agglomerans*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* / J.C. Chou, W.W. Mulbry, J.D. Cohen // Molecular and General Genetics MGG. – 1998. – V. 259, N 2. – P. 172–178.
205. Chung, A. Gene Expression during Somatic Embryogenesis – Recent Advances / A. Chung, P. Khurana // Curr. Sci. – 2002. – V. 83. – P. 715–730.
206. Cloning and molecular characterization of a potato SERK gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis / S.K. Sharma, S. Millam, I. Hein, G.J. Bryan // Planta. – 2008. – V. 228. – P. 319–330.
207. CO₂ enrichment leads to altered cell wall composition in plants of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) / E. Louback, D.S. Batista, T.A.R. Pereira [et al.] // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2021. – V. 145. – P. 603–613.
208. Coelho, N. Impact of chitosan on plant tissue culture: recent applications / N. Coelho, A. Romano // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2022. – V. 148. – P. 1–13.
209. Comparative regeneration in six bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties from immature and mature scutella for developing efficient and genotype-independent protocol prerequisite for genetic improvement of wheat / H. Yadav, K. Malik, Sh. Kumar, P.K. Jaiwal // *In Vitro* Cellular & Developmental Biology. – Plant. – 2020. – V. 56. – P. 610–617.
210. Conservation *in vitro* of threatened plants—progress in the past decade / V. Sarasan, R. Cripps, M.M. Ramsay, C. Atherton [et al.] // *In Vitro* Cell Dev. Biol. – Plant. – 2006. – V. 42. – P. 206–214.
211. Controlling contamination during *in vitro* collection / V.C. Pence, J.A. Sandoval // In: *In vitro* collection techniques for germplasm conservation /V.C. Penke,

J.A. Sandoval, V.M. Villalobos, F. Engelmann (eds.), – Rome: IPGRI Technical Bulletin, 2002. – V. 7. – P. 30–40.

212. Creus, C.M. Water relations and yield in *Azospirillum* inoculated wheat exposed to drought in the field / C.M. Creus, R.J. Sueldo, C.A. Barassi // Can. J. Bot. – 2004. – V. 82. – P. 273–281.

213. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil / T.N. Arkhipova, E. Prinsen, S.U. Veselov [et al.] // Plant Soil. – 2007. – V. 292. – P. 305–315.

214. Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) – a medicinal plant / A.P. Sagare, Y.L. Lee, T.C. Lin, C.C. Chen [et al.] // Plant Sci. – 2000. – V. 160. – P. 139–147.

215. Dalton, S.J. A reformulation of Murashige and Skoog medium (WPBS medium) improves embryogenesis, morphogenesis and transformation efficiency in temperate and tropical grasses and cereals / S.J. Dalton // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2020. – V. 141. – P. 257–273.

216. Dargahlou, Sh.A. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of some Iranian wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes / Sh.A. Dargahlou, E.D. Uliae, A. Bandehagh // J. Bio. Env. Sci. – 2017. – V. 10, N 5. – P. 275–283.

217. De Freitas, J.R. A root tissue culture system to study winter wheat-rhizobacteria interactions / J.R. De Freitas, J.J. Germida // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1990. – V. 33. – 589–595.

218. De novo assembly and comparative analysis of the transcriptome of embryogenic callus formation in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / Z. Chu, J. Chen, J. Sun [et al.] // BMC Plant Biol. – 2017. – V. 17, N 1. – 244.

219. De Proft, M.P. Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of Magnolia cultured *in vitro* / M.P. De Proft, L.J. Maene, P.C. Debergh // Physiol. Plant. – 1985a. – V. 65. – P. 375–379.

220. De Proft, M.P. Implications of the container atmosphere during micropropagation of plants / M.P. De Proft, G. Van Den Broek, R. Van Dijck // Med. Fac. Landbouw. RUG. – 1985b. – V. 50. – P. 129–132.

221. De Riek, J. Carbon metabolism of micro propagated *Rosa multiflora* L. / J. De Riek, O. Van Cleemput, P.C. Debergh // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* – 1991. – V. 27. – P. 57–63.
222. Debergh, P.C. Micropropagation of woody species –state of the art on *in vitro* aspects / P.C. Debergh // *Acta Hortic.* – 1988. – V. 227. – P. 287–295.
223. Delporte, F. Plant regeneration through callus initiation from their mature embryo fragments of wheat / F. Delporte, O. Mostade, J.M. Jacquemin // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2001. – V. 67. – P. 73–80.
224. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by *in situ* hybridization / A.M. Pirttilä, H. Laukkanen, H. Pospiech, R. Myllylä [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 66, N 7. – P. 3073–3077.
225. Determination of the structure of the repeated unit of the *Azospirillum brasiliense* SR75 O-specific polysaccharide and homology of the lps loci in the plasmids of *Azospirillum brasiliense* strains SR75 and Sp245 / Y.P. Fedonenko, I.V. Borisov, O.N. Konnova [et al.] // *Microbiology*. – 2005. – V. 74. – P. 542–548.
226. Development and ecological test of the early maturing spring wheat forms, obtained by cell technology / K.K. Baymagambetova, N.K. Bishimbayeva, A.K. Amirova [et al.] // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2016. – V. 7, N 6. – P. 2999–3007.
227. Developmental and structural aspects of somatic embryos formed on medium containing 2,3,5-triiodobenzoic acid / Y.E. Choi, H.S. Kim, W.Y. Soh, D.C. Yang // *Plant Cell Rep.* – 1997. – V. 16. – P. 738–744.
228. Differential Response of Potato Toward Inoculation with Taxonomically Diverse Plant Growth Promoting Rhizobacteria / T. Naqqash, S. Hameed, A. Imran [et al.] // *Front. Plant Sci.* – 2016. – V. 7. – 144.
229. Dijak, M. Microtubule organization during early direct embryogenesis from mesophyll *Medicago sativa* L. / M. Dijak, D.H. Simmonds // *Plant Sci.* – 1988. – V. 58. – P. 183–191.

230. Dimkpa, C. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions / C. Dimkpa, T. Weinand, F. Asch // *Plant Cell Environ.* – 2009. – V. 32. – P. 1682–1694.
231. Diploidization in haploid tissue cultures of sorghum / L.A. Elkonin, T.N. Gudova, A.G. Ishin, V.S. Tyrnov // *Plant Breed.* – 1993. – V. 110. – P. 201–206.
232. Döbereiner, J. Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites / J. Döbereiner, Day J.M. // In: Newton W.E., Nyman C.J. (eds) *Proceedings of the - 1st International Symposium on Nitrogen Fixation.* – Washington State University Press, WA, 1976. – P. 518–538.
233. Dobereiner, J. Dinitrogen fixation in rhizosphere and phyllospere associations / J. Dobereiner // *Inorganic Plant Nutrition.* – Berlin etc.: Springer Verlag, 1983. – P. 330–350.
234. Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a transcriptomic view of hormone pathways / L. Vargas, A.B. Santa Brígida, J.P. Mota Filho, T.G. de Carvalho [et al.] // *PLoS.* – 2014. – V. 9, N 12. – e114744.
235. Dudits D. Induction of the embryogenic pathway in somatic plant cells / A. Feher, T. Pasternak, P. Miskolczi, F. Ayaydin // *Acta Hort.* – 2001. – V. 560. – P. 293–298.
236. Dudits, D. Molecular and Cellular Approaches to the Analysis of Plant Embryo Development from Somatic Cells *In Vitro* / D. Dudits, L. Bogre, J. Gyorgyev // *J. Cell Sci.* – 1991. – V. 99. – P. 475–484.
237. Dunwell, J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation / J.M. Dunwell // *Plant Biotechnol J.* – 2010 – V. 8, N 4. – P. 377–424.
238. Dzhos, L. Influence of genotype and spring wheat embryo culture conditions on the process of callus formation and morphogenesis / L. Dzhos, E.A. Kalashnikova // *Izvestiya Timiryazevskoi Sel'skhozyaistvennoi Akademii.* – 1998. – V. 3. – P. 94–99.
239. *E. coli* cultures expressing a synthetic sequence of PTZ gene (STZ) promoted *in vitro* direct organogenesis in *Nicotiana tabacum* L. / A. Camas-Reyes, R. La-

guna-Ramírez, A.E. Jofre-Garfias [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2019. – V. 137. – P. 87–100.

240. Eapen, S. Plant regeneration from callus cultures of Durum and Emmer Wheat / S. Eapen, P.S. Rao // Plant Cell Rep. – 1982. – V. 1. – P. 215–218.

241. Early Changes in Nutritional Conditions Affect Formation of Synthetic Mutualism Between Chlorella sorokiniana and the Bacterium *Azospirillum brasilense* / O.A. Palacios, B.R. Lopez, Y. Bashan, L.E. de -Bashan // Microbial Ecology. – 2018. – V. 77. – P. 980–992.

242. Early plant growth and biochemical responses induced by *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings are attenuated by procyanidin B2 / J. Vallejo-Ochoa, M. López-Marmolejo, A. Hernández-Esquivel, G.M. Mendez [et al.] // Protoplasma. – 2018. – V. 255. – P. 685–694.

243. Ectopic Expression of BABY BOOM Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth / K. Boutilier, R. Offringa, V.K. Sharma [et al.] // Plant Cell. – 2002. – V. 14. – P. 1737–1749.

244. Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharide on the functional activity of wheat root meristematic cells / N.V. Evseeva, L.Yu. Matora, G.L. Burygin [et al.] // Plant Soil. – 2011. – V. 346. – P. 181–188.

245. Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 Lipopolysaccharides on Wheat Plant Development / E. Chávez-Herrera, A.A. Hernández-Esquivel, E. Castro-Mercado, E. García-Pineda // Journal of Plant Growth Regulation. – 2018. – V. 37. – P. 859–866.

246. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*) / F.D. Andreote, U.N. da Rocha, W.L. Araujo [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. – 2010. – V. 97. – P. 389–399.

247. Effect of bacterial lipopolysaccharides on morphogenetic activity in wheat somatic calluses / N.V. Evseeva, O.V. Tkachenko, G.L. Burygin [et al.] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2018. – V. 34. – 3.

248. Effect of meta-topolin on micropropagation and adventitious shoot regeneration in *Prunus rootstocks* / A. Gentile, M.J. Gutierrez, J. Martinez [et al.] // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2014. – V. 118. – P. 373–381.
249. Effect of microbial-based inoculants on nutrient concentrations and early root morphology of corn (*Zea mays*) / P. Calvo, D.B. Watts, J.W. Kloepper, H.A. Torbert // J. Plant Nutr. Soil Sci. – 2017. – V. 180. – P. 56–70.
250. Effect of polyamines on somatic embryogenesis via mature embryo in wheat / M. Aydin, A.H. Pour, K. Haliloglu, M. Tosun // Turkish Journal of Biology. – 2016. – V. 40. – P. 1178–1184.
251. Effect of *Pseudomonas* and associative methylobacteria on growth and resistance of plants to pathogens and xenobiotics / N.S. Zaharchenko, S.V. Pigoleva, V.V. Kochetkov, M.A. Chepurnova [et al.] // Russ. J. Plant Physiol. – 2012. – V. 59. – P. 89–98.
252. Effect of Rhizobium–Azospirillum coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba / R. Remans, L. Ramaekers, S. Schelkens, G. Hernandez [et al.] // Plant Soil. – 2008. – V. 312, N 1–2. – P. 25–37.
253. Effect of synthetic auxin like growth regulators on callus regenerative ability of common wheat vc. Zymoyarka / I.R. Gorbatyuk, A.V. Bavol, A.V. Holubenko, B.V. Morgun // Biotechnologia Acta. –2015. – V. 8, N 1. – P. 56–62.
254. Effectiveness of *Azospirillum brasiliense* Sp245 on young plants of *Vitis vinifera* L. / S. Bartolini, G.P. Carrozza, G. Scalabrelli [et al.] // Open Life Sciences. – 2017. – V. 12, N 1. – P. 356–382.
255. Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. (wheat) under salinity / O. Lastochkina, L. Pusenkova, R. Yuldashev, M. Babaev [et al.] // Plant Physiology and Biochemistry. – 2017. – V. 121. – P. 80–88.
256. Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated

bacterial strains / N. Zhang, D. Wang, Y. Liu, S. Li [et al.] // Plant Soil. – 2014. – V. 374. – P. 689–700.

257. Effects of Growth Regulators on *in Vitro* Plant Regeneration in Durum Wheat / V.V. Satyavathi, P.P. Jauhar, E.M. Elias, B. Rao // Crop Science. – 2004. – V. 44. – P. 1839–1846.

258. Efficient callus induction and plantlets regeneration in bread wheat using immature and mature embryos / N. Hakam, S.M. Udupa, A. Rabha [et al.] // Int. J. Biotechnol. Res. – 2015. – V. 3. – P. 001–009.

259. Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment / M.E. Sharifi-Atpanahi, K. Belogradova, L. Hessamvaziri, E. Heberle-Bors [et al.] // Plant Cell Rep. – 2006. – V. 25. – P. 1294–1299.

260. Efficient Regeneration Potential is Closely Related to Auxin Exposure Time and Catalase Metabolism During the Somatic Embryogenesis of Immature Embryos in *Triticum aestivum* L / M. She, G. Yin, J. Li, X. Li [et al.] // Mol. Biotechnol. – 2013. – V. 54. – P. 451–460.

261. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis* / J. Friml, A. Vieten, M. Sauer [et al.] // Nature. – 2003. – V. 426. – P. 147–153.

262. Egertsdotter, U. Development of somatic embryos in Norway spruce / U. Egertsdotter, S. von Arnold // J. Exp. Bot. – 1998. – V. 49. – P. 155–162.

263. El Meskaoui, A. Plant Cell Tissue and Organ Culture Biotechnology and Its Application in Medicinal and Aromatic Plants / A. El Meskaoui // Med. Aromat. Plants. – 2013. – V. 2. – e147.

264. Elena, E.B. Effect of auxin levels on shoot formation with different embryo tissue from a cultivars and commercial hybrid wheat (*T. aestivum* L.). / E.B. Elena, H.D. Ginzo // J. Plant Physiol. – 1988. – V. 132. – P. 600–603.

265. Endogenous bacteria in tissue cultures of conifers - appearance and action / D. Ewald, I. Zaspel, G. Naujoks, U. Behrendt // Acta Hortic. – 2000. – V. 530. – P. 137–144.

266. Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago falcata* / A. Ivanova, M. Velcheva, P. Denchev [et al.] // Physiol. Plant. – 1994. – V. 92. – P. 85–89.
267. Endogenous Nod-factor-like signal molecules promote early somatic embryo development in Norway spruce / J.V. Dyachok, M. Wiweger, L. Kenne, A.S. Von // Plant Physiol. – 2002. – V. 128. – P. 523– 533.
268. Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.) / P. Ardanov, L. Ovcharenko, I. Zaets [et al.] // Biol Control. – 2011. – V. 56. – P. 43–49.
269. Endophytic bacteria in plant tissue culture: differences between easy- and difficult-to-propagate *Prunus avium* genotypes / M. Quambusch, A.M. Pirttilä, M.V. Tejesvi, T. Winkelmann [et al.] // Tree Physiol. – 2014. – V. 34. – P. 524–533.
270. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium / G. Forchetti, O. Masciarelli, S. Alemano [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V. 76, N 5. – P. 1145–1152.
271. Endophytic bacteria isolated from wild jojoba [*Simmondsia chinensis* L. (Schneider)] roots improve *in vitro* propagation / E. Perez-Rosales, L. Alcaraz, P. Esther, R. Vázquez-Juárez [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2018. – V. 135. – P. 515–522.
272. Endophytic bacteria: perspectives and applications in agricultural crop production / M. Senthilkumar, R. Anandham, M. Madhaiyan, V. Venkateshwarulu, T. Sa // In: Bacteria in agrobiology: crop ecosystems / D.K. Maheshwari (ed). – Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. – P. 61–96.
273. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inlorescence tissues / S. Compant, H. Kaplan, A. Sessitsch [et al.] // FEMS Microbiol Ecol. – 2008. – V. 63. – P. 84–93.
274. Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous BABYBOOM transcription factor / S.L. Florez, R.L. Erwin, S.N. Maximova [et al.] // BMC Plant Biology. –2015. – V. 15. –121.

275. Enhancement of Adventitious Shoot Regeneration in *Cucumis sativus* L. using AgNO₃ / A.K.M. Mohiuddin, Z.C. Abdullah, M.K.U. Chowdhury, S. Napis // Plant Tissue Cult. – 2005. – V. 15, N 1. – P. 15–23.

276. Enhancement of *in vitro* growth of *Swertia chirayita* Roxb. Ex Fleming co-cultured with plant growth promoting rhizobacteria / V. Sharma, B. Kamal, N. Srivastava, Y. Negi [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2015. – V. 121, N 1. – P. 215–225.

277. Enhancement of plant drought tolerance by microbes / Y.C. Kim, B.R. Glic, Y. Bashan, C.M. Ryu // in: Plant responses to drought stress / R. Aroca (ed.) – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012. – 15. – P. 383–413.

278. Erbs, G. The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity / G. Erbs, M. Newman // Molecular Plant Pathology. – 2012. – V. 13. – P. 95–104.

279. Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination / P. Misra, N. Gupta, D.D. Toppo [et al.] // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2010. – V. 100. – P. 189–197.

280. Establishment of symbiosis between Rhizobium and plant cells *in vitro* / R.D. Holsten, R.C. Burns, R.W. Hardy, R.R. Hebert // Nature. – 1971. – V. 232. – P. 173–176.

281. Evaluating soil rhizobacteria for their ability to enhance plant growth and tuber yield in potato / A. Oswald, P. Calvo Velez, D.Z. Davila, J.A. Pineda // Annals of Applied Biology. – 2010. – V. 157. – P. 259– 271.

282. Evaluation of carbon sources, gelling agents, growth hormones and additives for efficient callus induction and plant regeneration in Indian wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes using mature embryos / K. Malik, D. Birla, H. Yadav [et al.] // J. Crop. Sci. Biotechnol. – 2017. – V. 20. – P. 185–192.

283. Evidence that fresh weight measurement is imprecise for reporting the effect of plant growth-promoting (rhizo)bacteria on growth promotion of crop plants / P. Huang, L. de-Bashan, T. Crocker [et al.] // Biol. Fertil. Soils. – 2017. – V. 53. – P. 199–208.

284. Exogenous growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum / K. Rajasekaran, M.B. Hein, G.C. Davis, M.G. Carnes [et al.] // J. Plant Physiol. – 1987. – V. 130. – P. 13–25.
285. Extracellular Matrix in Early Stages of Direct Somatic Embryogenesis in Leaves of *Drosera spathulata* / M. Bobák, J. Šamaj, E. Hlinková [et al.] // Biologia Plantarum. – 2004. – V. 47, N 2. – P. 161–166.
286. Extracellular matrix surface network is associated with non-morphogenic calli of *Helianthus tuberosus* cv. Albik produced from various explants / M. Pilarska, M. Popielarska-Konieczna, H. Ślesak, M. Kozieradzka-Kiszko [et al.] // Acta Societatis Botanicorum Poloniae. – 2014. – V. 83, N 1. – P. 67–73.
287. Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4 / J. Šamaj, F. Baluška, M. Bobák [et al.] // Plant Cell Reports. – 1999. – V. 18. – P. 369–374.
288. Factors controlling the evolution of the gaseous atmosphere during *in vitro* culture / D.G. Mattbijs, B. Pascat, J. Demeester [et al.] // Proc. II Symp. Ecophysiology *in vitro*, Aix en Provence. – 1994. – P. 356–398.
289. Factors influencing successful Agrobacterium – mediated genetic transformation of wheat / H. Wu, C. Sparks, B. Amoah, H.D. Jones // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 21. – P. 659–668.
290. Farjaminezhad, R. Prediction of the effect of chitosan on cell suspension culture of *Azadirachta indica* by response surface methodology / R. Farjaminezhad, G. Garoosi // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2021. – V. 146. – P. 323–337.
291. Feher, A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? / A. Feher // Front. Plant Sci. – 2019. – V. 10. – 536.
292. Feher, A. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state / A. Feher, T.P. Pasternak, D. Dudits // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2003. – V. 74. – P. 201–228.

293. Fellman, C.D. Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation / C.D. Fellman, P.E. Read, M.A. Hosier // HortScience. – 1987. – V. 22. – P. 1197–1200.
294. Firn, R.D. Physiology, growth and development of plants and cells in culture—the way ahead / R.D. Firn, N. Sharma, J. Digby // In: P.J. Lumsden, J.R. Nicholas, W.J. Davies (eds) / Physiology, growth and development of plants in culture. – Springer, Dordrecht, 1994. – P. 409–421.
295. Fonnesbech, M. The influence of NAA, BA and temperature on shoot and root development from *Begonia cheimantha* petiole segments grown *in vitro* / M. Fonnesbech // Physiol. Plant. – 1974. – V. 32. – P. 49–54.
296. Functional genomics of microspore embryogenesis / J. Hosp, S.F. de Marascin, A. Touraev, K. Boutilier // Euphytica. – 2007. – V. 158, N 3. – P. 275–285.
297. Functional role of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* in enhancing growth and disease protection of invasive English ivy (*Hedera helix* L.) / M.A. Soares, H.-Y. Li, M. Bergen, J.M. da Silva, K.P. Kowalski [et al.] // Plant Soil. – 2016. – V. 405. – P. 107–123.
298. Gaillochet, C. The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity / C. Gaillochet, J.U. Lohmann // Development. – 2015. – V. 142. – P. 2237–2249.
299. Gelvin, S.B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool / S.B. Gelvin // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2003. – V. 67, N 1. – P. 16–37.
300. Gene Expressed Preferentially in the Globular Stage of Somatic Embryogenesis Encodes Elongation Factor 1a in Carrot / R. Kawahara, S. Sunabori, H. Fukuda, A.A. Komamine // Eur. J. Biochem. – 1992. – V. 209. – P. 157–162.
301. Gene expression programs during callus development in tissue culture of two Eucalyptus species / Y. Zhang, J. Li, C. Li, S. Chen [et al.] // BMC Plant Biology. – 2022. – V. 22. – 1.
302. Genetic and physiological characterization of three natural allelic variations affecting the organogenic capacity in tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) /

M.deS. Pinto, C.R. Abeyratne, V.A. Benedito, L.E.P. Peres // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2017. – V. 129, N 1. – P. 89–103.

303. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasiliense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. / N.D.S. Ferreira, F.H. Sant'Anna, V.M. Reis [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2020. – V. 70. – P. 6203–6212.

304. Genome-wide survey of Aux/IAA gene family members in potato (*Solanum tuberosum*): Identification, expression analysis, and evaluation of their roles in tuber development / J. Gao, X. Cao, S. Shi [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2016. – V. 471. – P. 320–327.

305. George, E.F. Plant Propagation by Tissue Culture / E.F. George // 3rd Edition. – Springer, 2008. – P. 1–28.

306. Glick, B.R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world / B.R. Glick // Microbiol. Res. – 2014. – V. 169, N 1. – P. 30–39.

307. Global and cytokininrelated gene expression changes during shoot development in Arabidopsis / P. Che, D.J. Gingerich, S. Lall, S.H. Howell // Plant Cell. – 2002. – V. 14. – P. 2771–2785.

308. Goldberg, R.B. Plant Embryogenesis: From Zygote to Seeds / R.B. Goldberg, G. de Paiva, R. Yadegari // Science. – 1994. – V. 266. – P. 605–614.

309. González, A.J. *Azospirillum brasiliense* increased salt tolerance of jojoba during *in vitro* rooting / A.J. González, E.E. Larraburu, B. Llorente // Industrial Crops and Products. – 2015. – V. 76. – P. 41–48.

310. Graebe, J.E. Gibberellin biosynthesis and control / J.E. Graebe // Ann. Rev. Plant Physiol. – 1987. – V. 38. – P. 197–201.

311. Gray, W.M. Function of the ubiquitin–proteasome pathway in auxin response / W.M. Gray, M. Estelle // Trends Biochem. Sci. – 2000. – V. 25. – P. 133–138.

312. Groppa, M.D. Root hydraulic conductance, aquaporins and plant growth promoting microorganisms: a revision / M.D. Groppa, M.P. Benavides, M.S. Zawoznik // Appl. Soil. Ecol. – 2012. – V. 61. – P. 247–254.

313. Grossmann, K. Mode of action of auxinic herbicides: a new ending to a long, drawn out story / K. Grossmann // Trends Plant Sci. – 2000. – V. 5. – P. 506–508.

314. Gupta, S.D. Plant Tissue Culture Engineering / S.D. Gupta, Y. Ibaraki. – Netherlands: Springer, – 2008. – 480 p.
315. Hardoim, P.R. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth / P.R. Hardoim, L.S. van Overbeek, J.D. van Elsas // Trends Microbiol. – 2008. – V. 16. – P. 463–471.
316. Hau, B.K. Effect of low temperature treatment on differentiation of long term culture calluses of wheat / B.K. Hau, S.K. Teng // Plant Physiol. Communications. – 1994. – V. 30. – P. 108–110.
317. He, D.G. Somatic embryogenesis and morphogenesis in callus derived from the epiblast of immature embryos of wheat (*Triticum aestivum*) / D.G. He, G. Tanner, K.J. Scott // Plant Sci. – 1986. – V. 45. – P. 119–124.
318. He, G.Y. Improvement of somatic embryogenesis and plant regeneration from durumwheat (*Triticum turgidum* var. durum Desf.) scutellumand inflorescence cultures / G.Y. He, P.A. Lazzeri // Euphytica. – 2001. – V. 119. – P. 369–376.
319. Heide, O.M. Interaction of temperature, auxins and kinins in the regeneration ability of Begonia leaf cuttings / O.M. Heide // Physiol. Plant. – 1965. – V. 18. – P. 891–920.
320. Heinz, D.J. Sugarcane improvement through induced mutations using vegetative propagules and cell culture techniques / D.J. Heinz. – Vienna: International Atomic Energy Agency (IAEA), 1973. – 653 p.
321. Henry, Y. Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities / Y. Henry, P. Vain, J. de Buyser // Euphytica. – 1994. – V. 79, N 1–2. – P. 45–58.
322. Heritable epigenomic changes to the maize methylome resulting from tissue culture / Z. Han, P.A. Crisp, S. Stelpflug, [et al.] // Genetics. – 2018. – V. 209. – P. 983–995.
323. Herman, E. Non-axenic plant tissue culture: possibilities and opportunities / E. Herman // Acta Hortic. – 1990. – V. 280. – P. 233–238.
324. Herman, E. Toward control of micropropagation contamination / E. Herman // Agricell. Rep. – 1987. – V. 9. – P. 33–35.

325. High frequency plant regeneration from immature embryos of an elite barley cultivar (*Hordeum vulgare* L cv. Morex) / Y. Chang, J.V. Zitzewitz, P.M. Hayes, T.H.H. Chen // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 26. – P. 244–249.
326. High frequency wheat regeneration from leaf tissue explants of regenerated plantlets / H. Yu, W. Wang, Y. Wang, B. Hou // Adv. Biosci. Biotechnol. – 2012. – V. 3. – P. 46–50.
327. Histological analysis and transcription profiles on somatic embryogenesis in interspecific hybrids of *Elaeis guineensis* × *E. oleifera* / P.C.S. Angelo, D.A. Steinmacher R. Lopes, [et al.] // Agricultural Sciences. – 2013. – V. 4, N 11A. – P. 1–11.
328. Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) / E.U. Kurczynska, M.D. Gaj, A. Ujczak, E. Mazur // Heynh. Planta. – 2007. – V. 226. – P. 619–628.
329. Histone methylation controls telomerase-independent telomere lengthening in cells undergoing dedifferentiation / G. Grafi, H. Ben-Meir, Y. Avivi [et al.] // Dev. Biol. – 2007. – V. 306. – P. 838–846.
330. Hong, C.E. Endophytic bacteria as biocontrol agents against plant pathogens: current state-of-the-art / C.E. Hong, J.M. Park // Plant Biotechnol. Rep. – 2016. – V. 10, N 6. – P. 353–357.
331. Huetteman, C.A. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture / C.A. Huetteman, J.E. Preece // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1993. – V. 33. – P. 105–119.
332. Hussey, G. Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) / G. Hussey, N.J. Stacey // Ann. Bot. – 1984. – V. 53. – P. 565–578.
333. HvPG1 and ECA1: two genes activated transcriptionally in the transition of barley microspores from the gametophytic to the embryogenic pathway / A. Pulido, F. Bakos, M. Devie, B. Barnabas [et al.] // Plant Cell Rep. – 2009. – V. 28. – P. 551–559.
334. Identification of an O-linked repetitive glycan chain of the polar flagellum flagellin of *Azospirillum brasiliense* Sp7 / A.Y. Belyakov, G.L. Burygin, N.P. Arbatsky [et al.] // Carbohydr. Res. – 2012. – V. 361. – P. 127–132.

335. Identification of an SCF ubiquitin–ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana* / W.M. Gray, J.C. del Pozo, L. Walker [et al.] // Genes Dev. – 1999. – V. 13. – P. 1678–1691.
336. Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine / P. Thomas, G.K. Swarna, P.K. Roy, P. Prakash // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2008. – V. 93. – P. 55–63.
337. Ikeuchi, M. Plant callus: mechanisms of induction and repression / M. Ikeuchi, K. Sugimoto, A. Iwase // Plant Cell. – 2013. – V. 25. – P. 3159–3173.
338. Imamura, J. Stimulation oftobacco pollen embryogenesis by anaerobic treatments / J. Imamura, H. Harada // Z. Pflanzenphysiol. – 1981. – V. 103. – P. 259–263.
339. Immunochemical characterization of the capsular polysaccharide of *Azospirillum irakense* KBC1 / Y.P. Fedonenko, G.L. Burygin, I.A. Popova [et al.] // Curr. Microbiol. – 2013. – V. 67, N 2. – P. 234–239.
340. Immunological properties of Azospirillum cell surface: the structure of carbohydrate antigens and evaluation of their involvement in bacteria-plant contact interaction / L.Yu. Matora, G. Solovova, O. Serebrennikova [et al.] // In: Azospirillum VI and related microorganisms: genetics, physiology, ecology / I. Fendrik, M. del Gallo, M. De Zamaroczy, J. Vanderleyden (eds) – Berlin: Springer, 1995. – P. 377–382.
341. Improved potato microclonal reproduction with the plant-growth promoting rhizobacteria Azospirillum / O.V. Tkachenko, N.V. Evseeva, N.V. Boikova, L.Yu. Matora [et al.] // Agron. Sustain. Dev. – 2015. – V. 35. – P. 1167–1174.
342. Improved walnut mass micropropagation through the combineduse of phloroglucinol and FeEDDHA / R.J. Licea-Moreno, A. Contreras, A.V. Morales [et al.] // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2015. – V. 123, N 1. – P. 143–154.
343. Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase / N. Babu, S. Jogaiah, S. Ito, K. Nagaraj [et al.] // Plant Sci. – 2015. – V. 231. – P. 62–73.

344. Improving micropropagation: effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on acclimatization of rootstocks of fruit tree / L. Vettori, A. Russo, C. Felici, S. Morini [et al.] // J. Plant Interact. – 2010. – V. 5. – P. 249–259.
345. *In vitro* establishment of nitrogen-fixing strawberry (*Fragaria × ananassa*) via artificial symbiosis with *Azomonas insignis* / É. Preininger, J. Zatykó, P. Szücs, P. Korányi [et al.] // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. – 1997. – V. 33, N 3. – P. 190–194.
346. *In Vitro* Formation of Nodular Calli in Soybean (*Glycine max* L.) Induced by Cocultivated *Pseudomonas maltophilia* / Y.-S. Yang, K. Wada, M. Goto, Y. Futsuhara // Japanese Journal of Breeding. – 1991. – V. 41, N 4. – P. 595–604.
347. *In vitro* gene regulatory networks predict *in vivo* function of liver / Y. Deng, D.R. Johnson, X. Guan [et al.] // BMC Syst Biol. – 2010. – V. 4. – 153.
348. *In vitro* plant regeneration from mature embryos of amphidiploid spelt *Triticum spelta* L. / A.V. Kyriienko, N.L. Shcherbak, M.V. Kuchuk [et al.] // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. – 2021. – V. 57. – P. 856–863.
349. *In vitro* response and somaclonal variation in bread wheat / R. Tuberosa, E. Deambrogio, C. Lucciiese, S. Ravaglia [et al.] // Bull. Soc. Bot. Fr. Actual. Bot. – 1990. – V. 137, N 3–4. – P. 148.
350. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions / D. Duca, J. Lorv, C.L. Patten [et al.] // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2014. – V. 106. – P. 85–125.
351. Induction of adventitious or somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: Variation of endogenous hormone levels / F. Charriére, B. Sotta, E'. Miginiac, G. Hahne // Plant Physiol. Biochem. – 1999. – V. 37. – P. 751–757.
352. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review / A. Feher, T. Pasternak, K. Ötvös [et al.] // Biologia. – 2002. – V. 57. – P. 5–12.
353. Induction of endophytic colonization in rice (*Oryza sativa* L.) tissue culture plants by *Azorhizobium caulinodans* / M. Senthilkumar, M. Madhaiyan, S.P. Sundaram, H. Sangeetha [et al.] // Biotechnol. Lett. – 2008. – V. 30. – P. 1477–1487.

354. Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions / T. Ki-yosue, K. Takano, H. Kamada, H. Harada // Can. J. Bot. – 1990. – V. 68. – 2301.
355. Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress / H. Kamada, K. Ishikawa, H. Saga, H. Harada // Plant Tiss. Cult. Lett. – 1993. – V. 10. – P. 38–44.
356. Induction of Zygotic Polyembryos in Wheat: Influence of Auxin Polar Transport / C. Fischer, V. Speth, S. Fleig-Eberenz, G. Neuhaus // The plant cell. – 1997. – V. 9, N 10. – P. 1767–1780.
357. Influence of beneficial microorganisms during in vivo acclimatization of *in vitro*-derived tea (*Camellia sinensis*) plants / J. Thomas, D. Ajay, R.R. Kumar, A.K.A. Mandal // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2010. – V. 101. – P. 365–370.
358. Influence of exogenous phytohormones on the functional activity of apical meristematic cells in wheat seedlings / N.V. Evseeva, O.V. Tkachenko, Yu.V. Lobachev, S.Yu. Shchyogolev // Annual Wheat Newsletter. – 2011. – V. 57. – P. 265.
359. Influence of Phytohormones on Monosaccharide Composition of Polysaccharides from Wheat Suspension Culture / N. Bishimbayeva, A. Murtazina, G. McDougall // Eurasian Chem.-Technol. J. – 2017. – V. 19, N 3. – P. 231–237.
360. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules / K.L. Rock, C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark [et al.] // Cell. – 1994. – V. 78. – P. 761–771.
361. Influence of the biocides PPMtm and Vitrofural on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media / T. Orlikowska, M. Zawadzka, E. Zenkteler, P. Sobczewski // J. Hortic Sci. Biotechnol. – 2012. – V. 87. – P. 223–230.
362. Innate Immune Responses Activated in *Arabidopsis* Roots by Microbe-Associated Molecular Patterns / Y.A. Millet, C.H. Danna, N.K. Clay [et al.] // The Plant Cell. – 2010. – V. 22. – P. 973–990.
363. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound / D. Raafat, K. von Bergen, A. Haas, H.G. Sahl // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – V. 74. – P. 3764–3773.

364. Interaction of rhizobacterial strains for growth improvement of *Crocus sativus* L. under tissue culture conditions / J.A. Paray, A.N. Kamili, Z.A. Reshi, R.A. Qadri [et al.] // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2015. – V. 121. – P. 325–334.
365. Interest of bacterized synthetic substrates MILCAP® for *in vitro* culture / B. Digat, P. Brochard, V. Hermelin, M. Tozet // Acta Hortic. – 1987. – V. 212. – P. 375–378.
366. Interpretation of light quality measurements and plant response in spectral filter research / N.C. Rajapakse, R.K. Pollock, M.J. McMahon, J.W. Kelly [et al.] // HortScience. – 1992. – V. 27. – P. 1208–1211.
367. Introduction of a nitrogen-fixing cyanobacterium into tobacco shoot regenerates / M.V. Gusev, T.G. Korzhenevskaya, L.V. Pyvovarova [et al.] // Planta. – 1986. – V. 167. – P. 1–8.
368. Involvement of Phytohormones in the Development of Interaction between Wheat Seedlings and Endophytic *Bacillus subtilis* Strain 11BM // A.A. Egorshina, R.M. Khairullin, A.R. Sakhabutdinova, M.A. Luk'yantsev // Russ. J. Plant Physiol. – 2012. – V. 59, N 1. – P. 134–140.
369. Involvement of the lipopolysaccharides of Azospirilla in the interaction with wheat seedling roots / Yu.P. Fedonenko, I.V. Egorenkova, S.A. Konnova, V.V. Ignatov // Microbiology. – 2001. – V. 70. – P. 329–334.
370. Iriti, M. Chitosan as a MAMP, searching for a PRR / M. Iriti, F. Faoro // Plant Signal Behav. – 2009. – V. 4. – P. 66–68.
371. Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*) / H. Bertrand, R. Nalin, R. Bally, J.-C. Cleyet-Marel // Biol. Fertil. Soils. – 2001. – V. 33. – P. 152–156.
372. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion / A.C.F. Dias, F.E.C. Costa, F.D. Andreote [et al.] // World J Microbiol Biotechnol. – 2009. – V. 25. – P. 189–195.
373. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion / A.C.F. Dias, F.E.C. Costa, F.D. Andreote [et al.] // World J Microbiol Biotechnol. – 2009. – V. 25. – P. 189–195.

374. Isolation of novel leaf-inhabiting endophytic bacteria in *Arabidopsis thaliana* and their antagonistic effects on phytopathogens / C.E. Hong, S.H. Jo, J.Y. Moon [et al.] // Plant Biotechnol. Rep. – 2015. – V. 9. – P. 451–458.
375. Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D / E. Kitamiya, S. Suzuki, T. Sano, T. Nagata // Plant Cell Rep. – 2000. – V. 19. – P. 551–557.
376. Jurgens, G. Apical–basal pattern formation in *Arabidopsis* embryogenesis / G. Jurgens // EMBO J. – 2001. – V. 20. – P. 3609–3616.
377. Kabita, K.C. Analysis of capsaicinoid biosynthesis pathway genes expression in callus cultures of *Capsicum chinense* Jacq. cv. ‘Umorok’ / K.C. Kabita, S.K. Sharma, K. Sanatombi // Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2019. – V. 137. – P. 565–573.
378. Kaeppeler, S.M. Molecular basis of heritable tissue culture – induced variation in plants / S.M. Kaeppeler, R.L. Phillips, P. Olhoft // In: Somaclonal variation and induced mutation in crop improvement / S.M. Jain, D.S. Brar, B.S. Ahloowalia (eds). – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. – P. 465–484.
379. Kaleikan, E.K. Control of tissue culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.) / E.K. Kaleikan, R.J. Sears, B.S. Gill // Theor. Appl. Genet. – 1989a. – V. 78, N 6. – P. 625–632.
380. Kaleikan, E.K. Monosomic analysis of tissue culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.) / E.K. Kaleikan, R.J. Sears, B.S. Gill // Theor. Appl. Genet. – 1989. – V. 78, N 6. – P. 625–632.
381. Karami, O. Molecular aspects of somatic to Embryogenic transition in plants / O. Karami, B. Aghavaisi, A. Mahmoudi Pour // J. Chem. Biol. – 2009. – V. 2. – P. 177–190.
382. Karimi, N. Endophytic Azospirillum for enhancement of growth and yield of wheat / N. Karimi, M.J. Zarea, S. Mehnaz // Environmental Sustainability. – 2018. – V. 1. – P. 149–158.
383. Kauss, H. Callose synthesis / H. Kauss // Membranes: Specialized Functions in Plants. – Guildford: Bios Sci. Publ., 1996. – P. 77–92.

384. Kavas, M. Factors affecting plant regeneration from immature inflorescence of two winter wheat cultivars / M. Kavas, H.A. Öktem, M. Yücel // Biol. Plant. – 2008. – V. 52. – P. 621–626.
385. Khan, M.A. Early generation *in vitro* assay to identify potato populations and clones tolerant to heat / M.A. Khan, S. Munive, M. Bonierbale, // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2015. – V. 121. – P. 45–52.
386. Kim, Y.W. Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration of Japanese larch (*Larix leptolepis*) / Y.W. Kim, H.K. Moon // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2007. – V. 88. – P. 241–245.
387. Kintzios, S.E. Effect of genotype and different growth regulator treatments on callus induction, proliferation and plant regeneration from mature wheat embryos / S.E. Kintzios, M. Triantafylou, J. Drossopoulos // Cereal Res. Commun. – 1996. – V. 24. – P. 147–153.
388. Kiselev, K.V. PgWUS expression during somatic embryo development in a *Panax ginseng* 2c3 cell culture expressing the rolC oncogene / K.V. Kiselev, A.V. Turlenko, Y.N. Zhuravlev // Plant Growth Regul. – 2009. – V. 59. – P. 237–243.
389. Kisiel, A. *Medicago truncatula* Gaertn. as a model for understanding the mechanism of growth promotion by bacteria from rhizosphere and nodules of alfalfa / A. Kisiel, E. Kepczynska // Planta. – 2016. – V. 243. – P. 1169–1189.
390. Klopper, J.W. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity / J.W. Klopper, R. Lifshitz, R.M. Zablotowicz // Trends Biotechnol. – 1989. – V. 7, N 2. – P. 39–43.
391. Kozai, T. Micropropagation under photo autotrophic conditions / T. Kozai // In: Micropropagation: Technology and Application / P.C. Debergh, R.H. Zimmerman (eds.) – Kluwer: Dordrecht, 1991. – P. 447–470.
392. Krasavina, M.S. Effect of salicylic acid on solute transport in plants / M.S. Krasavina // Salicylic Acid: A Plant Hormone. – Springer-Verlag, 2007. – P. 25–68.
393. Kreuger, M. Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. / M. Kreuger, G.J. van Holst // Planta. – 1993. – V. 189. – P. 243–248.

394. Kruglova, N.N. Callusogenesis as an *in vitro* morphogenesiss pathway in cereals / N.N. Kruglova, G.E. Titova, O.A. Seldimirova // Russ. J. Dev. Biol. – 2018. – V. 49. – P. 245–259.
395. Kumar, N. *In vitro* plant propagation: a review / N. Kumar, M.P. Redd // J. For. Sci. – 2011. – V. 27. – P. 61–72.
396. *Lactobacillus plantarum*; a deleterious contaminant of plant tissue cultures / C. Leifert, W.M. Waites, H. Camotta, J.R. Nicholas // Journal of Applied Bacteriology. – 1989. – V. 67, N 4. – P. 363–370.
397. Lareen, A. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes / A. Lareen, F. Burton, P. Schafer // Plant Molecular Biology. – 2016. – V. 90. – P. 575–597.
398. Larkin, P.J. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement / P.J. Larkin, W.R. Scowcroft // Theor. Appl. Genet. – 1981. – V. 60. – P. 197–214.
399. Larraburu, E.E. Anatomical changes induced by *Azospirillum brasilense* in *in vitro* rooting of pink lapacho / E.E. Larraburu, B.E. Llorente // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2015. – V. 122. – P. 175–184.
400. Larraburu, E.E. *Azospirillum brasilense* improves *in vitro* and *ex vitro* rooting-acclimatization of jojoba / E.E. Larraburu, A.C. Bususcovich, B. Llorente // Scientia Horticulturae. – 2016. – V. 209. – P. 139–147.
401. Lazar, M.D. Genetic and environmental effects on the growth and differentiation of wheat somatic cell cultures / M.D. Lazar, G.B. Collins, W.E. Vian // Herd. – 1983. – V. 74, N 5. – P. 353–357.
402. LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) promotes embryogenic induction in somatic tissues of Arabidopsis, via YUCCAmiated auxin biosynthesis / B. Wojcikowska, K. Jaskoła, P. Gasiorek, M. Meus [et al.] // Planta. – 2013. – V. 238. – P. 425–440.
403. LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development / S.L. Stone, L.W. Kwong, K.M. Yee, J. Pelletier, [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – V. 98. – P. 11806–11811.

404. Lee, Sh.T. Cytokinin, auxin, and abscisic acid affects sucrose metabolism conduce to de novo shoot organogenesis in rice (*Oryza sativa* L.) callus / Sh.T. Lee, W.L. Huang // Lee and Huang Botanical Studies. – 2013. – V. 54. – 5.
405. Leifert, C. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance / C. Leifert, S. Woodward // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 1998. – V. 52. – P. 85–88.
406. Leive, L. Physical, chemical and immunological properties of lipopolysaccharides released from *Escherichia coli* by ethylenediaminetetraacetate / L. Leive, V.K. Shovlin, S.E. Mergenhagen // J Biol. Chem. – 1968. – V. 243. – P. 6384–6391.
407. Leon, J.L.D. Potential practical applications of *in vitro* culture of mature wheat embryos / J.L.D. Leon, M.C. Garibaldi, J.L.D. De-Leon // Cereal Res. Commun. – 1995. – V. 23. – P. 19–25.
408. Letouze, R. Maintien de la dominance apicale apres decapitation d'une bouture de saule (*Salix babylonica*) en culture *in vitro* fufluence de la lwniere bleue-violette / R. Letouze // C. R. Acad. Sci. Paris. – 1970. – V. 271. – P. 2309–2312.
409. Leyser, O. Auxin signalling: the beginning, the middle and the end / O. Leyser // Curr. Opin. Plant Biol. – 2001. – V. 4. – P. 382–386.
410. Li, G. Plant chromatin: development and gene control / G. Li, T.C. Hall, R. Holmes-Davis // BioEssays. – 2002. – V. 24. – P. 234–243.
411. Lichtenthaler, H.K. The stress concept in plants: an introduction / H.K. Lichtenthaler // Ann. NY Acad. Sci. – 1998. – V. 851. – P. 187–198.
412. Light energy management in micropropagated plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition / P.L. Sáez, L.A. Bravo, M.I. Latsague, M.J. Toneatti [et al.] // Plant Science. – 2013. – V. 201–202. – P. 12–24.
413. Light quality in plant tissue culture: does it matter? / D.S. Batista, S.H.S. Felipe, T.D. Silva [et al.] // In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant. – 2018. – V. 54, N 3. – P. 195–215.
414. Linsmaier, E. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture / E. Linsmaier, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1965. – V. 18. – P. 100–127.

415. Lipopolysaccharide O-antigen molecular and supramolecular modifications of plant root microbiota are pivotal for host recognition. / A. Vanacore, G. Vitiello, A. Wanke, D. Cavasso, L.A. Clifton [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 2021. – V. 277. – 118839.
416. Livak, K.J. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // Methods. – 2001. – V. 25. – P. 402–408.
417. Ljung, K. Auxin metabolism and homeostasis during plant development / K. Ljung // Development. – 2013. – V. 140. – P. 943–950.
418. Loyola-Vargas, V.M. An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives / V.M. Loyola-Vargas, N. Ochoa-Alejo // In: Plant cell culture protocols / V.M. Loyola-Vargas, Ochoa- N. Alejo (eds). – New York: Springer, NY, 2018. – P. 3–13.
419. Mackinnon, C. Somatic embryogenesis from mature wheat embryos / C. Mackinnon, M.W. Nabors // Proc. 3rd Int. symp. Plant cult. and tissue cult. «Tissue cult. forest and agric.». – Knoxville, 1985. – P. 334.
420. Mahdavi-Darvari, F. Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis / F. Mahdavi-Darvari, N.M. Noor, I. Ismanizan // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2014. – V. 120, N 2. – P. 407–422.
421. Maintenance of callus-associated endophyte balance to mitigate oxidative browning in plant tissue culture practices / Y.T. Wang, C.X. Chen, P. Zhou [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2024. – V. 157. – 41.
422. Malerba, M. Recent applications of chitin- and chitosan-based polymers in plants / M. Malerba, R. Cerana // Polymers. – 2019. – V. 11. – 839.
423. Management of microbial contaminants in the *In Vitro* Gene Bank: a case study of taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] / V. Srivastava, D.K. Nerwal, A. Kandan, J. Akhtar [et al.] // *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2021. – V. 57. – P. 152–163.
424. Marks, T.R. Physiological variability arising from *in vitro* culture is induced by shoot selection and manipulation strategies / T.R. Marks, P.E. Myers // J. Hortic. Sci. – 1994. – v. 69. – P. 1–9.

425. Marrs, K.A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants / K.A. Marrs // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1996. – V. 47. – P. 127–158.
426. Mathias, R.J. Factors affecting the establishment of callus cultures in wheat / R.J. Mathias // Biotechnology in agriculture and forestry. – 1990. – V. 13. – P. 24–45.
427. Mathias, R.J. Factors affecting the establishment of callus cultures in wheat / R.J. Mathias // Biotechnology in agriculture and forestry. – 1990. – V. 13. – P. 24–45.
428. Mathias, R.J. *In vitro* expression of genes affecting whole plant phenotype – the effect of Rht/Gai alleles on the callus culture response of wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell) / R.J. Mathias, E. Atkinson // Theor. Appl. Genet. – 1988. – V. 75. – P. 474–479.
429. Matora, L.Yu. Immunochemical analysis of O-specific polysaccharides from the soil nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasiliense* / L.Yu. Matora, B.I. Shvartsburd, S.Yu. Shchegolev // Microbiology (Moscow). – 1998. – V. 67. – P. 677–681.
430. Meldau, D.G. A native plant growth promoting bacterium, *Bacillus sp.* B55, rescues growth performance of an ethylene-insensitive plant genotype in nature / D.G. Meldau, H.H. Long, I.T. Baldwin // Front. Plant Sci. – 2012. – V. 3. – 112.
431. Mele, E. Effect of ethylene on carnation explants grown in sealed vessels / E. Mele, J. Messeguer, P. Camprubi // Proc. 5th Congo Plant Tissue & Cell Culture // Jpn. Assoc. Plant Tissue Cult. – 1982. – P. 69–70.
432. Metabolic changes and improved growth in micropropagated red raspberry “Indian summer” are tied to improved mineral nutrition / S. Poorthong, J. Morré, C.S. Maier [et al.] // *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2017. – V. 53. – P. 579–590.
433. Metakovskiy, E.V. Problems of interpreting results obtained in studies of somaclonal variation in gliadin proteins in wheat / E.V. Metakovskiy, A.Y. Novoselskaya, A.A. Sozinov // Theor. Appl. Genet. – 1987. – V. 73. – P. 764–766.
434. Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? / S.P.O. Werbrouck, M. Strnad, H. Van Onckelen, P.C. Debergh // Physiol. Plant. – 1996. – V. 98. – P. 291–297.

435. Methylobacterium sp. resides in unculturable state in potato tissues *in vitro* and becomes culturable after induction by *Pseudomonas luorescens* IMGB163 / O. Podolich, V. Laschevskyy, L. Ovcharenko, N. Kozyrovska [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2009. – V. 106. – P. 728–737.
436. Michalczuk, L. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis / L. Michalczuk, T.J. Cooke, J.D. Cohen // Phytochemistry. – 1992. – V. 31. – P. 1097–1103.
437. Michalczuk, L. Indole-3-acetic acid metabolism in hormone-autotrophic, embryogenic callus of Inmil (R) cherry rootstock (*Prunus incisa serrula* ‘GM 9’) and in hormone-dependent, non-embryogenic calli of *Prunus incisa serrula* and *Prunus domestica* / L. Michalczuk, P. Druart // Physiol. Plant. – 1999. – V. 107. – P. 426–432.
438. Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry / M. Vestberg, S. Kukkonen, K. Saari, P. Parikka, [et al.] // Applied Soil Ecology. – 2004. – V. 27. – P. 243–258.
439. Microbially mediated plant functional traits / M.L. Friesen, S.S. Porter, S.C. Stark [et al.] // Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. – 2011. – V. 42. – P. 23–46.
440. Microbiotic biodiversity and their functionality in roots and rhizosphere of potato plants / P. Calvo, C. Martinez, M. Rico [et al.] // 15th International Society for Tropical Root Crops (ISTRC), – 2009. – P. 110–116.
441. MicroRNAs regulate the timing of embryo maturation in *Arabidopsis* / M.R. Willmann, A.J. Mehalick, R.L. Packer [et al.] // Plant Physiol. – 2011. – V. 155. – P. 1871–1884.
442. Miguel, C. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond / C. Miguel, L. Marum // J. Exp. Bot. – 2011. – V. 62, N 11. – P. 3713–3725.
443. miRNA and mRNA expression profiles reveal insight into chitosan-mediated regulation of plant growth / X. Zhang, K. Li, R. Xing, S. Liu [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2018. – V. 66. – P. 3810–3822.

444. Miroshnichenko, D. Morphogenesis in plant tissue cultures / D. Miroshnichenko, M. Chernobrovkina, S. Dolgov // Edited by Woong-Young Soh and Sant S. Bhojwani – Springer Science+Business Media Dordrecht, 1999. – 522 p.
445. Miyazaki, J. Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrida* using Plant Preservative Mixture (PPMTM) / J. Miyazaki, B.H. Tan, S.G. Errington // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2010. – V. 102. – P. 365–372.
446. Modified solvent partition-ing scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay for indole 3-acetic acid / S.Yu. Veselov, G.R. Kudoyarova, N.L. Egutkin, V.G. Gyuli-Zade [et al.] // Physiol Plant. – 1992. – V. 86. – P. 93–96.
447. Modulation of somatic embryogenesis in hypocotyl-derived cultures of geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) cv Ringo rose by a bacterium / C. Visser-Tenzenhuis, B.N.S. Murthy, J. Odumeru, P.K. Saxena // *In Vitro* Cell Dev Biol. – 1994. – V. 30. – P. 140–143.
448. Mohr, H. Coaction between pigment systems / H. Mohr // In: Photomorphogenesis in Plants / Kendrick R.E. & Kronenberg G.M.H. (Eds.). – Martinus Nijhoff, Dordrecht, 1986. – P. 547–564.
449. Mok, M.C. Cytokinin activity ofN-phenyl-N' -1,2,3-thidiazol-5-yl urea and its effect on cytokinin autonomy in callus cultures of *Phaseolus* / M.C. Mok, D.W.S. Mok, D.J. Annstrong // Plant Physiol. – 1980. – V. 65. – 24.
450. Molecular detection of a bacterial contaminant *Bacillus pumilus* in symptomless potato plant tissue cultures / D.A. Isenegger, P.W.J. Taylor, K. Mullins [et al.] // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 21. – P. 814–820.
451. Monitoring by two-dimensional electrophoresis somatic embryogenesis in leaf and petiole explants from *Vitis* / E. Gianazza, P. De Ponti, A. Scienza [et al.] // Electrophoresis. – 1992. – V. 13. – P. 203–209.
452. Montesinos, E. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection / E. Montesinos // Int. Microbiol. – 2003. – V. 6. – P. 245–252.

453. Morphological and physiological responses of tara (*Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz) microshoots to ventilation and sucrose treatments / J.E. Núñez-Ramos, E. Quiala, L. Posada [et al.] // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* – 2021. – V. 57. – P. 1–14.
454. mRNAs newly synthetized by tobacco mesophyll protoplasts are wound-inducible / J. Grosset, I. Marty, Y. Chartier, Y. Meyer // *Plant Mol. Biol.* – 1990. – V. 15. – P. 485–496.
455. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, G. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – P. 473–497.
456. Murashige, T. Plant propagation through tissue cultures / T. Murashige // *Ann. Rev. Plant Physiol.* – 1974. – V. 25. – P. 135–166.
457. N-Acetylglucosamine and glucosaminecontaining arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis / A.J. Van Hengel, Z. Tadesse, P. Immerzeel, H. Schols [et al.] // *Plant Physiol.* – 2001. – V. 125. – P. 1880–1890.
458. Nasircilar, A.G. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of different wheat genotypes / A.G. Nasircilar, K. Turgut, K. Fiskin // *Pak. J. Bot.* – 2006. – V. 38, N 2. – P. 637–645.
459. Neumann, K.H. Some studies on somatic embryogenesis: a tool in plant biotechnology / K.H. Neumann. – 2000. – <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2000/321/>
460. Nhut, D.T. Positive effects of *Bacillus* spp. on the growth of *Chrysanthemum* spp. *in vitro* and *ex vitro* / D.T. Nhut // *Propagation of Ornamental Plants.* – 2005. – V. 5, N 3. – P. 146–150.
461. Nitsch, C. Induction *in vitro* de la floraison chez une plante de jours courts: *Plumbago indica* L. / C. Nitsch // *Ann. Sci. Nat. Bot. Paris 12th series.* – 1968. – V. 9. – P. 1–91.
462. Norman, D.J. Latent infections of *in vitro* anthurium caused by *Xanthomonas campestris* pv. *Diefenbachiae* / D.J. Norman, A.M. Alvarez // *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* – 1994. – V. 39. – P. 55–61.

463. Norton, C.R. Metabolic and non-metabolic gas treatments to induce shoot proliferation in woody ornamental plants *in vitro* / C.R. Norton // Acta Hortic. – 1988. – V. 227. – P. 302–204.
464. Nowak, J. Benefits of *in vitro* “biotization” of plant tissue cultures with microbial inoculants / J. Nowak // *In Vitro Cell Dev. Biol.* – 1998. – V. 34. – P. 122–130.
465. Nowak, J. Priming for transplant stress resistance in *in vitro* propagation / J. Nowak, V. Shulaev // *In Vitro Cell Dev. Biol.* – 2003. – V. 39. – P. 107–124.
466. Nwachukwu, B.C. Perspectives for sustainable agriculture from the microbiome in plant rhizosphere / B.C. Nwachukwu, O.O. Babalola // *Plant Biotechnology Reports.* – 2021. – V. 15. – P. 259–278.
467. Ochatt, S.J. Agroecological impact of an *in vitro* biotechnology approach of embryo development and seed filling in legumes / S.J. Ochatt // *Agronomy for Sustainable Development.* – 2014. – V. 35. – P. 535–552.
468. *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 promotes growth of potato microplants and is resistant to abiotic stress / G.L. Burygin, K.Y. Kargapolova, Y.V. Kryuchkova [et al.] // *World J Microbiol Biotechnol.* – 2019. – V. 35. – P. 55.
469. Oligochitosan induces programmed cell death in tobacco suspension cells / H. Zhang, W. Wang, H. Yin, X. Zhao [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2012. – V. 87, N 3. – P. 2270–2278.
470. O-polysaccharide structure in serogroup I azospirilla / A.S. Boiko, O.N. Smol'kina, Y.P. Fedonenko [et al.] // *Microbiology (Mikrobiologiya).* – 2010. – V. 79. – P. 197–205.
471. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? / M.W. Bairu, W.A. Stirk, K. Doležal, J. Van Staden // *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* – 2007. – V. 90. – P. 15–23.
472. Orlikowska, T. Bacteria in the plant tissue culture environment / T. Orlikowska, K. Nowak, B. Reed // *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* – 2017. – V. 128. – P. 487–508.

473. Orłowska, R. Barley somatic embryogenesis-an attempt to modify variation induced in tissue culture / R. Orłowska // J. of Biol. Res-Thessaloniki. – 2021. – V. 28. – 9.
474. OsCERK 1 plays a crucial role in the lipopolysaccharide-induced immune response of rice / Y. Desaki, Y. Kouzai, Y. Ninomiya [et al.] // New Phytologist. – 2018. – V. 217. – P. 1042–1049.
475. Oswald, A. Using rhizobacteria to improve productivity of potato / A. Oswald, P. Calvo // 15-th International Society for Tropical Root Crops (ISTRC), 2009. – P 29–33.
476. Ouchterlony, O. Handbook Experimental Immunology / O. Ouchterlony, L-A. Nilsson // In: Weiz D.M. (ed). – Oxford: Alden Press, 1979. – V. 1. – P. 19–33.
477. Overvoorde, P.J. The role of calcium and calmodulin in carrot somatic embryogenesis / P.J. Overvoorde, H.D. Grimes // Plant Cell Physiol. – 1994. – V. 35. – P. 135–144.
478. Ovesna, J. Study of callus growth and plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) tissue culture / J. Ovesna, M. Lhotová // Sci. Agric. Bohemoslovaca. – 1987. – V. 19. – P. 243–252.
479. Oxidative and molecular responses in *Capsicum annuum* L. after hydrogen proxide, salicylic acid and chitosan foliar applications / L. Mejí'a-Teniente, F.D.D. Durá'n-Flores, A.M. Chapa-Oliver [et al.] // J. Mol. Sci. – 2013. – V. 14. – P. 10178–10196.
480. Palme, K. PIN-pointing the molecular basis of auxin transport / K. Palme, L. Gaßweiler // Curr. Opin. Plant Biol. – 1999. – V. 2. – P. 375–381.
481. Palovaara, J. Conifer WOX-related homeodomain transcription factors, developmental consideration and expression dynamic of WOX2 during *Picea abies* somatic embryogenesis / J. Palovaara, I. Hakman // Plant Mol. Biol. – 2008. – V. 66. – P. 533–549.
482. Panahyan-e-Kivi, M. Study the effect of growth promoting bacteria (GPRB) on number and weight of mini-tubers of *Solanum tuberosum* cultivars in greenhouse

conditions / M. Panahyan-e-Kivi, Y. Raei, D. Hassanpanah // Journal of Fundamental and Applied Sciences. – 2016. – V. 8, N 25. – P. 28–38. – doi: 10.4314/jfas.v8i2s.556.

483. Panizza, M. "In vitro" propagation of lavandin: ethylene production during plant development / M. Panizza, A. Mensuali-Soldi, F. Tognoni // Acta Hortic. – 1988. – V. 227. – P. 302–304.

484. Partida-Martinez, L.P. The microbe-free plant: fact or artifact? / L.P. Partida-Martinez, M. Heil // Front Plant Sci. – 2011. – V. 2. – 100.

485. Patten, C.L. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system / C.L. Patten, B.R. Glick // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – V. 68. – P. 3795–3801.

486. Pattern formation during de novo assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem / S.P. Gordon, M.G. Heisler, G.V. Reddy [et al.] // Development. – 2007. – V. 134. – P. 3539–3548.

487. Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem / M.G. Heisler, C. Ohno, P. Das [et al.] // Curr. Biol. – 2005. – V. 15. – P. 1899–1911.

488. Paul, D. Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review / D. Paul, H. Lade // Agron. Sustain. Dev. – 2014. – V. 34. – P. 737–752.

489. Pereg, L. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants / L. Pereg, L.E. de-Bashan, Y. Bashan // Plant Soil. – 2016. – V. 399. – P. 389–414.

490. Pérez-Molina, J.P. Mapping fifty-five years of somatic embryogenesis research: a bibliometric analysis of trends, global collaborations, and key advances across more than nine thousand articles / J.P. Pérez-Molina, P. Carvajal-Campos, V.M. Jiménez // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) – 2025. – V. 162, N 44. – 4.

491. Perotto, M.C. The effect of additional viral infections on garlic plants initially infected with Allexiviruses European / M.C. Perotto, E.E. Cafrune, V.C. Conc // J. Plant Pathol. – 2009. – V. 126. – P. 489–495.

492. Persello-Cartieaux, F. Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions / F. Persello-Cartieaux, L. Nussaume, C. Robaglia // Plant, Cell and Environment. – 2003. – V. 26. – P. 189–199.
493. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture / M. Saleem, M. Arshad, S. Hussain, A.S. Bhatti // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V. 34. – P. 635–648.
494. Phenotypic variation in *Azospirillum brasiliense* exposed to starvation / A. Lerner, A. Valverde, S. Castro-Sowinski [et al.] // Environ. Microbiol. Rep. – 2010. – V. 2, N 4. – P. 577–586.
495. Phillips, G.C. Plant tissue culture media and practices: an overview / G.C. Phillips, M. Garda // *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2019. – V. 55. – P. 242–257.
496. Phospholipase D is required for the activation of target of rapamycin (TOR) signaling in *Arabidopsis thaliana* by lipopolysaccharides from *Azospirillum bal- daniorum* Sp245 / A.A. Hernández-Esquivel, E. Castro-Mercado, I. Flores-Cortez [et al.] // Plant Science. – 2025. – V. 359. – 112653.
497. Pillay, V.K. Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium / V.K. Pillay, J. Nowak // Can. J. Microbiol. – 1997. – V. 43. – P. 354–361.
498. Piqueras, A. Morphogenesis in micropagation / A. Piqueras, P.C. Debergh // Morphogenesis in plant tissue cultures / Edited by W.-Y. Soh, S.S. Bhojwani. – Springer-Science+Business Media, B.V., 1999. – V. 15. – P. 443–462.
499. Plant growth and morphogenesis *in vitro* is promoted by associative methylotrophic bacteria / M.A. Kalyaeva, N.S. Zacharchenko, E.B. Rukavtsova [et al.] // Russian Journal of Plant Physiology. – 2001. – V. 48, N 4. – P. 514–517.
500. Plant growth promoting rhizobacteria in sustainable agriculture: from theoretical to pragmatic approach / S. Mustafa, S. Kabir, U. Shabbir, R. Batool // Symbiosis. – 2019. – V. 78. – P. 115–128.

501. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning / J. Vacheron, G. Desbrosses, M-L. Boufaud, B. Touraine [et al.] // Front. Plant Sci. – 2013. – V. 4. – 356.

502. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition V. 1. The Background / Edited by E.F. George, M.A. Hall, G-J. De Klerk – Netherlands: Springer, 2008. – 504 p.

503. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum*) / S.E. Maddock, V.A. Lancaster, R. Risiott, J. Franklin // Exp. Bot. – 1983. – V. 34. – P. 915–926.

504. Plant regeneration from immature embryo-derived calli of wheat isogenic lines / N.A. Omelianchuk, O.B. Dobrovolskaja, S.F. Koval, V.K. Shumny // Hereditas. – 1992. – V. 116, N 3. – P. 311–314.

505. Plant regeneration from mature embryo of commercial Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars / S.S. Parmar, M. Sainger, D. Chaudhary, P.K. Jaiwal // Physiol. Mol. Biol. Plants. – 2012. – V. 18. – P. 177–183.

506. Popielarska-Konieczna, M. Extracellular matrix of plant callus tissue visualized by ESEM and SEM / M. Popielarska-Konieczna, J. Bohdanowicz, E. Starnawska // Protoplasma. – 2010. – V. 247. – P. 121–125.

507. Popielarska-Konieczna, M. Histological and SEM studies on organogenesis in endosperm-derived callus of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) / M. Popielarska-Konieczna, H. Ślesak, G. Góralski // Acta biologica Cracoviensia. Series botanica. – 2006. – V. 48, N 2. – P. 97–104.

508. Poppenberger B., Latent persistence of *Agrobacterium vitis* in microp propagated *Vitis vinifera* / B. Poppenberger, W. Leonhardt, H. Redl // VITIS – J. Grapevine Res. – 2002. – V. 41. – P. 113–114.

509. Potential Role and Utilization of Plant Growth Promoting Microbes in Plant Tissue Culture / A. Soumare, A.G. Diédhieu, N.K. Arora, L.K.T. Al-Ani [et al.] // Front. Microbiol. – 2021. – V. 12. – 649878.

510. Pretreatment free of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid improves the differentiation of sugarcane somatic embryos by affecting the hormonal balance and the accumulation of sugarcane somatic embryos by affecting the hormonal balance and the accumula-

lation of reserves / R.S. Reis, E.M. Vale, K.R. Sousa, C. Santa-Catarina [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2021. – V. 145. – P. 101–115.

511. Prevention of vitriication associated with *in vitro* shoot culture of oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. / K. Shetty, O.F. Curtis, R.E. Levin, R. Witkowsky [et al.] // J. Plant Physiol. – 1995. – V. 147. – P. 447–451.

512. Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactan proteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis / M.A.J. Toonen, E.D.L. Schmidt, A. van Kammen, S.C. deVries // Planta. – 1997. – V. 203. – P. 188–195.

513. Protocol for micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa*) cv. ‘Sweet Charlie’ and ‘Winter Dawn’ / M.R. Dhukate, M.M. Kher, A. Vadawale, P. Giri // Environmental and Experimental Biology. – 2021. – V. 19, N 1. – P. 1–6.

514. Putative mechanisms of bacterial efects on plant photosystem under stress / O.P. Burlak, J.-P. de Vera, V. Yatsenko, N.O. Kozyrovska // Biopolym. Cell. – 2013. – V. 29. – P. 3–10.

515. Raetz, C.R. Lipopolysaccharide endotoxins / C.R. Raetz, C. Whitfield // Annu. Rev. Biochem. – 2002. – V. 71. – P. 635–700.

516. Raetz, C.R.H. Bacterial Lipopolysaccharides: a Remarkable Family of Bioactive Macroamphiphiles / C.R.H. Raetz // Escherichia coli Salmonella Cell. Mol. Biol. 2nd Editio. – ASM Press, 1996. – P. 1035–1063.

517. Rahman, M.M. *In vitro* regeneration from mature embryos in spring wheat / M.M. Rahman, A.K.M. Shamsuddin, U. Asad // Int. J. Sustain. Crop Prod. – 2008. – V. 3, N 2. – P. 76–8.

518. Rajasekharan, P.E. Plant biology and biotechnology / P.E. Rajasekharan, L. Sahijram // In: Plant biology and biotechnology. Vol II. Plant genomics and biotechnology / B. Bahadur, M. Venkat Rajam, L. Sahijram, K.V. Krishnamurthy (eds). – New Delhi: Springer, 2015. – P. 417–443.

519. Rakesh, B. Role of polyamines in plant tissue culture: An overview / B. Rakesh, W.N. Sudheer, P. Nagella // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2021. – V. 145. – P. 487–506.

520. Rather, S.A. Proportional contribution and potential of maternal and paternal genotypes for polyhaploid induction in wheat x *Imperata cylindrical* chromosome elimination approach / S.A. Rather, H.K. Chaudhary, V. Kaila // Cereal Res. Commun. – 2014. – V. 42. – P. 19–26.
521. Receptor kinase signaling pathways in plant-microbe interactions / M. Antolin-Llovera, M.K. Ried, A. Binder, M. Parniski // Annu Rev Phytopathol. – 2012. – V. 50. – P. 451–473.
522. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation / P.C. Debergh, J. Aitken-Christie, D. Cohen [et al.] // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1992. – V. 30. – P. 135–140.
523. Reddy, P.P. Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Horticultural Crop Protection / P.P. Reddy. – India: Springer, – 2014. – 497 p.
524. Redha, A. Effects of exogenous application of polyamines on wheat anther cultures / A. Redha, P. Suleman // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2011. – V. 105. – P. 345–353.
525. Reed, B.M. Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature / B.M. Reed, P. Tanprasert // Plant Tissue Cult. Biotechnol. – 1995. – V. 1. – P.137–142.
526. Reed, J.W. Roles and activities of Aux/IAAs in Arabidopsis / J.W. Reed // Trends Plant Sci. – 2001. – V. 6. – P. 420–425.
527. Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium / Y.E. Choi, D.C. Yang, J.C. Park [et al.] // Plant Cell Rep. – 1998. – V. 17. – P. 544–551.
528. Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures/ L. Michalczuk, D.M. Ribnicky, T.J. Cooke, J.D. Cohen // Plant Physiol. – 1992. – V. 100. – P. 1346–1353.
529. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. / H.N. Asghar, Z.A. Zahir, M. Arshad, A. Khaliq // Biol Fertil Soils. – 2002. – V. 35. – P. 231–237.

530. Rhizobacteria that produce auxins and contain 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid deaminase decrease amino acid concentrations in the rhizosphere and improve growth and yield of well-watered and water-limited potato (*Solanum tuberosum*) / A.A. Belimov, I.C. Dodd, V.I. Safronova [et al.] // Annals of Applied Biology. – 2015. – V. 167. – P. 11–25.
531. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in Arabidopsis / H. Zhang, M.S. Kim, V. Krishnamachari, P. Payton [et al.] // Plantae. – 2007. – V. 226, N 4. – P. 839–851.
532. Rhizobium Lipooligosaccharides Rescue a Carrot Somatic Embryo Mutant / A.J. De Jong, R. Heidstra, P. Spaink Herman [et al.] // The Plant Cell. – 1993. – V. 5. – P. 615–620.
533. Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars / P.R. Hardoim, F.D. Andreote, B. Reinhold-Hurek [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. – 2011. – V. 77. – 154.
534. Rogg, L.E. Auxin Signaling. Derepression through regulated proteolysis / L.E. Rogg, B. Bartel // Dev. Cell. – 2001. – V. 1. – P. 595–604.
535. Role of ethylene and related gene expression in the interaction between strawberry plants and the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasiliense* / J. Elías, M. Guerrero-Molina, M. Martinez-Zamora [et al.] // Plant Biology. – 2018. – V. 20. – P. 490–496.
536. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses / M. Grover, S.Z. Ali, V. Sandhya [et al.] // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – V. 27. – P. 1231–1240.
537. Role of origin and endophyte infection in browning of bud-derived tissue cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) / A.M. Pirttilä, O. Podolich, J.J. Koskimäki, E. Hohtola [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2008. – V. 95. – P. 47–55.
538. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem / K.F. Mayer, H. Schoof, A. Haecker [et al.] // Cell. – 1998. – V. 95, N 6. – P. 805–815.

539. Romano, A. Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak / A. Romano, C. Noronha, M.A. Martins-Loucao // Plant Cell Tissue Organ Culture. – 1995. – V. 40. – P. 59–167.
540. Root-associated bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase improve growth and nutrient uptake by pea genotypes cultivated in cadmium supplemented soil / V.I. Safranova, V.V. Stepanok, G.L. Engqvist, Y.V. Alekseyev [et al.] // Biol. Fert. Soils. – 2006. – V. 42, N 3. – P. 267.
541. Salisbury, F.B. Plant Physiology / F.B. Salisbury, C.W. Ross. – Belmont: Wadsworth. USA, 1992. – 456 p.
542. Salt tolerance of calluses of six cultivars obtained from tissue culture on different media / M. Taghvaii, H.E. Majidi, G. Sarmadnia, D. Mazaheri [et al.] // Seed and Plant. – 1998. – V. 13. – P. 60–68.
543. Santos, D. Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* / D. Santos, P. Fevereiro // Plant Cell, Tissue Organ Culture. – 2002. – V. 70. – P. 155–161.
544. Saravanakumar, D. Rhizobacterial ACC deaminase in plant growth and stress amelioration / D. Saravanakumar // In: Bacteria in agrobiology: stress management. Maheshwari D.K. (ed). – Berlin: Springer, 2012. – P. 187–210.
545. Scaling from the growth chamber to the greenhouse to the field: Demonstration of diminishing effects of mitigation of salinity in peppers inoculated with plant growth-promoting bacterium and humic acids / M. Bacilio, M. Moreno, D.R. Lopez-Aguilar, Y. Bashan // Applied Soil Ecology. – 2017. – V. 119. – P. 327–338.
546. Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.) / A. Ambrosini, A. Beneduzi, T. Stefanski [et al.] // Plant Soil. – 2012. – V. 356. – P. 245–264.
547. Sears, R.G. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration / R.G. Sears, E.L. Deckard // Crop. Sci. – 1982. – V. 22. – P. 546–550.
548. Seed inoculation with *Azospirillum mitigates* NaCl effects on lettuce / C.A. Barassi, G. Ayrault, C.M. Creus [et al.] // Scientia Horticulturae. – 2006. – V. 109. – P. 8–14.

549. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli* / I. Orskov, F. Orskov, B. Jann, K. Jann // *Bacteriol. Rev.* – 1977. – V. 41. – P. 667–710.
550. Shan, X. Thidiazuron promotes *in vitro* regeneration of wheat and barley / X. Shan, D. Li, R. Qu // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* – 2000. – V. 36 – P. 207–210.
551. Shary, S. Isolation and Expression Studies of Differentiation Specific Genes in Tobacco Dihaploids Using PCR Based Subtractive Hybridization Method / S. Shary, S. Guha-Mukherjee // *Plant Sci.* – 2004. – V. 166. – P. 317–322.
552. Shimada, T. *In vitro* tissue culture of wheat tissues. I. Callus formation, organ redifferentiation and single cell culture / T. Shimada, T. Sasakuma, K. Tsunewaki // *Canadian J. Genet. Cytol.* – 1969. – V. 11. – P. 294–304.
553. Shingote, P.R. LTR retrotransposons and highly informative ISSRs in combination are potential markers for genetic fidelity testing of tissue culture-raised plants in sugarcane / P.R. Shingote // *Mol. Breed.* – 2019. – V. 39. – 25.
554. Shoot apical meristem: *in vitro* regeneration and morphogenesis in wheat / A. Ahmed, H. Zhang, W. Wang, M.B. Sticklen // *In vitro Cell Dev Biol Plant.* – 2002. – V. 38. – P. 163–167.
555. Showalter, A.M. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function / A.M. Showalter // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2001. – V. 58. – P. 1399–1417.
556. Side-chain modification of cytokinins controls shoot growth in *Arabidopsis* / T. Kiba, K. Takei, M. Kojima, H. Sakakibara // *Dev. Cell.* – 2013. – V. 27. – P. 452–461.
557. Silver nanoparticles as the sterilant in large-scale micropropagation of chrysanthemum / H.T. Tung, H.G. Bao, D.M. Cuong [et al.] // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* – 2021. – V. 57. – P. 897–906.
558. Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasiliense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community / C. Felici, L. Vettori, E. Giraldi [et al.] // *Applied Soil Ecology.* – 2008. – V. 40. – P. 260–270.

559. Single and combined effects of calchicine, L-proline and post inoculation low temperature on anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) / A. Redha, T. Attia, B. Buter, P. Stamp [et al.] // Plant Breeding. – 1998. – V. 117. – P. 335–340.
560. Sinha, A. Evidences for differential expression of miR167d-5p, target, positional nucleotide preference, and its role in somatic and different stages of regenerating calli of *Oryza sativa* / A. Sinha, M. Solanki, L.I. Shukla // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2019. – V. 136. – P. 537–548.
561. Skoog, F. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* / F. Skoog, C.O. Miller // Symposia of the Society of Experimental Biology. – 1957. – V. 11. – P. 118–131.
562. Smith, D.L. pH control of carrot somatic embryogenesis / D.L. Smith, A.D. Krikorian // In: Progress in Plant Cellular and Molecular Biology / H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van der Plas, J. Van Aartrijk (eds). – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990a. – P. 449–453.
563. Smith, D.L. Somatic proembryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium: evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal / D.L. Smith, A.D. Krikorian // Plant Cell Rep. – 1990b. – V. 9. – 34.
564. Smith, H. Light quality, photoperception, and plant strategy / H. Smith // Ann. Rev. Plant Physiol. – 1982. – V. 33. – P. 481–458.
565. Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture / M. Nishiwaki, K. Fujino, Y. Koda [et al.] // Planta. – 2000. – V. 211. – P. 756–759.
566. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development / H. Tanaka, P. Dhonukshe, P.B. Brewer, J. Friml // Cell Mol. Life Sci. – 2006. – V. 63. – P. 2738–2754.
567. Stage and tissue-specific modulation of ten conserved miRNAs and their targets during somatic embryogenesis of Valencia sweet orange / X.-M. Wu, M.-Y. Liu, X.-X. Ge, Q. Xu [et al.] // Planta. – 2011. – V. 233, N 3. – P. 495–505.

568. Steenhoudt, O. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects / O. Steenhoudt, J. Vanderleyden // FEMS Microbiol. Rev. – 2000. – V. 24. – P. 487–506.
569. Stevenson, G. Structure of the O antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its rfb gene cluster / G. Stevenson et al. // J. Bacteriol. – 1994. – V. 176, N 13. – P. 4144–4156.
570. Stimulation of plant growth and biocontrol by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 engineered for improved action / J.-Q. Qiao, H.-J. Wu, R. Huo, X.-W. Gao [et al.] // Chemical and Biological Technologies in Agriculture. – 2014. – V. 1. – 12.
571. Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production / H. Kamada, K. Kobayashi, T. Kiyosue, H. Harada // *In Vitro* Cell Dev. Biol. – 1989. – V. 25. – P. 1163–1166.
572. Structural analysis of the O-antigen of the lipopolysaccharide from *Azospirillum lipoferum* SR65 / Y.P. Fedonenko, E.L. Zdorovenko, S.A. Konnova [et al.] // Carbohydr. Res. – 2008. – V. 343. – P. 2841–2844.
573. Structural and functional peculiarities of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* SR55, isolated from the roots of *Triticum durum* / A.S. Boyko, S.A. Konnova, Y.P. Fedonenko [et al.] // Microbiol. Res. – 2011. – V. 166. – P. 585–593.
574. Structural studies of the O-specific polysaccharide(s) from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* type strain Sp7 / E.N. Sigida, Y.P. Fedonenko, A.S. Shashkov, E.L. Zdorovenko [et al.] // Carbohydr. Res. – 2013. – V. 380. – P. 76–80.
575. Structure and serology of O-antigens of nitrogen-fixing rhizobacteria of the genus *Azospirillum* / Y.P. Fedonenko, E.N. Sigida, S.A. Konnova, V.V. Ignatov // Russ. Chem. Bull. – 2015. – V. 64. – P. 1024–1031.
576. Studies on the embryogenic processes in the *in vitro* culture of wheat somatic tissues by using a proliferative antigen of initial cells / N.V. Evseeva, O.V. Tkachenko, Yu.V. Lobachev [et al.] // Wheat Information Service. – 2002. – V. 94. – P. 1–4.

577. Study of cytokinin transport from shoots to roots of wheat plants is informed by a novel method of differential localization of free cytokinins bases or their ribosylated forms by means of their specific fixation / S.Yu. Veselov, L.N. Timergalina, G.R. Akhiyarova, G.R. Kudoyarova [et al.] // Protoplasma. – 2018. – V. 255, N 5. – P. 1581–1594.

578. Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* / C.M. Ryu, C.H. Hu, R.D. Locy, J.W. Kloepfer // Plant Soil. – 2005. – V. 268. – P. 285–292.

579. Substitution of benzyladenine with meta-topolin during shoot multiplication increases acclimatization of difficult- and easy-to acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes / C. Valero-Aracama, M.E. Kane, S.B. Wilson, N.L. Philman // Plant Growth Regul. – 2010. – V. 60. – P. 43–49.

580. Sugiyama, M. Historical review of research on plant cell dedifferentiation / M. Sugiyama // J. Plant Res. – 2015. – V. 128. – P. 349–359.

581. Sunayana, M.R. Rhodestrin: A novel indole terpenoid phytohormone from *Rhodobacter sphaeroides* / M.R. Sunayana, C. Sasikala, C.V. Ramana // Biotechnol. Lett. – 2005. – V. 27. – P. 1897–1900.

582. Synergism of m-topolin with auxin and cytokinin enhanced micropropagation of *Maytenus emarginata* / J.K. Shekhawat, M.K. Rai, N.S. Shekhawat [et al.] // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2021. – V. 57. – P. 418–426.

583. Taeb, A.G. Shoot production and bulbing of tulip *in vitro* related to ethylene / A.G. Taeb, P.G. Alderson // HortScience. – 1990. – V. 65. – P. 199–204.

584. Takahashi, Y. Function and modulation of expression of auxin-regulated genes / Y. Takahashi, S. Ishida, T. Nagata // Int. Rev. Cytol. – 1994. – V. 152. – P. 109–144.

585. Temporary immersion systems for the mass propagation of sweet cherry cultivars and cherry rootstocks: development of a micropropagation procedure and effect of culture conditions on plant quality / S. Godoy, E. Tapia, P. Seit [et al.] // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2017. – V. 53. – P. 494–504.

586. The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture / V. Hecht, J.P. Vielle-Calzada, M.V. Hartog [et al.] // Plant Physiol. – 2001. – V. 127. – P. 803–816.

587. The aromatic cytokinin meta-topolin promotes *in vitro* propagation, shoot quality and micrografting in *Corylus colurna* L. / A. Gentile, A. Frattarelli, P. Nota [et al.] // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2017. – V. 128. – P. 693–703.

588. The association of fraser photinia and its beneficial bacterium (PGB_invit) provided *in vitro* storage without subculture / I. Şah, H. Akdemir, E. Kaya, Ö. Akkaya [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2019. – V. 136.

589. The association of homeobox gene expression with stem cell formation and morphogenesis in cultured *Medicago truncatula* / S.K. Chen, S. Kurdyukov, A. Kereszt [et al.] // Planta. – 2009. – V. 230. – P. 827–840.

590. The benefits of foliar inoculation with *Azospirillum brasiliense* in soybean are explained by an auxin signaling model / M.L. Puente, J.L. Gualpa, A.L. Gastón, R.M. Molina [et al.] // Symbiosis. – 2018. – V. 76. – P. 41–49.

591. The Biology of Azospirillum-sugarcane Association I. Establishment of the Association / V. Vasil, I.K. Vasil, D.A. Zuberer, D.H. Hubbell // Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie. – 1979. – V. 9, N 2. – P. 141–147.

592. The dual inoculation of endophytic fungi and bacteria promotes seedlings growth in *Dendrobium catenatum* (Orchidaceae) under *in vitro* culture conditions / X. Wang, T. Yam, Q. Meng, J. Zhu [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2016. – V. 126. – P. 523–531.

593. The effect of a mixture of two plant growth-promoting bacteria from Argentina on the yield of potato, and occurrence of primary potato diseases and pest – short communication / S. Trdan, F. Vučajnk, T. Bohinc, M. Vidrih // Acta agriculturae scandivica, Section B – Soil & Plant science. – 2019. – V. 69, N. 1. – P. 89–94.

594. The effect of inoculating endophytic N2-fixing bacteria on micropagated sugarcane plants / A.L.M. Oliveira, S. Urquiaga, J. Döbereiner, J.I. Baldani // Plant and Soil. – 2002. – V. 242. – P. 205–215.

595. The effect of low intensity coherent radiation on morphogenetic processes in wheat callus cultures / R.K. Salyaev, L.A. Dudareva, S.V. Lankevich, V.M. Sumtsova // Doklady Biol. Sci. – 2001. – V. 376. – P. 113–114.
596. The epidermis coordinates auxin-induced stem growth in response to shade / C. Procko, Y. Burko, Y. Jaillais, K. Ljung [et al.] // Genes Dev. – 2016. – V. 30, N 13. – P 1529.
597. The evolution of animals and plants via symbiosis with microorganisms / E. Rosenberg, G. Sharon, I. Atad, I. Zilber-Rosenberg // Environ Microbiol Rep. – 2010. – V. 2. – P. 500–506.
598. The impact of three bacteria isolated from contaminated plant cultures on *in vitro* multiplication and rooting of microshoots of four ornamental plants / M. Zawadzka, P. Trzciński, K. Nowak, T. Orlikowska // J. Hortic. Res. – 2014. – V. 21. – 41.
599. The influence of ethylene on proliferation and growth of rose shoot cultures / C. Kevers, N. Boyer, J.C. Courdoux, T. Gaspar // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1992. – V. 28. – P. 175–181.
600. The Lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* Suppresses Defense-Associated Gene Expression in Cell Cultures of the Host Plant *Medicago truncatula* / V. Tellstrom, B. Usadel, O. Thimm, M. Stitt [et al.] // Plant Physiology. – 2007. – V. 143. – P. 825–837.
601. The mitogenic effect of lipopolysaccharide on bone marrow-derived mouse lymphocytes lipid a as the mitogenic part of the molecule / J. Andersson, F. Melchers, C. Galanos, O. Lüderitz // The Journal of experimental medicine. – 1973. – V. 137, N 4. – P. 943–953.
602. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms / J.M. Raaijmakers, T.C. Paulitz, C. Steinberg, C. Alabouvette [et al.] // Plant Soil. – 2009. – V. 321. – P. 341–361.
603. The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa (*Medicago sativa* L.) / T. Pasternak, E.

Prinsen, F. Ayaydin, P. Miskolczi [et al.] // Plant Physiol. – 2002. – V. 129. – P. 1807–1819.

604. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants / M.J. Van Oosten, O. Pepe, S. De Pascale, S. Silletti [et al.] // Chem. Biol. Technol. Agric. – 2017. – V. 4. – 5.

605. The Role of Somaclonal Variation in Plant Genetic Improvement: A Systematic Review / M.d.S. Ferreira, A.d.J. Rocha, F.d.S. Nascimento [et al.] // Agronomy. – 2023. – V. 13. – 730.

606. The shoot meristemless gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE* / K. Endrizzi, B. Moussian, A. Haecker [et al.] // Plant J. – 1996. – V. 10, N 6. – P. 967–979.

607. The Starter Effect of Non-Symbiotic Microbial Bioproducts on Wheat / R. Vidican, V. Stoian, I. Rotar, F. Păcurar // Bulletin USAMV series Agriculture. – 2017. – V. 74, N 2. – P. 134–139.

608. The *Theobroma cacao* B3 domain transcription factor TcLEC2 plays a duel role in control of embryo development and maturation / Y. Zhang, A. Clemens, S.N. Maximova, M.J. Guiltinan // BMC Plant Biology. – 2014a. – V. 14. – 106.

609. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis* / J. Zuo, Q.W. Niu, G. Frugis, N.H. Chua // Plant J. – 2002. – V. 30, N 3. – P. 349–359.

610. Thomas, P. *In vitro* decline in plant cultures: detection of a legion of covert bacteria as the cause for degeneration of long-term micropropagated triploid watermelon cultures / P. Thomas // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2004. – V. 77. – P. 173–179.

611. Thompson, E.W. Relation of protein synthesis in imbibing wheat embryos to the cell-free translational capacities of bulk mRNA from dry and imbibing embryos / E.W. Thompson, B.G. Lane // J. Biol. Chem. – 1980. – V. 255. – P. 5965–5970.

612. Tissue culture responsive microRNAs in strawberry / H. Li, X. Zhao, H. Dai [et al.] // Plant Mol. Biol. Report. – 2012. – V. 30. – P. 1047–1054.

613. Tissue-specific expression of Pa18, a putative lipid transfers protein gene, during embryo development in Norway spruce (*Picea abies*) / I. Sabala, M. Elfstrand, I. Farbos, D. Clapham [et al.] // Plant Mol. Biol. – 2000. – V. 42. – P. 461–478.
614. Tkachenko, O.V. Genes Rht Influence on an Androgenesis *in vitro* of Spring Bread Wheat and Durum Wheat lines / O.V. Tkachenko, T.I. Djatchouk, Yu.V. Lobachev // Jornal of Huazhong Agricultural University. – 2000. – V. 19, N 3. – P. 219–222.
615. Tkachenko, O.V. Using isogenic analisis to stady genotype effect in *in vitro* cell and tissue culture of wheat / O.V. Tkachenko, Yu.V. Lobachev // Annual Wheat Newsletter. USA. KSU. – 2008. – V. 54. – P. 122.
616. Topolins: a panacea to plant tissue culture challenges? / A.O. Aremu, M.W. Bairu, K. Doležal [et al.] // Cell Tiss Org Cult. – 2012. – 108. – P. 1–16.
617. Tortora, M.L. Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasiliense* / M.L. Tortora, J.C. Díaz-Ricci, R.O. Pedraza // Plant Soil. – 2012. – V. 356. – P. 279–290.
618. Toward a controllable headspace composition - growth, development and headspace of a micropropagated *Pronus rootstock* in different containers / J. Demeester, D. Matthijs, B. Pascat, P. Debergh // In Vitro Cell. Dev. Biol. – 1995. – V. 31. – P. 105–112.
619. Transcriptional and Metabolic Profiles of Stress Induced, Embryogenic Tobacco Microspores / J. Hosp, A. Tashpulatov, U. RoessnerTunali [et al.] // Plant Mol. Biol. – 2006. – V. 63. – P. 137–149.
620. Turner, T.R. The plant microbiome / T.R. Turner, E.K. James, P.S. Poole // Genome Biol. – 2013. – V. 14. – 209.
621. Two-dimensional electrophoretic analysis of proteins associated with somatic embryogenesis development in *Cupressus sempervirens* L. / A. Sallandrouze, M. Faurobert, M. El Maataoui, H. Espagnac // Electrophoresis. – 1999. – V. 20. – P. 1109–1119.
622. Tyrka, M. Populations of doubled haploids for genetic mapping in hexaploid winter triticale / M. Tyrka // Mol. Breed. – 2018. – V. 38. – 46.

623. Ubiquitous presence of normally non-culturable endophytic bacteria in field shoot-tips of banana and their gradual activation to quiescent cultivable form in tissue cultures / P. Thomas, G.K. Swarna, P. Patil, R.D. Rawal // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2008. – V. 93. – P. 39–54.
624. Ueno, K. Reduced hyperhydricity and enhanced growth of tissue culture-generated raspberry (*Rubus* sp.) clonal lines by *Pseudomonas* sp. isolated from oregano / K. Ueno, S. Cheplick, K. Shetty // Process. Biochem. – 1998. – V. 33. – P. 441–445.
625. Ultrastructure and histochemical analysis of extracellular matrix surface network in kiwifruit endosperm-derived callus culture / M. Popielarska-Konieczna, M. Kozieradzka-Kiszko, J. Świerczyńska, G. Góralski [et al.] // Plant Cell Rep. – 2008. – V. 27, N 7. – P. 1137–1145.
626. Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives / G. Berg, M. Grube, M. Schloter, K. Smalla // Front. Microbiol. – 2014. – V. 5. – 148.
627. Unusual lipid A from a cold adapted bacterium: detailed structural characterization / A. Casillo, M. Ziaico, B. Lindner, [et al.] // Chem. Bio. Chem. – 2017. – V. 18. – P. 1845–1854. – doi:10.1002/cbic.201700287.
628. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition / D. Owen, A.P. Williams, G.W. Griith, P.J.A. Withers // Appl. Soil. Ecol. – 2015. – V. 86. – P. 41–54.
629. Use of non-integrating Zm-Wus2 vectors to enhance maize transformation. Non-integrating WUS2 enhances transformation / G. Hoerster, N. Wang, L. Ryan [et al.] // *In Vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant. – 2020. – V. 56. – P. 265–279.
630. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects. / S. Compant, B. Duffy, J. Nowak [et al.] // Appl Env Microbiol. – 2005. – V. 71, N 9. – P. 4951–4959.
631. Use of the dot-blot immunogold assay to identify a proliferative antigen of the initial cells of a wheat stem meristem / M.V. Sumaroka, L.A. Dykman, V.A. Bogatyrev, N.V. Evseeva [et al.] // Journal of Immunoassay. – 2000. – V. 21. – P. 401–410.

632. Use of tissue culture techniques for producing virus-free plant in garlic and their identification through real-time PCR / H. Taşkın, G. Baktemur, M. Kurul, S. Büyükalaca // Sci. World J. – 2013. – V. 5. – 781282.
633. Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization / L.T. Ferreira, M.M. de Araújo Silva, C. Ulisses [et al.] // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2016. – 128(1). – P. 201–221. – doi: 10.1007/s11240-016-1101-7.
634. Uthairatanakij, A. Chitosan for improving orchid production and quality / A. Uthairatanakij, J.A. Teixeira da Silva, K. Obsuwan // Orchid. Sci. Biotechnol. – 2007. – V. 1, N 1. – P. 1–5.
635. Verdeil, J. Ultrastructural Changes in Coconut Calli Associated with the Acquisition of Embryogenic Competence / J. Verdeil // Annals of Botany. – 2001. – V. 88, N 1. – P. 9–18.
636. Vessey, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers / J.K. Vessey // Plant and Soil. – 2003. – V. 255. – P. 571–586.
637. Vestberg, M. The use of AMF and PGPR inoculants singly and combined to promote microplant establishment, growth and health / M. Vestberg, A. Cassells // In: Fungi symbiotic, biology soil / A. Varma, A.C. Kharkwal (eds). – Berlin: Springer, 2009. – P. 337–360.
638. Volkogon, V.V. Peculiarities of the relationships of Azospirillum bacteria with potato plants growing *in vitro* / V.V. Volkogon, S.B. Dimova, A.E. Mamchur // Sel'skokhozyaistvennaya mikrobiologiya. – 2006. – V. 3. – P. 19–25.
639. Vroemen, C. Signalling in plant embryos during the establishment of the polar axis / C. Vroemen, S. de Vries, R. Quatrano // Semin. Cell Dev. Biol. – 1999. – V. 10. – P. 157–164.
640. Walker, L. Molecular mechanisms of auxin action / L. Walker, M. Estelle // Curr. Opin. Plant Biol. – 1998. – V. 1. – P. 434–439.
641. Wang, K. Wheat genome editing expedited by efficient transformation techniques: progress and perspectives / K. Wang, B. Riaz, X. Ye // Crop J. – 2018. – V. 6. – P. 22–31.

642. Wei, Y.D. Role of auxinic herbicide-induced ethylene on hypocotyl elongation and root /hypocotyl radial expansion / Y.D. Wei, H.G. Zheng, J.C. Hall // Pest. Manage. Sci. – 2000. – V. 56. – P. 377–387.
643. Weigel, D. Stem cells that make stems / D. Weigel, G. Jurgens // Nature. – 2002. – V. 415. – P. 751–754.
644. Welander, M. Regulation of *in vitro* shoot multiplication in Syringia, AInus and malus by different carbon sources / M. Welander, N.T. Welander, A.S. Brackman // J. Hortic. Sci. – 1989. – V. 64. – P. 361–366.
645. Weyen, J. Barley and wheat doubled haploids in breeding / J. Weyen // In: Advances in haploid production in higher plants / A. Touraev, B.P. Forster, M. Jain (eds). – Dordrecht: Springer, 2009. – P. 179–188.
646. Wilson, D. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition / D. Wilson // Oikos. – 1995. – V. 73. – P. 274–276.
647. Wójcikowska, B. Expression profiling of AUXIN RESPONSE FACTOR genes during somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis* / B. Wójcikowska, M.D. Gaj // Plant Cell Reports. – 2017. – V. 36, N 6. – P. 843–858.
648. Woodward, S. Rishitin accumulation elicited in resistant and susceptible isolines of tomato by mycelial extracts and filtrates from cultures of *Verticillium alboatrum* / S. Woodward, G.F. Pegg // Physiol. Mol. Plant Pathol. – 1986. – V. 29. – P. 337–347.
649. Wuschel overexpression promotes somatic embryogenesis and induces organogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) tissues cultured *in vitro* / O. Bouchabke'-Coussa, M. Obellianne, D. Linderme, [et al.] // Plant Cell Rep. – 2013. – V. 32. – P. 675–686.
650. Yeung, E.C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis / E.C. Yeung // In: *In Vitro* Embryogenesis in Plants / T.A. Thorpe (ed) – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. – P. 205–248.
651. Zang, P. Improvement of cassava shoot organogenesis by the use of AgNO₃ *in vitro* / P. Zang, S. Phansiri, J. Puonti-Kaerlas // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PTOC). – 2001. – V. 67. – P. 47–54.

652. Zarea, M.J. Azospirillum and Wheat Production / M.J. Zarea // In: Probiotics in Agroecosystem / V. Kumar et al. (eds.). – Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2017. – P. 329–348.
653. Zhang, D. Tissue culture-induced heritable genomic variation in rice, and their phenotypic implications / D. Zhang // PLoS. – 2014. – V. 9. – e96879.
654. Zhu, J-Y. Brassinosteroid signaling / J-Y. Zhu, J. Sae-Seaw, Z-Y. Wang // Development. – 2013. – V. 140. – P. 1615–1620.
655. Ziv, M. Scaled-up proliferation and regeneration of Nerine in liquid cultures Part I. The induction and maintenance of proliferating meristematic clusters by paclobutrazol in bioreractors / M. Ziv, S. Kahany, H. Lilien-Kipnis // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 1994. – V. 39. – P. 109–115.
656. Ziv, M. The effects of growth retardants on shoot proliferation and morphogenesis in liquid cultured Gladiolus plants / M. Ziv // Acta Hortic. – 1990. – V. 280. – P. 207–214.

Приложения



(19) RU (11) 2 186 768 (13) C1
 (51) МПК⁷ C 07 D 207/08, A 01 N 43/36

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2001103941/04, 12.02.2001

(24) Дата начала действия патента: 12.02.2001

(46) Дата публикации: 10.08.2002

(56) Ссылки: RU 2039041, 09.07.1995. SU 1049482, 23.10.1983. US 3922163, 25.11.1975.

(98) Адрес для переписки:
410600, г.Саратов, ул. Советская, 60,
Саратовский ГАУ им. Вавилова, УНПЦ
"Волгоагротехника", патентная группа

(71) Заявитель:
Саратовский государственный аграрный
университет им. Н.И.Вавилова

(72) Изобретатель: Норицина М.В.,
Ключкова И.Н., Суслова Т.А., Барадачева
В.М., Лобачев Ю.В., Ткаченко О.В., Дьячук
Т.И., Семенова Н.Н., Титов В.Н.

(73) Патентообладатель:
Саратовский государственный аграрный
университет им. Н.И.Вавилова

(54) ТЕТРАГИДРАТ(+)ГИДРОТАРТРАТА(+)ЦИС-[2S,5R-1,5-ДИМЕТИЛ-2-(1-ОКСИ-3-ПРОПИЛ)]-
ПИРРОЛИДИНИЯ, ПРОЯВЛЯЮЩИЙ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКУЮ И РОСТОРЕГУЛИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ

(57) Реферат:
Описывается тетрагидрат
(+)-гидротартрата (+)-цис-[2S,
5R-1,5-диметил-2-(1-окси-3-пропил)]
-пирролидиния, проявляющий
морфогенетическую и рострегулирующую
активность. Технический результат

заключается в увеличении длины
колеоптилей проростков пшеницы, в
регенерирующей способности каллусов
мягкой пшеницы, а также в повышении
урожайности и устойчивости к болезням ряда
овощных культур. 12 табл.

RU ? 1 8 6 7 6 8 C 1

R U
2 1 8 6 7 6 8
C 1

АКТ
о внедрении результатов НИОКР

Мы, нижеподписавшиеся, представитель Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН), руководитель ИБФРМ РАН – Матора Лариса Юрьевна, с одной стороны и представитель Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» (ФГБОУ ВО Вавиловский университет), проректор по научной и инновационной работе – Денисов Константин Евгеньевич, с другой стороны, составили настоящий акт о том, что в результате проведения совместных исследований в рамках договоров о творческом сотрудничестве получены следующие результаты:

1. Обнаружено, что пролиферативный антиген инициальных клеток (ПАИ) может служить маркером морфогенетической активности соматических тканей пшеницы.
2. Установлена способность липополисахаридов (ЛПС) бактерий *Azospirillum baldaniorum* Sp245, *A. brasiliense* Sp7 и *A. lipoferum* SR65 стимулировать морфогенетические процессы в соматических тканях пшеницы. Эффективность ЛПС штаммов *Azospirillum* spp. зависит от особенностей строения полисахаридов.
3. Из корней картофеля выделены штаммы ризосферных бактерий *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2, *Ochrobactrum* sp. T1Kr02, *Kocuria rosea* T1Ks19, *Ensifer adhaerens* T1Ks14, обладающие рост-стимулирующей активностью по отношению к растениям. Штаммы внесены в коллекцию ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru/>).

Результаты исследований используются для решения научных и производственных задач различного уровня.

Представитель ИБФРМ РАН
Руководитель ИБФРМ РАН



Л.Ю. Матора
«07» *Матора*
2025 г.
М.П.

Представитель ФГБОУ ВО
Вавиловский университет
Проректор по НИР

«07» *Денисов*
2025 г.
М.П.





**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ АГРАРНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ЮГО-ВОСТОКА»**

Адрес: 410010, Россия, г. Саратов, ул. Тулайкова, 7

Тел.: (8452) 64-77-39; факс: (8452) 64-76-88

e-mail: raiser_saratov@mail.ru

http://www.arisarsar.ru

09.10.25 № *17/497*

На № _____ от _____

Акт

о внедрении результатов диссертационного исследования Ткаченко О.В. на тему «Применение ризосферных бактерий рода Azospirillum и липополисахаридов их клеточных стенок для стимулирования морфогенеза пшеницы и картофеля в культуре соматических тканей *in vitro*» в научно-производственный процесс ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока»

В федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока» внедрены результаты диссертационного исследования заведующей кафедрой «Растениеводство, селекция и генетика» ФГБОУ ВО Вавиловский университет Ткаченко Оксаны Викторовны по теме «Применение ризосферных бактерий рода Azospirillum и липополисахаридов их клеточных стенок для стимулирования морфогенеза пшеницы и картофеля в культуре соматических тканей *in vitro*» в научно-исследовательскую работу лаборатории клеточной селекции:

- использованы данные о свойствах пары почти изогенных сестринских линий мягкой пшеницы сорта Саратовская 29, альтернативных по генам короткостебельности Rht-B1c, использоваться в качестве модели при изучении морфогенетической активности каллусных клеток;

- использованы данные о маркерных свойствах белка пролиферативного антигена инициальных клеток (ПАИ).

Директор ФГБНУ
«ФАНЦ Юго-Востока»
к.с.-х.н.

С.Н. Гапонов



Главный научный сотрудник
лаборатории клеточной селекции,
д-р биол. наук

Т.И. Дьячук



« УТВЕРЖДАЮ »
Ректор ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ
 О.Н. Кухарев
 2025 г.
01052025

АКТ

о внедрении результатов диссертационного исследования Ткаченко О.В. на тему «Применение ризосферных бактерий рода Azospirillum и липополисахаридов их клеточных стенок для стимулирования морфогенеза пшеницы и картофеля в культуре соматических тканей *in vitro*» в научно-образовательном процессе ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ

В научно-образовательном центре селекции и семеноводства картофеля (НОЦ СиСК) ФГБОУ ВО «Пензенский государственный аграрный университет» внедрены результаты диссертационного исследования заведующей кафедрой «Растениеводство, селекция и генетика» ФГБОУ ВО Вавиловский университет Ткаченко Оксаны Викторовны по теме «Применение ризосферных бактерий рода Azospirillum и липополисахаридов их клеточных стенок для стимулирования морфогенеза пшеницы и картофеля в культуре соматических тканей *in vitro*».

В научно-исследовательской и образовательной деятельности НОЦ СиСК:

- используются методы оздоровления посадочного материала селекционных линий картофеля;
- внедрены методы микроклонального размножения селекционных линий и оригинального семенного материала картофеля;
- результаты исследований используются для совершенствования методов и повышения результативности научно-исследовательских работ повышения уровня, эффективности и качества подготовки специалистов агропромышленного производства, формирования у них современных профессиональных компетенций и научно-практических навыков.

Руководитель НОЦ СиСК,
канд. с.-х. наук

А.А. Кабунин

Акт
о внедрении НИОКР в производство

В крестьянском (фермерском) хозяйстве ИП глава КФХ Щеренко Павел Юрьевич в 2018-2020 гг. были проведены производственные испытания результатов научно-исследовательской работы доцента кафедры «Растениеводство, селекция и генетика» ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ, канд. с.-х. наук Ткаченко Оксаны Викторовны по семеноводству картофеля, произведенного по оригинальной технологии оздоровления посадочного материала на основании микроклонального размножения в культуре *in vitro*. Представленные мини-клубни картофеля обеспечили высокое качество посадочного материала и повышение рентабельности производства в среднем не менее, чем на 30%.



Глава КФХ ИП глава КФХ Щеренко П.Ю.

П.Ю. Щеренко

Главный агроном

КФХ ИП глава КФХ Щеренко П.Ю.

Ю.В. Суров

«16» ноябрь 2020 г.



Акт
о внедрении результатов диссертационного исследования Ткаченко О.В. на
тему «Применение ризосферных бактерий рода Azospirillum и
липополисахаридов их клеточных стенок для стимулирования морфогенеза
пшеницы и картофеля в культуре соматических тканей *in vitro*» в научном и
образовательном процессе ФГБОУ ВО Вавиловский университет

Результаты диссертационного исследования О.В. Ткаченко используются в учебном процессе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» при чтении курса по дисциплине «Сельскохозяйственная биотехнология» для обучающихся по направлению 35.03.04 «Агрономия» направленности (профиля) «Агрономия», «Защита растений и фитосанитарный контроль», «Селекция и семеноводство сельскохозяйственных культур», по дисциплинам «Биотехнологические методы в селекции и семеноводстве», «Клеточная селекция», «Биоинженерия» для обучающихся по направлению 35.04.04 «Агрономия» направленностям (профилям) «Инновационные технологии в селекции и семеноводстве» и «Генетика и селекция растений», а также по дисциплинам «Биотехнология», «Биоинженерия» и «Биологические препараты в растениеводстве» для обучающихся по направлению 35.04.04 «Агрономия» направленности (профилю) «Агробиотехнология».

В рамках проведения исследований по теме диссертации проводилась научно-исследовательская работа студентов, материалы которой легли в основу выпускных квалификационных работ.

Результаты исследований использованы при создании и поддержании коллекции оздоровленного посадочного материала картофеля.

Директор Института генетики и агрономии
Канд. с-х. наук

Н.В. Рязанцев