

На правах рукописи

Ткаченко Оксана Викторовна

**БАКТЕРИИ РОДА *AZOSPIRILLUM* И ИХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДЫ
КАК ФАКТОР СТИМУЛИРОВАНИЯ МОРФОГЕНЕЗА ПШЕНИЦЫ И
КАРТОФЕЛЯ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ *IN VITRO***

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора сельскохозяйственных наук

Саратов – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н. И. Вавилова» (ФГБОУ ВО Вавиловский университет)

Научный консультант: Лобачев Юрий Викторович, доктор сельскохозяйственных наук, профессор

Официальные оппоненты: Широких Ирина Геннадьевна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого»

Калашникова Елена Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

Маркова Юлия Александровна, доктор биологических наук, ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский университет науки и технологий»

Защита состоится «___» _____ 2026 года в ____⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета 35.2.035.01 на базе ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н. И. Вавилова» по адресу: 410005, Саратов, ул. Соколова, 335, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО Вавиловский университет и на сайте www.vavilovsar.ru

Отзывы направлять по адресу: 410012, г. Саратов, проспект им. Петра Столыпина, зд. 4, стр.3, ученому секретарю диссертационного совета, эл. почта: nkichemazova@inbox.ru

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Кичемазова Наталья Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Биотехнологии на основе культуры клеток и тканей растений *in vitro* широко применяются в современных фундаментальных и прикладных исследованиях (Bednarek, Orłowska, 2020; Pérez-Molina et al, 2025). 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 (Zulkarnain et al., 2015). 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 клонального микроразмножения (микроразмножения) *in vitro* (Смирнова, Подолян, 2024). Для многих вегетативно размножаемых сельскохозяйственных культур, в первую очередь для картофеля, этот метод стал основой современного семеноводства (ГОСТ 33996-2016; ГОСТ Р 59551-2021).

Метод культивирования клеток и тканей растений *in vitro* постоянно совершенствуется в отношении различных видов растений и задач культивирования (Fehe'g et al., 2003; Ochatt, 2004; Круглова и др., 2021). 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. Эмбриогенез и органоогенез в культуре соматических клеток, базирующиеся на свойстве тотипотентности, индуцируются различными стрессовыми факторами культивирования. Важнейшее влияние на эффективность культивирования клеток и тканей растений *in vitro* имеет генотип растения и тип экспланта (Bennaseur, 2000; Nasircilar et al., 2006; Wang et al., 2018). Огромное внимание исследователей привлечено к изучению закономерностей генетического регулирования процессов морфогенеза и поиску маркерных генов (Лутова, 2016).

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 (Копертех, Бутенко, 1995; Михальская и др., 2009; Zang et al., 2001; Walther, 2022). В качестве физических факторов воздействия используют температуру, освещенность, некоторые виды излучений (Фадеев и др., 2008; Salyaev et al., 2001; George et al., 2008; Ferreira et al., 2016; Batista et al., 2018).

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 (Дунаева, Оследкин, 2015). При этом способность ризосферных бактерий (plant growth-promoting bacteria, PGPB) стимулировать рост растений в естественных условиях хорошо известна (Soumare et al., 2021). 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 (Каляева и др. 2003; Широких и др. 2010, 2024; Visser-Tenyenhuis et al., 1994; Lim et al., 2016) и повышают способность к адаптации регенерантов к условиям *ex vitro* (Zaharchenko et al., 2012). При этом опыт бактериализации соматических клеток растений *in vitro* живыми бактериями чаще неудачен, так как вызывает контаминацию культуры и/или фитотоксический эффект (Ильчуков, 2012). Сообщалось, что инокуляция *in vitro* бактериями рода *Azospirillum* приводит в условиях *in vitro* к усилению роста и развития растений картофеля (Volkogon et al., 2006), базилика (Gonzalez et al., 2024) и к улучшению акклиматизации фруктовых растений в условиях *ex vitro* (Vettori et al., 2010).

Имеются сведения о том, что отдельные компоненты микробных клеток, такие как хитин, пептидогликан (PGN), липополисахариды (ЛПС) и метаболит бактерий ризобияльный фактор клубнеобразования (Nod-factor), способны выступать в роли сигнальных молекул, вызывающих иммунные или симбиотические ответные реакции растений (Antolin-Llovera et al., 2012; Erbs, Newman, 2012). Установлено, что ЛПС наружной мембраны ассоциативных бактерий рода *Azospirillum*, являющийся одним из мажорных компонентов клеточной поверхности грамотрицательных бактерий, проявляет высокую активность в контактных взаимодействиях с корнями растений (Fedonenko et al., 2001) и принимает участие в процессах, индуцирующих ответные реакции растений на эти взаимодействия (Evseeva et al., 2011). При этом, бактерии данного рода хорошо известны как стимулирующие рост растений ризобактерии и являются модельными при изучении растительно-микробных взаимодействий (Pereg et al., 2016). 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 морфогенеза 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 гнотобионтного к голобионтному способу культивирования клеток и тканей растений *in vitro*. Показана возможность и условия создания и активного функционирования 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 клонального 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 микропартнеры 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 (клональное 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 тканях гормонов, компонентов системной устойчивости и уровня относительной транскрипции генов.

Все эксперименты проводились в соответствии с требованием соблюдения принципа единственного различия и рендомизированных 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 «Стрессовые белки растений» (Иркутск, 2004); 9-ой Международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 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 продукционного процесса культурных растений» (Чернигов, 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 Беларуси)» (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 проводились 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

На основании широкого круга литературных источников проведен анализ исторического контекста и современного состояния метода культуры соматических тканей *in vitro*. Рассмотрены способы регуляции морфогенеза и показано, что биологические агенты крайне редко применяются для повышения эффективности культур растительных клеток и тканей. Описаны основные проблемы и перспективы использования ризосферных бактерий и компонентов их клеток для совершенствования агробиотехнологий на основе клеточных и тканевых культур растений.

Собственные исследования

Материалы и методы исследований

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 (созданные профессором Ю.В. Лобачевым), а также микрорастения районированных и перспективных сортов картофеля отечественной (Невский, Жуковский ранний) и иностранной селекции (Кондор, Розара, Аврора, Ред Скарлетт) из *in vitro*-коллекции кафедры «Растениеводство, селекция и генетика» ФГБОУ ВО Вавиловский университет. В качестве микропартнеров для создания растительно-микробных ассоциаций использованы ризосферные рост-стимулирующие бактерии (*Azospirillum baldaniorum* Sp245 (до 2020 года *A. brasilense* Sp245 (Ferreira et al., 2020)), *A. brasilense* sp7^T, SR55, SR75; *A. lipoferum* SR65; *Escherichia coli* K12; *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 и др. из коллекции ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ ФИЦ СЦ РАН) (г. Саратов, Россия) № 1021 (WDCM – World Data Centre for Microorganisms) (<http://collection.ibppm.ru>). Липополисахариды клеточных стенок ризосферных бактерий предоставлены сотрудниками ИБФРМ ФИЦ СЦ РАН старшим научным сотрудником лаборатории иммунохимии Бурыгиным Г.Л. и заведующей лабораторией биохимии Федоненко Ю.П.

Эксперименты проведены по стандартным методикам культивирования каллусов и клональному микроразмножению растений на этапах *in vitro* и *ex vitro* (Бутенко, 1999; Авксентьева, Петренко, 2011). Содержание молекулярного маркера меристематических клеток пшеницы – пролиферативного антигена инициалей (ПАИ) изучалось по методике (Евсеева, 1993; Евсеева и др., 2007). Влияния липополисахаридов бактерий на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы использовали методики (Fedonenko et al., 2005; Fedonenko et al., 2008; Boyko et al., 2011). Анатомио-морфологическая оценка каллусов проводилась с использованием методов световой микроскопии (Паушева, 1988). Инокуляция микрорастений картофеля бактериями проводилась по оригинальной методике. Влияние бактерий на микрорастения оценивали по комплексу морфологических и физиолого-биохимических признаков (Ткаченко и др., 2021). Содержание гормонов в корнях и листьях микрорастений проводили в ФГБУН Уфимский институт биологии УФИЦ РАН (Veselov, 1992; Kudoyarova, 2014; Vysotskaya, 2017; Veselov, 2018). Каллозу в листьях и корнях микрорастений картофеля определяли методом окрашивания анилиновым синим (Millet et al., 2010). Для идентификации бактерий в составе растительно-микробных ассоциаций использовались иммунохимические методы с использованием поликлональных моноспецифических кроличьих антител к О-антигенам штаммов (Matora et al., 1998). Экспрессию генов растений изучали методом обратной

транскрипции РНК с последующим ПЦР в реальном времени и оценкой относительного уровня экспрессии по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Статистическую оценку результатов проводили математическими методами однофакторного и многофакторного дисперсионного анализа со сравнением частных средних по тесту Дункана с использованием пакета программ статистического и биометрико-генетического анализа в растениеводстве и селекции AGROS версия 2.10 (Мартынов, 1999-2000) и программы Statistica 6 (StatSoft). Для качественных показателей достоверность различий оценивали методами вариационной статистики альтернативных (двояковозможных) признаков при уровне значимости $p = 0,05$ или $p = 0,01$ на основе критерия Стьюдента t_{05} или t_{01} и стандартного отклонения $s = [p(1-p)]^{1/2}$ (Доспехов, 1985).

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

Скрининг набора изогенных сестринских линий, альтернативных по генам короткостебельности *Rht-B1b*, *Rht-B1c*, *Rht-14*, *s1*, *Q*, созданных в генотипе сорта мягкой пшеницы Саратовская 29 (Лобачев, 2000) в культуре пыльников и соматических тканей *in vitro* показал, 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 морфогенных каллусов с зонами меристематической активности и растений регенерантов (Рисунок 1).

Была выявлена связь между морфогенетическим потенциалом каллусных клеток и содержанием в них белка пролиферативного антигена инициалей (ПАИ), являющегося молекулярным маркером меристематических клеток пшеницы. 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 линии, описываемой уравнением типа $Y = a + b_1x + b_2x^2 + b_3x^3$. Для исследуемых 11 генотипов получено следующее усредненное уравнение кривой линии:

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

Показано достоверное различие в увеличении содержания ПАИ по сравнению с высокорослым sibом у низкорослой линии с аллелем *RhtB1c* (Рисунок 2).

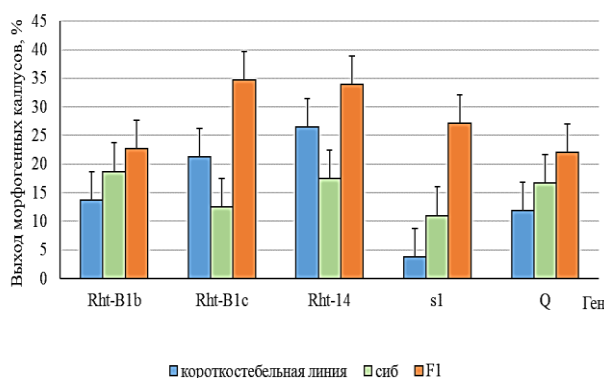


Рисунок 1 – Влияние генов короткостебельности в гомо- и гетерозиготном состоянии на выход морфогенных каллусов в культуре соматических каллусов мягкой пшеницы *in vitro*

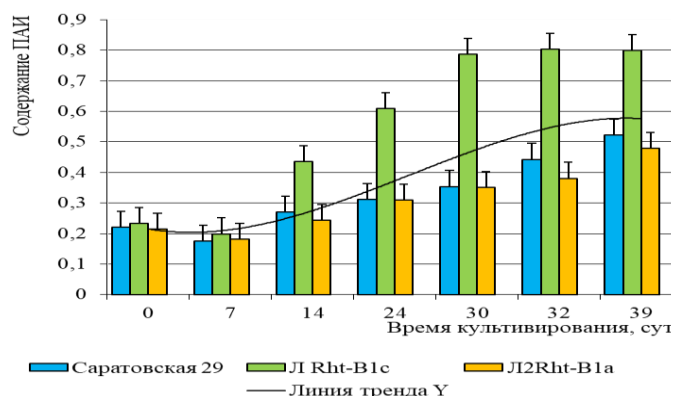


Рисунок 2 – Динамика содержания ПАИ в соматических каллусах сорта яровой мягкой пшеницы Саратовская 29 и почти изогенных сестринских линий, альтернативных по гену *Rht-B1c*

В результате проведенных исследований установлено, что наиболее альтернативной 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 тетрагидрат(+)-гидротартрата(+)-дис-[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*.

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

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

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*.

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 1 мл суспензии. Для инокуляции использовались ризосферные бактерии рода *Azospirillum*: *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* sp7, *A. brasilense* SR88, *A. brasilense* SR80. Было установлено, что данные штаммы не растут на питательной среде Л-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. 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 бактерий распространялось вокруг каллусов, что можно объяснить выделением каллусами метаболитов в питательную среду, которые использовались бактериями для питания.

Инокуляция каллусов на 10-е сутки культивирования эксплантов также не дала положительного эффекта. Несмотря на то, что каллусная ткань уже начала формироваться к 10-ым суткам, инокуляция бактериями, как и при инокуляции на 0-е сутки, приводила к некрозу тканей. На 30 сутки не было обнаружено ни одного жизнеспособного каллуса. В то же время в контроле 100% эксплантов формировали каллус, часть их которых были морфогенными. Использование раствора антибиотика канамицина в концентрации 100 мкг/мл приводило к освобождению растительных тканей от бактерий, каллусы не погибали. Наблюдалось частичное восстановление роста каллусов (75-90%), но морфогенетические процессы угнетались, меристематические очаги не формировались, и регенерация растений не происходила.

Бактериальные клетки штамма *A. brasilense* sp7 были убиты нагреванием до 100 °С и использованы для инокуляции эксплантов параллельно с живыми бактериями того же штамма. Анализ каллусных культур показал, что в варианте с убитыми клетками фитотоксический эффект отсутствовал (Таблица 1), 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%). 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%. При этом у высокорослого сибма выход регенерантов от числа морфогенных каллусов достоверно увеличивался по сравнению с контролем и линией JRht-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 1 – Влияние бактериальных клеток *A. brasilense* sp7 (10^6 клеток/мл) на каллусогенез и выход регенерантов в каллусах пшеницы сестринских линий JRht-B1c и JRht-B1a

Вариант	Генотип	Количество эксплантов	Выход каллусов,		Выход морфогенных каллусов,			Выход регенерантов,		
			шт.	%	шт.	% от эксплантов	% от каллусов	шт.	% от эксплантов	% от морфогенных каллусов
Контроль	JRht-B1c	540	526	99,4±0,6	84	15,6±3,1	16,0±3,2	25	4,63±1,8	29,8±9,8
	JRht-B1a	582	570	97,9±1,2	67	11,5±2,6	11,8±2,7	10	1,72±1,06	14,9±8,6
Живые клетки	JRht-B1c	200	0	0	-	-	-	-	-	-
	JRht-B1a	200	0	0	-	-	-	-	-	-
Убитые клетки	JRht-B1c	140	140	100	32	22,9±7,0*	22,9±7,0	4	2,86±2,8*	12,5±11,5
	JRht-B1a	140	138	98,6±2,0	19	13,6±5,7	13,8±5,8	7	5,00±3,6*	36,8±21,8

Примечание – «*» варианты достоверно отличающиеся от контроля.

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. 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.

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

В данной работе впервые был изучен эффект ЛПС азоспирилл на формирование и морфогенез каллусов пшеницы. Изучалось влияние ЛПС бактерий в составе индукционной питательной среды Линсмайера-Скуга (Л-С). Контролем во всех экспериментах служила среда Л-С без дополнительных компонентов.

Влияние ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 изучалось в трех концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл. Установлено, что в контроле частота формирования морфогенных каллусов составляла у обеих линий менее 20% от количества инокулированных эксплантов (Таблица 2). Введение в состав среды ЛПС в целом повышало активность морфогенетических процессов. Статистически достоверное превышение выхода каллусов с очагами меристематической активности наблюдалось у короткостебельной линии, на среде при добавлении ЛПС в любой концентрации.

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 соответственно на 12 и 10%. Кроме того, 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.

Таблица 2 – Влияние ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 на морфогенез в культуре соматических тканей

Вариант среды	Генотип	Общий выход каллусов, % от эксплантов		Выход морфогенных каллусов, % от эксплантов		Выход регенерантов, % от эксплантов	
		по варианта м	в сред. по факт. В	по вари-антам	в сред. по факт. В	по вари-антам	в сред. по факт. В
Конт-роль	ЛRht-B1c	94,9	96,2	17,1 ab	15,6a	10,9 d	6,6a
	ЛRht-B1a	97,5		14,1 a		2,2 a	
ЛПС 1 мкг/мл	ЛRht-B1c	98,0	96,1	26,5 bc	26,6c	6,6 abcd	5,3a
	ЛRht-B1a	94,1		26,7 bc		4,0 ab	
ЛПС 10 мкг/мл	ЛRht-B1c	100,0	100,0	29,7 c	27,2c	8,4 bcd	6,3a
	ЛRht-B1a	100,0		24,6 bc		4,1 ab	
ЛПС 100 мкг/мл	ЛRht-B1c	95,4	97,7	26,1 bc	23,2b	10,8 cd	9,2b
	ЛRht-B1a	100,0		20,3 abc		7,5 bcd	
в сред. по факт. А	ЛRht-B1c	97,1		24,9		9,2	
	ЛRht-B1a	97,9		21,4		8,9	
F _{факт.} (по вариантам)		0,6		3,8*		5,2*	
НСР _{0,05}		-		8,6		4,3	
F _{факт.} (по фактору А)		1,8		1,6		3,1	
НСР _{0,05} А		-		-		-	
F _{факт.} (по фактору В)		0,7		4,4*		8,8*	
НСР _{0,05} В		-		6,1		3,0	
F _{факт.} (взаимодействие АВ)		0,3		4,0*		2,3	
НСР _{0,05} АВ		-		8,6		-	

Примечание – «*» F_{факт.} ≥ F_{теор.}; фактор А – генотип, фактор В – вариант среды; разными буквами латинского алфавита (a, b, c, d) обозначено ранжирование данных по тесту Дункана.

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 (Рисунок 3). Это обусловлено увеличением очагов или локусов меристематической активности в тех же самых зонах, что ранее наблюдались в контрольных вариантах исследуемых генотипов.

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.

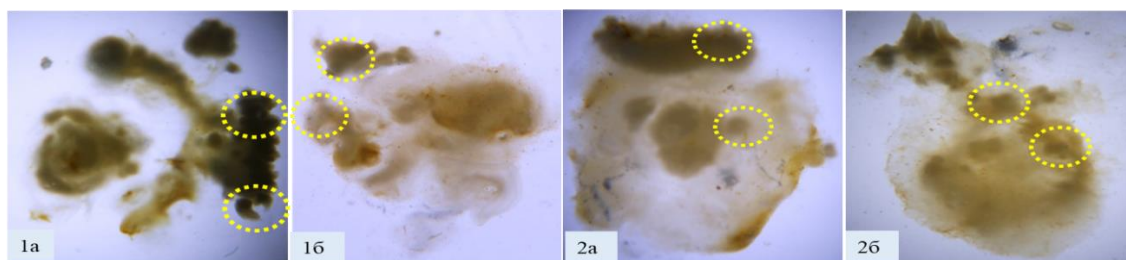


Рисунок 3 – Морфологическое состояние структурных компонентов целых зародышей исследуемых линий пшеницы на 21 день культивирования, контроль:

1. – контроль; 2. – ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 10 мг/л; а – низкорослая линия; б – высокорослая линия;  – эмбриониды

Для установления роли структуры ЛПС были проведены исследования роли О-антигена, как наиболее гетерогенной части ЛПС, в стимулировании морфогенеза в культуре соматических каллусов пшеницы. В опытных вариантах в стандартную среду вводили ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 и энтеробактерий штамма *E. coli* K12 в концентрации 10 мкг/мл. В контрольных вариантах частота формирования морфогенных каллусов составляла у обеих линий менее 20% от количества обработанных ЛПС эксплантов. 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 %. Обладая 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. 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. Отсутствие положительного влияния ЛПС *E. coli* K-12 на вторичную дифференциацию и регенерационную способность каллусных клеток пшеницы позволил предположить, что этот эффект может определяться именно полисахаридной частью молекулы ЛПС.

Было проведено сравнение действия препаратов ЛПС, выделенных из клеток трёх штаммов рода *Azospirillum* (*A. brasilense* SR55, SR75 и *A. lipoferum* SR65), различающихся по химической структуре повторяющихся звеньев их О-полисахаридов. Данные штаммы относятся к трем разным серогруппам: *A. brasilense* SR75 (серогруппа I), *A. brasilense* SR55 (серогруппа II), и *A. lipoferum* SR65 (серогруппа III). Их О-полисахариды имеют различающееся химическое строение повторяющихся звеньев. ЛПС штамма *A. brasilense* SR75 имеет умеренное содержание углеводов и формирует мицеллы диаметром 31 нм со средним дзета-потенциалом. ЛПС штаммов *A. brasilense* 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. brasilense* 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.

Выявлено достоверное повышение выхода каллусов из эксплантов обеих линий пшеницы при действии ЛПС штаммов *A. brasilense* SR55 и *A. lipoferum* SR65 (Таблица 3) относительно соответствующих контрольных вариантов. Выход морфогенных каллусов повышался в присутствии ЛПС штаммов *A. brasilense* 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. brasilense* SR75, выход каллусов и выход морфогенных каллусов не отличались (при $P = 0.05$) от контрольных вариантов обеих линий пшеницы.

Таблица 3 – Влияние ЛПС штаммов *A. brasilense* SR75, SR55, *A. lipoferum* SR65 (10 мг/л) на общий выход каллусов в культуре соматических тканей пшеницы

Генотип Вариант	LRht-B1c		LRht-B1a	
	Количество эксплантов, шт.	Выход каллусов, %	Количество эксплантов, шт.	Выход каллусов, %
Контроль	1025	98,4±0,8	1022	97,7±0,9
ЛПС <i>A. brasilense</i> SR75	200	99,5±1,0	200	99,0±1,4
ЛПС <i>A. brasilense</i> SR55	153	100*	171	100*
ЛПС <i>A. lipoferum</i> SR65	345	100*	351	99,7±0,6*

Примечание – «*» варианты достоверно отличающиеся от контроля.

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. brasilense* SR75 и в 1,8 раза в варианте с использованием ЛПС *A. lipoferum* SR65 (Таблица 4).

Таблица 4 – Влияние ЛПС штаммов *A. brasilense* SR75, SR55, *A. lipoferum* SR65 (10 мг/л) на выход регенерантов из морфогенных каллусов в культуре соматических тканей пшеницы

Генотип Вариант эксперимента	LRht-B1c		LRht-B1a	
	Количество морфогенных каллусов, шт.	Выход регенерантов, %	Количество морфогенных каллусов, шт.	Выход регенерантов, %
Контроль	126	30,2±8,1	97	16,5±7,5
ЛПС <i>A. brasilense</i> SR75	19	26,3±21,1	21	42,9±22,5
ЛПС <i>A. brasilense</i> SR55	33	30,3±16,3*	40	20,0±12,8
ЛПС <i>A. lipoferum</i> SR65	67	41,8±12,0*	69	30,4±11,1

Примечание – «*» варианты достоверно отличающиеся от контроля.

ЛПС *A. brasilense* 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. 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.

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. 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 JRht-B1a регенерационная способность увеличивалась на достоверном уровне. В остальных вариантах различия между выходом регенерантов были незначительные.

Далее было исследовано влияние ЛПС трех видов ризобактерий, относящихся к другим таксономическим видам: *Ensifer adhaerens* T1Ks14, *Ochrobactrum quorumnogens* T1Kr02 и *Pseudomonas chlororaphis* K3. Анализ результатов показал, что препараты ЛПС трёх ризосферных штаммов по-разному действовали на культуру тканей пшеницы (Таблица 5).

Таблица 5 – Влияние бактериальных ЛПС (10 мкг/мл) на морфогенетическую активность каллусов и выход растений-регенерантов мягкой пшеницы линии JRht-B1a

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

Примечание – «*» варианты достоверно отличающиеся от контроля.

Выход каллусов из эксплантов, полученных из незрелых зародышей, достоверно увеличивался на 2,5% при действии ЛПС штамма *O. quorumnogens* 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 *A. baldaniorum* Sp245 и *A. lipoferum* SR65. Развитие растений-регенерантов во всех вариантах было примерно одинаковым – выход составлял 40-45% от числа морфогенных каллусов. Исключение составляли каллусы, пересеженные со среды, содержащей на первом этапе культивирования ЛПС штамма *O. quorumnogens* 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 свидетельствуют 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. quorumnogens* T1Kr02 и *P. chlororaphis* K3, содержащих остатки фукозы (6-дезоксисахар) и аminosахаров 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. brasilense* sp 7, *A. lipoferum* SR65 и *E. adhaerens* T1Ks14 в концентрации 10 мг/л.

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

Изучение влияния ризосферных бактерий на микроклоны картофеля в культуре in vitro

Влияние на морфометрические признаки микрорастений и продуктивность мини-клубней

На первом этапе данного исследования была поставлена задача изучения возможности инокуляции микрорастений 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 микрорастения картофеля сорта Кондор. Инокуляцию микрорастений, культивируемых на жидкой среде Мурасиге и Скуга (1962) без гормонов, проводили на 0 сутки после микрочеренкования суспензией бактерий, содержащей 10^5 или 10^7 клеток в мл питательной среды. Не наблюдалось видимой контаминации культуры и фитотоксичного действия бактерий. Установлено положительное влияние азоспирилл на митотическую активность клеток корневых меристем картофеля. Митотический индекс клеток корня картофеля увеличивался в 1,8 раза. Методом иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием специфических антител к штамму *A. baldaniorum* Sp245 были обнаружены скопления бактерий на корнях картофеля, главным образом, в зоне кончика корня и в зоне корневых волосков (Рисунок 4).

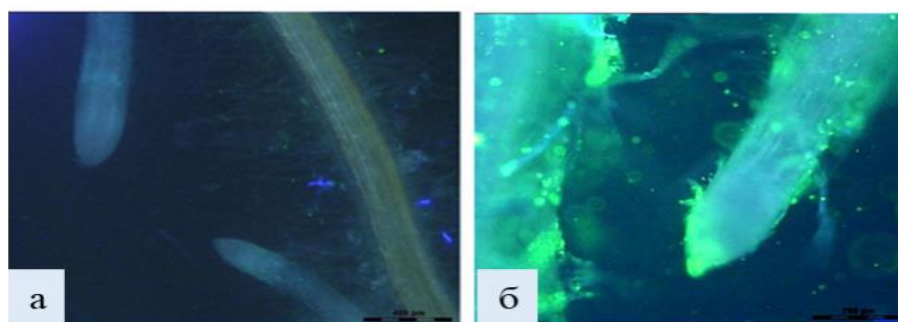


Рисунок 4 – Обнаружение бактерий *A. baldaniorum* Sp245 на корнях картофеля с использованием флуоресцентной микроскопии и специфических антител к ЛПС данного штамма: в контроле (а) и опыте (б)

В серии экспериментов инокуляция микрочеренков картофеля проводилась при посадке (на 0 сутки) двумя штаммами *A. brasilense* 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 (Таблица 6).

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. На рост корней положительное влияние инокуляции бактериями обнаружено на 20 сутки культивирования. Причем, количество корней увеличивалось в варианте с инокуляцией *A. brasilense* sp7 в концентрации 10^7 , а длина – при инокуляции обоими штаммами, но в концентрации 10^5 кл./мл.

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 7).

Таблица 6 – Влияние концентрации суспензии *A. brasilense* sp7 и *A. baldaniorum* Sp245 на мериклоны картофеля сорта Кондор в культуре *in vitro*

Вариант		Длина побега, мм	Количество узлов на побеге, шт.	Количество корней, шт.	Длина корней, мм
Контроль		55,3	5,8a	4,8a	44,0a
sp7	10 ⁵	75,5	6,5ab	4,7a	51,8b
	10 ⁷	61,8	5,3a	6,4b	49,9ab
Sp245	10 ⁵	83,3	7,03bc	4,8a	55,8b
	10 ⁷	70,6	5,9a	4,4a	49,5ab
F _{факт.} (по вариантам)		1,7	6,6*	4,8*	7,6*
НСР _{0,05} (по вариан.)		-	1,2	1,6	7,1

Примечание – «*» F_{факт.} ≥ F_{теор.}; разными буквами латинского алфавита (a, b, c) обозначено ранжирование данных по тесту Дункана. Приведены только средние значения по вариантам опыта, не приведены средние значения по факторам.

Таблица 7 – Влияние инокуляции мериклонов картофеля сорта Кондор суспензией *A. brasilense* 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		67,4c	3,6	3,0a	2,0a	17,1a
sp7	10 ⁵	63,7bc	3,7	3,7b	2,6b	27,9c
	10 ⁷	32,7a	3,8	3,5ab	2,5b	26,9bc
	10 ⁸	63,6bc	3,5	3,4ab	2,9c	26,8bc
Sp245	10 ⁵	42,1ab	3,5	3,7b	2,3ab	22,8b
	10 ⁷	59,4bc	3,5	3,3ab	2,7bc	24,6b
	10 ⁸	52,3ab	3,5	3,9b	2,6bc	28,1c
F _{факт.}		4,0*	1,1	8,3*	3,3*	5,3*
НСР _{0,5}		22,9	-	0,6	0,4	2,5

Примечание – «*» F_{факт.} ≥ F_{теор.}; разными буквами латинского алфавита (a, b, c) обозначено ранжирование данных по тесту Дункана. Приведены только средние значения по вариантам опыта, не приведены средние значения по факторам.

Было установлено, что в двух вариантах инокуляции штаммами *A. brasilense* sp7 (10⁷) и *A. baldaniorum* Sp245 (10⁵) 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. brasilense* 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.

Азоспириллы не утилизируют сахарозу из питательной среды для культивирования микрорастений и не вызывают контаминацию культуры *in vitro*. Для сравнения были использованы бактерии штамма, способного использовать в качестве углеводов сахарозу, а именно *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2.

Микрорастения картофеля сорта Невский, культивируемые на питательной среде М-С с добавлением агар-агара 7 г/л, инокулировали штаммами *A. brasilense* sp7 и *O. cytisi* IPA7.2. Бактериальные суспензии были добавлены в среду культивирования микрорастений (10⁶ 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. Штамм *A. brasilense* sp7 не вызывал помутнение среды культивирования растений на всём протяжении эксперимента *in vitro*, идентифицировался только на корнях растений иммунохимическими методами и не обнаруживался в питательной среде. Штамм *O. cytisi* IPA7.2 через сутки после инокуляции визуально выявлялся характерным помутнением среды культивирования, иммунохимическими методами клетки этих бактерий выявлялись и на корнях микрорастений и в среде культивирования.

При инокуляции ризобактериями штамма *A. brasilense* sp7 микрорастений 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). При инокуляции штаммом *A. brasilense* sp7 на 15 сутки культивирования микрорастений картофеля *in vitro* был выявлен значительно более слабый рост-стимулирующий эффект: достоверное увеличение наблюдалось только в длине побега (+19%) и в количестве корней (+14%). Поэтому для инокуляции микрорастений рост-стимулирующим штаммом *A. brasilense* sp7 наиболее оптимальным был признан вариант с внесением бактерий на стадии черенкования.

Инокуляция микрорастений 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 микрорастения картофеля развивались, но по морфометрическим показателям отставали от стерильных (неинокулированных) микрорастений (на 22% – длина побега; на 52% – длина корня; и на 20% – количество корней). 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). Единственным показателем, для которого было выявлено достоверное ингибирование при инокуляции, была длина корня микрорастений (-8%). Поэтому для штаммов, способных использовать сахарозу питательной среды как источник углерода, более приемлем вариант с инокуляцией в середине цикла культивирования.

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) жидкая среда без агар-агара; б) полужидкая среда с содержанием агар-агара 3,5 г/л; в) твердая среда с содержанием агар-агара 7 г/л. Контролем служили пробирки со стерильными микрорастениями. По результатам средних данных трех экспериментов установлено, что на питательной среде, не содержащей источники азота, как и предполагалось, наблюдается процесс угнетения роста микрочеренков картофеля.

На среде с полным составом макро- и микросолей (Таблица 8) достоверные различия между бактеризованными и стерильными растениями на 20 сутки культивирования наблюдались по количеству узлов на побеге только в одном варианте (с твердой консистенцией среды), по длине побега и количеству корней во всех вариантах и по длине корней на жидкой и полужидкой среде.

Во всех случаях величины показателей у бактеризованных растений превышали аналогичные значения стерильных растений: по количеству узлов на побеге на твердой 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%.

Таблица 8 – Влияние бактерий *A. brasilense* 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	6,5 а	40,3 а	4,6 ab	25,1 а
		опыт	6,9 а	56,3 с	7,1 gh	45,2 bcd
	полужидкая среда	контроль	6,5 а	47,9 b	5,2b	42,9 b
		опыт	7,9 ab	75,1 fgh	7,0 fgh	54,9 e
	твердая среда	контроль	7,4 ab	51,2 bc	4,5 а	45,0 bc
		опыт	9,4 cde	62,7 d	6,6 efgh	50,4 bcde
1/2 MS	жидкая среда	контроль	7,2 ab	53,9 bc	5,3 bc	45,4 bcd
		опыт	7,6 ab	55,3 с	6,4 ef	53,7 cde
	полужидкая среда	контроль	7,2 ab	54,2 bc	6,0 cde	43,4 b
		опыт	8,6 bcd	77,7 h	7,4 h	51,1 bcde
	твердая среда	контроль	9,6 de	75,1 efgh	6,2 de	47,8 bcde
		опыт	10,7 e	75,5 gh	6,4 ef	54,5 de
F _{факт.}			8,3*	41,3*	6,4 *	14,2*
HCP _{0,05}			1,7	8,5	0,9	10,0

Примечание – «*» F_{факт.} ≥ F_{теор.}; разными буквами латинского алфавита (а, b, с, ...) обозначено ранжирование данных по тесту Дункана. Приведены только средние значения по вариантам опыта, не приведены средние значения по факторам.

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%). 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.

Была изучена устойчивость ассоциаций картофеля сорта Невский со штаммами рода *Azospirillum* в условиях *in vitro*. Культуры штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* sp7, S27, SR80 и SR88 были использованы для инокуляции картофеля с последующим клональным 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). 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.

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 9) 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%.

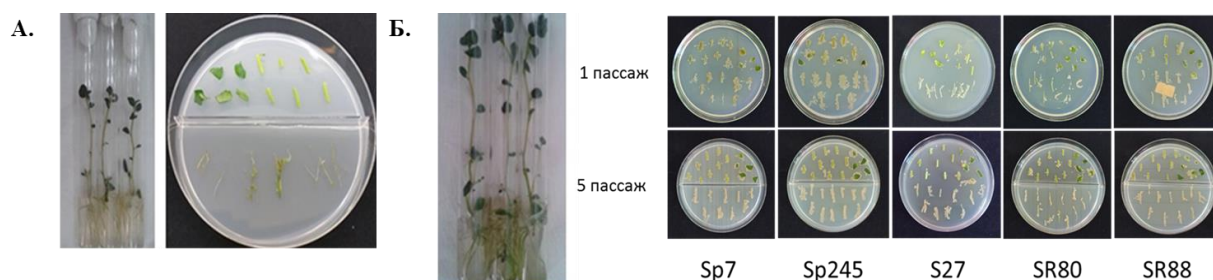


Рисунок 5 – Микробиологический тест наличия бактерий в тканях микрорастений: А. – выращенных стерильно (контроль); Б. – инокулированных в 1 пассаже штаммами бактерий *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* sp7, S27, SR80 и SR88

Таблица 9 – 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	5,7a	6,9a	8,0a	0,6a
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (1 пассаж)	6,3b	7,5b	8,8ab	0,8b
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (5 пассаж)	6,2b	7,3ab	9,3b	0,8b
F _{факт.}	4,9*	3,4*	3,8*	27,1*
НСР _{0,05}	0,4	0,5	1,0	0,1

Примечание – «*» $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{теор.}}$; разными буквами латинского алфавита (a, b) обозначено ранжирование данных по тесту Дункана.

После высадки и выращивания в почве (Таблица 10) 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 10 – 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	6,3a	6,2	1,8b
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (1 пассаж)	21,0b	7,2b	6,6	1,3a
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (5 пассаж)	20,1ab	7,4b	6,2	1,7b
F _{факт.}	5,6*	6,7*	0,4	6,5*
НСР _{0,05}	1,3	0,6	-	0,4

Примечание – «*» $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{теор.}}$; разными буквами латинского алфавита (a, b) обозначено ранжирование данных по тесту 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*.

Далее были проведены исследования влияния активно функционирующей ассоциации микрорастений картофеля четырех сортов (Невский, Кондор, Розара и Аврора) с бактериями *A. baldaniorum* Sp245 в культуре *in vitro* и оценка влияния бактериализации на эффективность адаптации и выращивания растений в условиях *ex vitro*, в том числе продуктивность растений в открытом грунте (Таблица 11).

Таблица 11 – 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 вариантам	в сред. (фактор А)	по вариантам	в сред. (фактор А)	по вариантам	в сред. (фактор А)	по вариантам	в сред. (фактор А)
Кондор	контроль	4,8a	5,4a	38,5	47,2	5,2a	6,2b	48,3cd	51,2c
	опыт	6,3cd		55,9		7,3cde		54,1e	
Аврора	контроль	6,1bcd	6,8d	44,0	48,4	5,0a	6,2ab	37,3a	39,6a
	опыт	7,5f		52,9		7,3de		41,8a	
Невский	контроль	4,9a	5,8b	48,6	51,5	4,8a	5,7a	41,8a	44,5b
	опыт	6,7de		54,4		6,5bcde		47,3bcd	
Розара	контроль	4,8a	6,1c	67,0	70,0	4,9a	6,2ab	41,9a	45,2b
	опыт	7,3ef		72,9		7,4e		48,4d	
в сред. (факт. В)	контроль	5,9a		47,83a		5,9a		44,9a	
	опыт	6,1b		60,7b		6,2b		45,4b	
F _{факт. по вар.}		27,6*		2,3		19,2*		14,6*	
НСР _{0,05 по вар.}		0,7		-		0,9		4,7	
F _{факт. фактор А}		7,9*		5,9*		12,4*		10,3*	
НСР _{0,05 фактор А}		0,1		12,6		0,1		0,4	
F _{факт. фактор В}		56,6*		2,3		43,3*		21,0*	
НСР _{0,05 фактор В}		0,5		-		0,6		3,3	
F _{факт. взаим. АВ}		7,3*		1,1		0,8		13,0*	
НСР _{0,05взаим. АВ}		0,7		-		-		4,7	

Примечание – «*» F_{факт.} ≥ F_{теор.}; фактор А – генотип, фактор В – инокуляция; разными буквами латинского алфавита (a, b, c, ...) обозначено ранжирование данных по тесту Дункана.

Бактеризованные растения всех четырех сортов на 20 сутки культивирования сформировали большее число узлов и корней по сравнению со стерильными побегами. Кроме того, бактеризованные растения сортов Кондор, Розара и Невский превосходили стерильные и по средней длине корней, кроме сорта Аврора.

После 10 суток акклиматизации в почве (*ex vitro*) между бактеризованными и стерильными растениями наблюдались некоторые различия (Таблица 12).

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.

Далее растения высаживали в открытый грунт. В неконтролируемых стрессовых условиях наблюдалась значительная гибель растений от 75 до 88%. 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. 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 13). Этот факт установлен как для всех сортов по отдельности, так и в среднем по генотипам.

Таблица 12 – 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 растении, мм ²	
		по вариантам	в сред. по факт. А	по вариантам	в сред. по факт. А	по вариантам	в сред. по факт. А
Кондор	контроль	11,9de	13,5c	68,7a	72,0a	595,5a	663,8b
	опыт	15,0f		75,3a		732,2ab	
Аврора	контроль	11,1cde	11,7b	96,0b	118,8b	691,5ab	382,3a
	опыт	12,3e		141,7e		73,0ab	
Невский	контроль	7,3a	7,9a	59,9a	62,3a	903,0b	1060,5c
	опыт	8,4ab		64,6a		1218,0c	
Розара	контроль	7,3a	8,0a	133,4de	134,0c	696,9ab	839,7bc
	опыт	8,7bc		134,6cde		982,5bc	
в сред. по факт. В	контроль	9,1a		89,8a		721,7a	
	опыт	11,4b		103,8b		915,9b	
F _{факт.} по вариантам		21,1*		41,8*		6,2*	
НСР _{0,05} по вариантам		1,7		15,2		272,7	
F _{факт.} фактор А		24,4*		13,5*		11,3*	
НСР _{0,05} фактор А		0,8		7,6		136,4	
F _{факт.} фактор В		39,7*		85,1*		9,5*	
НСР _{0,05} фактор В		1,2		10,8		192,8	
F _{факт.} взаимодействие АВ		1,3		7,9*		1,3	
НСР _{0,05} взаимодей. АВ		-		15,2		-	

Примечание – «*» F_{факт.} ≥ F_{теор.}; фактор А – генотип, фактор В – инокуляция; разными буквами латинского алфавита (a, b, c, ...) обозначено ранжирование данных по тесту Дункана.

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. 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. 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*.

Изучались ассоциации картофеля сорта Невский с бактериальными штаммами по отдельности и совместно различных таксономических групп в условиях *in vitro*. Были использованы штаммы *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 и сорт картофеля Невский. Результаты анализа растений в культуре *in vitro* (Таблица 14) показывают стимулирование роста микрорастений штаммами по отдельности и совместно по сравнению с контролем.

Таблица 13 – 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 растения, дм ²		Количество клубней с 1 растения, шт.		Масса клубней с 1 растения, кг		Урожайность клубней, кг с 1 м ²	
		по вариантам	в сред. по факт. А	по вариантам	в сред. по факт. А	по вариантам	в сред. по факт. А	по вариантам	в сред. по факт. А
Кондор	контроль	6,0a	10,6a	7,8a	9,1a	0,3ab	0,4a	2,3b	3,5a
	опыт	15,2b		10,5ab		0,5cd		4,7e	
Аврора	контроль	6,8a	10,7a	11,1ab	14,4b	0,3ab	0,4a	2,8c	5,9ab
	опыт	14,5b		17,8d		0,6cd		9,0f	
Невский	контроль	8,0a	17,0b	6,3a	8,0a	0,3a	0,4a	1,6a	2,6a
	опыт	26,0b		9,8ab		0,4b		3,7d	
Розара	контроль	6,9a	8,6a	14,6c	15,5b	0,7d	0,8b	9,8g	10,4b
	опыт	10,4b		16,4cd		0,8d		11,0h	
в сред. по факт. В	контроль	6,9a		10,4a		0,4a		3,8a	
	опыт	16,5b		13,1b		0,6b		7,1b	
F _{факт.} по вариан.		4,0*		6,9*		9,1*		6,8*	
НСР _{0,05} по вариан.		1,1		4,6		0,2		0,5	
F _{факт.} фактор А		2,3		11,6*		31,3*		12,4*	
НСР _{0,05} фактор А		-		2,3		0,2		3,0	
F _{факт.} фактор В		16,2*		6,4*		12,8*		9,4*	
НСР _{0,05} фактор В		5,6		2,5		0,3		4,8	
F _{факт.} взаимодей. АВ		1,6		1,4		2,4		6,6*	
НСР _{0,05} взаим. АВ		-		-		-		1,2	

Примечание – «*» F_{факт.} ≥ F_{теор.}; фактор А – генотип, фактор В – инокуляция; разными буквами латинского алфавита (a, b, c, ...) обозначено ранжирование данных по тесту Дункана.

Таблица 14 – Анализ морфометрических параметров в ассоциациях картофеля сорта Невский с штаммами *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 в условиях *in vitro*

Вариант	Длина побега, см	Количество узлов, шт.	Количество корней, шт.	Масса растения, г
Контроль	5,7a	6,9a	8,0a	0,6a
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	6,3b	7,5b	8,8ab	0,8c
<i>O. cytisi</i> IPA7.2	6,6b	7,8b	9,7bc	0,8bc
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 + <i>O. cytisi</i> IPA7.2	7,6c	7,6b	9,9c	0,7b
F _{факт.}	16,9*	4,9*	4,8*	12,6*
НСР _{0,05}	0,5	0,5	1,0	0,1

Примечание – «*» F_{факт.} ≥ F_{теор.}; разными буквами латинского алфавита (a, b, c) обозначено ранжирование данных по тесту 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 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 были получены следующие результаты морфометрического анализа (Таблица 15).

Таблица 15 – 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, мг	Сухая масса корней, мг
Контроль	19,0b	6,3a	617bc	182b
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	21,1c	7,2b	527ab	172b
<i>O. cytisi</i> IPA7.2	22,4c	7,7b	473a	133a
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 + <i>O. cytisi</i> IPA7.2	16,9a	7,3b	662c	244c
Ф _{факт.}	17,2*	4,5*	13,856*	22,4*
НСР _{0,05}	1,42	0,7	79	31

Примечание – «*» $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{теор.}}$; фактор А – генотип, фактор В – инокуляция; разными буквами латинского алфавита (a, b, c) обозначено ранжирование данных по тесту Дункана.

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%).

Кроме того, изучалась инокуляция штаммом *A. baldaniorum* Sp245 совместно со штаммами *Enterobacter cloacae* K7 и *Kocuria rosea* T1Ks19 (Таблица 16). Максимальный положительный эффект от ко-инокуляции микрорастений 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 сырая 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 сырая 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%.

Механизмы влияния азоспирилл на микроклоны картофеля при инокулировании *in vitro*

Выявленные эффекты ризобактерий на микрорастения в культуре *in vitro* могут определяться различными факторами влияния. Для изучения влияния бактерий на баланс гормонов в растениях картофеля была проведена оценка содержания ИУК, АБК, зеатина, ИПА

в микрорастениях и питательной среды на 5 сутки после инокулирования растений штаммами *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2. Анализ питательной среды и растений в процессе культивирования с бактериями показал, что в процессе жизнедеятельности бактерии выделяли в культуральную жидкость фитогормоны.

Таблица 16 – 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	6,6a	6,8с	4,6a	1,9a	0,8	0,3	0,1a
<i>A. baldaniorum</i> Sp245+ <i>O. cytisi</i> IPA7.2	8,4bc	4,3a	4,1a	2,4a	0,7a	0,4	0,1a
<i>A. baldaniorum</i> Sp245+ <i>E. cloacae</i> K7	8,9с	4,0a	4,0a	2,5a	0,6a	0,3	0,1a
<i>A. baldaniorum</i> Sp245+ <i>K. rosea</i> Ks19	7,5ab	5,6b	5,6b	3,2b	1,6b	0,3	0,2b
F _{факт.}	8,6*	23,6	12,8	6,9	22,5	0,9	8,2
HCP _{0,05}	1,0	0,8	0,6	0,6	0,3	-	0,02

Примечание – «*» F_{факт.} ≥ F_{теор.}; фактор А – генотип, фактор В – инокуляция; разными буквами латинского алфавита (a, b, c) обозначено ранжирование данных по тесту Дункана.

Из изученных фитогормонов в культуральной жидкости бактерий наиболее высокой была концентрация ИУК. 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. Цитокинины 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 (Рисунок 6).

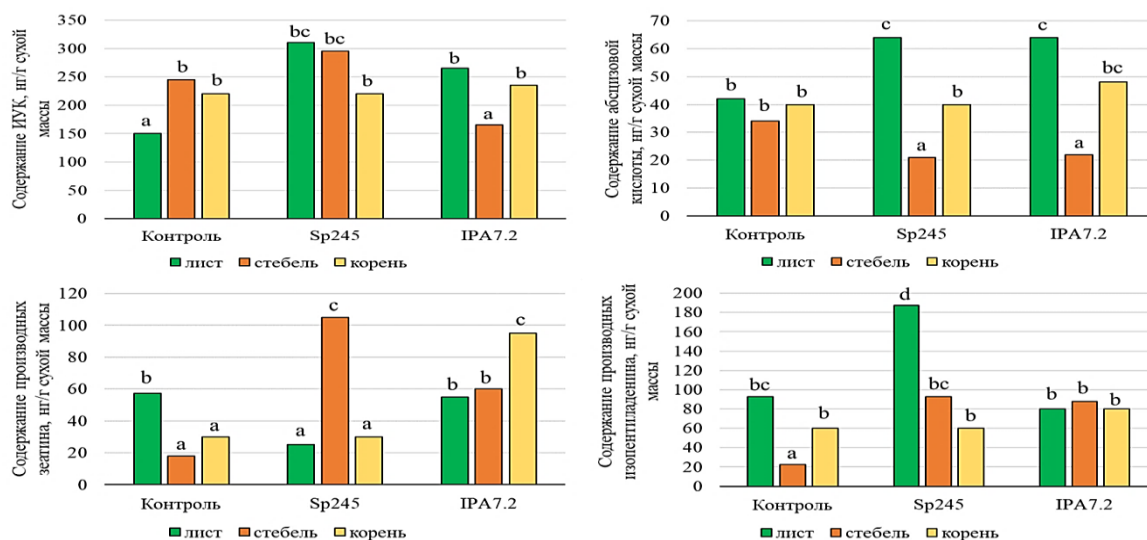


Рисунок 6 – Влияние бактерий на содержание ИУК, АБК, производных зеатина и ИПА в органах растений картофеля, культивируемых *in vitro*. Контроль – культивирование без бактерий, Sp245 – *A. baldaniorum* Sp245, IPA7.2 – *O. cytisi* IPA7.2

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. Присутствие бактерий в питательной среде повышало содержание производных зеатина (сумму свободного основания и рибозида) в стеблях растений. Накопление ИПА было наиболее заметным в стеблях под влиянием двух штаммов бактерий и в листьях – под влиянием *A. baldaniorum* Sp245.

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. 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. Присутствие бактерий, в основном, способствовало увеличению уровня цитокининов в растениях. В листьях бактерии повышали уровень производных ИПА, а в стебле – зеатина. 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.

Известно, что за синтез и редукцию ауксинов отвечает большое число генов, также экспрессия многих генов зависит от экзогенной и эндогенной индолил-3-уксусной кислоты. 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* (Рисунок 7). В качестве контроля экспрессии использовали 2 референсных гена *TUB*, *GAP*. Было проведено изучение их экспрессии в 10-суточных микрорастениях 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 μ M). В качестве контроля использовали растения без обработки.

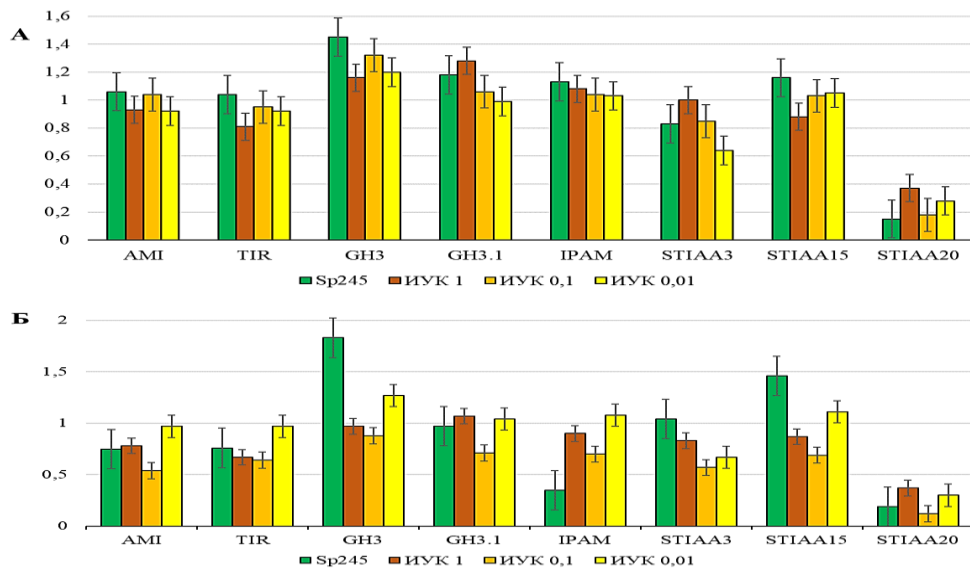


Рисунок 7 – Относительный уровень экспрессии ауксин-зависимых генов в микрорастениях картофеля сорта Невский при действии бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и ИУК в концентрации 1, 0,1, 0,01 мг/л. Уровень экспрессии определен: А – по отношению к уровню экспрессии гена *TUB*; Б – по отношению к уровню экспрессии гена *GAP*

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 спустя несколько минут после воздействия экзогенной ИУК. Вероятно, поэтому несколько выше экспрессия генов на фоне самой низкой концентрации ИУК.

Относительный уровень экспрессии генов в ответ на экзогенную ИУК и бактерии в целом совпадал. 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. Поскольку данные гены связаны с деградацией ИУК, можно предположить, что ко вторым суткам под действием бактерий происходит накопление эндогенной ИУК в тканях микрорастений картофеля, что специфически стимулирует экспрессию указанных генов.

Воздействие на клетки растений как патогенных, так и симбиотических микроорганизмов запускает комплекс физиологических и биохимических реакций, объединяемых общим понятием «индуцированные механизмы защиты». Накопление каллозы в клеточных стенках растений входит в комплекс таких реакций. Анализ микрорастений картофеля сорта Невский, инокулированных *A. baldaniorum* Sp245 методом флуорисцентной микроскопии, показал (Рисунок 8), что в корнях на вторые сутки наблюдается фрагментарное отложение каллозы, которое к седьмым суткам становится сплошным в тканях ксилемы. В листьях инокулированных растений на седьмые сутки также значительно увеличивается содержание каллозы как в проводящих пучках, так и фрагментарно в клеточных стенках паренхимы.

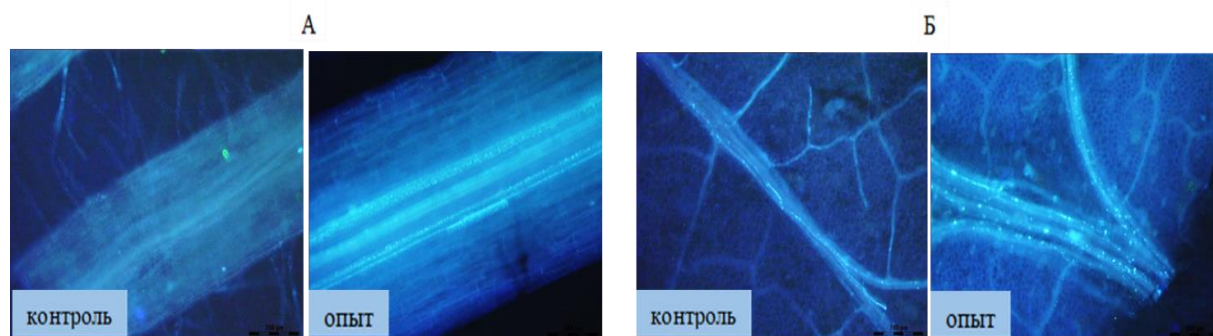


Рисунок 8 – Влияние бактерий *A. baldaniorum* Sp245 на синтез каллозы в корнях (А) и листьях (Б) микроклонов картофеля на 7-ые сутки инокуляции

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 однонаправленно и в большинстве случаев совпадает по величине.

ЛПС *A. brasilense* Sp7, так же, как и сами живые бактерии *A. brasilense* Sp7 (Таблица 17), 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. Вероятно, 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.

Морфометрические параметры микрорастений картофеля сорта Кондор после 20-и дневной инкубации с клетками (10^6 кл./мл) *O. cytisi* IPA7.2 и липополисахаридами (10 мкг/мл) штаммов *O. cytisi* IPA7.2 и *A. baldaniorum* Sp245 также показали сходное стимулирующее влияние живых клеток ризосферных бактерий и липополисахаридов (Таблица 18).

Таблица 17 – Влияние живых бактерий *A. brasilense* Sp7 и липополисахаридов бактерий *A. brasilense* Sp7 и *Pectobacterium* sp. на рост микрорастений картофеля сорта Кондор в культуре *in vitro*

Вариант	Длина побега, мм	Количество узлов, шт.	Длина корня, мм	Количество корней, шт.
Контроль	82,6	9,0	53,0a	9,8a
Бактерии <i>A. brasilense</i> Sp7	78,3	7,8	62,4c	10,9b
ЛПС <i>A. brasilense</i> Sp7	73,8	8,4	61,1bc	12,0c
ЛПС <i>Pectobacterium</i> sp.	77,9	8,0	61,8c	10,2ab
F факт.	-	-	17,1*	7,7*
НСР _{0,05}	-	-	3,1	1,0

Примечание – «*» $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{теор.}}$; фактор А – генотип, фактор В – инокуляция; разными буквами латинского алфавита (a, b, c) обозначено ранжирование данных по тесту Дункана.

Таблица 18 – Влияние живых бактерий *O. cytisi* IPA7.2 и липополисахаридов *O. cytisi* IPA7.2 и *A. baldaniorum* Sp245 на рост микрорастений картофеля сорта Кондор в культуре *in vitro*

Варианты	Длина побега, см	Количество узлов, шт.	Количество корней, шт.	Сырая масса побегов, мг	Сырая масса корней, мг
Контроль	4,7 a	6,9 a	9,6 a	200 a	302 a
<i>O. cytisi</i> IPA7.2	5,7 b	8,5 b	10,6 a	289 b	299 a
ЛПС <i>O. cytisi</i> IPA7.2	5,8 bc	9,1 b	12,6 b	275 b	451 b
ЛПС <i>A. baldaniorum</i> Sp245	6,3 c	8,5 b	12,9 b	286 b	388 ab
F факт.	10,0*	14,8*	7,0*	7,76*	4,81*
НСР _{0,05}	0,6	0,7	1,7	34	98

Примечание – «*» $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{теор.}}$; фактор А – генотип, фактор В – инокуляция; разными буквами латинского алфавита (a, b, c) обозначено ранжирование данных по тесту Дункана.

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 корней), 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.

Сравнение влияния ЛПС разных таксономических видов бактерий (Таблица 19) показало, что характер воздействия ЛПС может быть связан со строением их О-антигена.

Анализ результатов измерения длины побегов микрорастений показал, что достоверное стимулирование роста наблюдалось только в вариантах с ЛПС штаммов *O. quorumnogens* T1Kr02 (+13,2 %), *A. brasilense* SR88 (+13,6 %) и *A. thiophilum* BV-S (+16,6 %). ЛПС других трех штаммов статистически не влияли на длину побега. При этом для ЛПС штаммов *A. brasilense* SR88 и *A. thiophilum* BV-S был выявлен эффект снижения у микрорастений количества узлов на 28 и 21,9 % соответственно. Можно констатировать, что ЛПС штаммов *A. brasilense* SR88 и *A. thiophilum* BV-S способствовали развитию более высоких микрорастений с меньшим, чем в контроле, количеством узлов, т.е. с более длинными междоузлиями. 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 *O. quorumnogens* T1Kr02 и *P. chlororaphis* K3.

Таблица 19 – Влияние липополисахаридов *O. quorumnogens* T1Kr02, *P. chlororaphis* K3, *A. brasilense* SR80, *A. brasilense* SR88, *A. thiophilum* BV-S и *A. zeae* 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 побегов, мг	Сухая масса корней, мг
Контроль	70,5 a	7,3 bc	8,7 abc	238 b	38,4 c	12,5 ab
ЛПС <i>O. quorumnogens</i> T1Kr02	79,8 bc	7,2 bc	9,4 c	315 c	47,1 e	16,4 bc
ЛПС <i>P. chlororaphis</i> K3	74,2 ab	8,5 c	9,1 bc	185 a	24,8 a	8,3 a
ЛПС <i>A. brasilense</i> SR80	74,7 ab	6,6 ab	8,87 abc	213 ab	34,6 b	13,8 b
ЛПС <i>A. brasilense</i> SR88	80,1 bc	5,2 a	7,4 a	203 a	39,0 c	15,1 b
ЛПС <i>A. thiophilum</i> BV-S	82,2 c	5,7 a	9,1 bc	316 c	43,6 d	20,6 c
ЛПС <i>A. zeae</i> N7	69,9 a	6,6 ab	7,5 ab	215 ab	40,2 c	13,6 ab
F _{факт.}	5,6*	3,2*	2,9*	7,3*	12,5*	4,4*
HCP _{0,05}	6,2	1,5	1,7	33	2,1	5,4

Примечание – «*» F_{факт.} ≥ F_{теор.}; фактор А – генотип, фактор В – инокуляция; разными буквами латинского алфавита (a, b, c, ...) обозначено ранжирование данных по тесту Дункана.

Измерение сухой массы побегов продемонстрировало ингибирование этого параметра у растений, выращенных в присутствии ЛПС штамма *P. chlororaphis* K3 на 35,4 % и *A. brasilense* SR80 на 9,9 %. Увеличение сухой массы побегов относительно контрольных микрорастений было выявлено при действии ЛПС штамма *A. thiophilum* BV-S на 13,5 % и *O. quorumnogens* T1Kr02 на 22,7 %. На длину корней положительное влияние оказывали препараты ЛПС штаммов *O. quorumnogens* T1Kr02 и *A. thiophilum* BV-S (для обоих вариантов +32,4 % от контроля). Наоборот, у микрорастений, выращенных в присутствии ЛПС штаммов *A. brasilense* SR88 и *P. chlororaphis* K3, суммарная длина корней снижалась на 14,7 и 22,3 % соответственно. При этом в варианте с ЛПС штамма *P. chlororaphis* K3 наблюдалось формирование большого числа коротких и тонких корней. Препараты ЛПС штаммов *Ochrobactrum quorumnogens* T1Kr02 и *Azospirillum thiophilum* BV-S оказывали достоверно положительное влияние на наибольшее количество исследованных параметров микрорастений картофеля сорта Кондор, что может быть связано с химическим строением их повторяющихся звеньев О-полисахаридов.

По результатам проведенных исследований установлено, что при определенных условиях в культуре *in vitro* возможно формирование эффективного растительно-микробного ассоциативного комплекса между микрорастениями картофеля и ризосферными рост-стимулирующими бактериями. В отличие от дедифференцированных каллусных клеток ткани корня и других органов растений взаимодействуют с живыми бактериями ряда штаммов без негативных эффектов. 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 картофеля выглядит следующим образом (Рисунок 9).

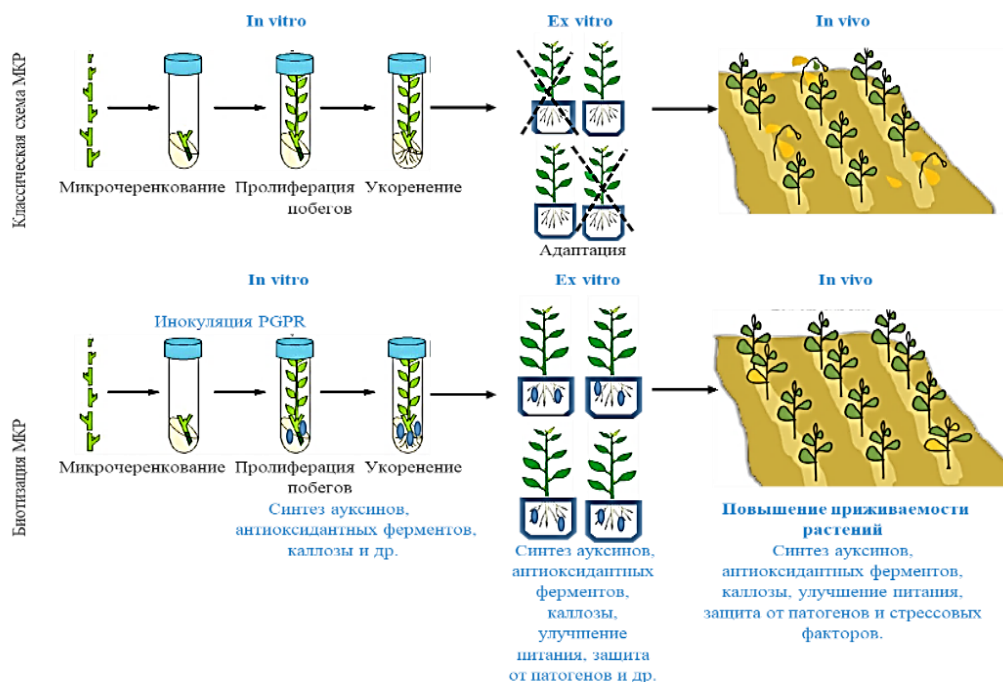


Рисунок 9 – Схема оптимизации метода микроклонального размножения в рамках технологии производства оздоровленного посадочного материала картофеля

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. Для управления морфогенезом могут применяться не только химические и физические факторы культивирования в условиях *in vitro*, но и живые ризосферные рост-стимулирующие бактерии или компоненты их клеток. Биологические факторы могут быть перспективными с точки зрения развития прикладных агробиотехнологий в селекции и производстве посадочного материала сельскохозяйственных растений.

Выводы

1. 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 отличие от живых клеток, которые вызывают фитоиммунные реакции и некроз клеток каллусов.

3. Установлено, что липополисахариды бактерий *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* 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. brasilense* 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 пассивирования 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*.

могут быть применены для стимулирования роста микрорастений, что исключает риск контаминации по сравнению с использованием живых бактерий.

10. Создана модернизированная технология производства оздоровленного посадочного материала картофеля, основанная на формировании 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. brasilense* 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 работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России

1. 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.Ю. Фадеева, С.Ю. Щеголев // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2007. – № 1. – С. 27–31.
2. Биохимическая оценка морфогенетического потенциала каллусных клеток пшеницы *in vitro* / Н.В. Евсеева, **О.В. Ткаченко**, Ю.В. Лобачев, И.Ю. Фадеева, С.Ю. Щеголев // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 2. – С. 306–311.
3. **Ткаченко, О.В.** Изучение эффекта гена *Rht-B1b* в культуре клеток и тканей *in vitro* твердой пшеницы / О.В. Ткаченко, Ю.В. Лобачев, О.С. Гаврюшова // Плодоводство и ягодоводство России. – 2009. – Т. 21. – С. 505–509.
4. **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.
5. Влияние липополисахарида *Azospirillum brasilense* Sp245 на морфогенетический потенциал каллусных клеток пшеницы *in vitro* / **О.В. Ткаченко**, Н.В. Евсеева, Ю.В. Лобачев, Л.Ю. Матора, В.В. Дмитриенко, Г.Л. Бурыгин, С.Ю. Щеголев // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2012. – Т. 8, № 3. – С. 13–18.
6. Использование ризосферных бактерий рода *Azospirillum* для повышения адаптационной способности микроклонов картофеля / Н.В. Бойкова, **О.В. Ткаченко**, Н.В. Евсеева, Г.Л. Бурыгин, Л.Ю. Матора, С.Ю. Щеголев // Плодоводство и ягодоводство России. – 2014. – Т. 40, № 1. – С. 54–58.
7. Особенности инокуляции растений ризосферными бактериями как фактор повышения эффективности микроклонального размножения картофеля / Г.Л. Бурыгин, К.Ю. Каргаполова, Н.В. Евсеева, **О.В. Ткаченко** // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2018. – Т. 14, №2. – С. 12–16.
8. Повышение эффективности клонального микроразмножения картофеля при инокуляции ризосферными бактериями *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 / К.Ю. Каргаполова, **О.В. Ткаченко**, Г.Л. Бурыгин, Н.В. Евсеева, А.А. Широков, Л.Ю. Матора, С.Ю. Щёголев // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – Т. 26, № 5. – С. 422–430. (WoS, Scopus)

Патенты

9. Патент № 2186768 Российская Федерация, МПК С 07 D 207/08, А 01 N 43/36 Тетрагидрат (+) гидротартрата (+) цис-[2S, 5R-1,5-диметил-2-(1-окси-3-пропил)]-пирролидиния, проявляющий морфогенетическую и росторегулирующую активность: № 2001103941/04 : заявлено 12.02.2001 : опубликовано 10.08.2002 / Норицина М.В.,

Ключкова И.Н., Сусллова Т.А., Барадачева В.М., Лобачев Ю.В., **Ткаченко О.В.**, Дьячук Т.И., Семенова И.Н., Титов В.Н.; патентообладатель Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова – 12 с.

Публикации в изданиях из международной базы данных

10. Improved potato microclonal reproduction with the plant growth-promoting rhizobacteria *Azospirillum* / **O.V. Tkachenko**, N.V. Evseeva, N.V. Boikova, L.Yu. Matora, G.L. Burygin, Yu.V. Lobachev, S.Yu. Shchyogolev // *Agronomy for Sustainable Development*. – 2015. – V. 35, N 3. – P. 1167–1174. (WoS, Scopus)

11. Effect of bacterial lipopolysaccharides on morphogenetic activity in wheat somatic calluses / N.V. Evseeva, **O.V. Tkachenko**, G.L. Burygin, L.Yu. Matora, Yu.V. Lobachev, S.Yu. Shchyogolev // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2018. – V. 34, N 3. – 3.

12. *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 promotes growth of potato microplants and is resistant to abiotic stress / G.L. Burygin, K.Yu. Kargapolova, Ye.V. Kryuchkova, E.S. Avdeeva, N.E. Gogoleva, T.S. Ponomaryova, **O.V. Tkachenko** // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2019. – V. 35, N 4. – P. 55. (WoS, Scopus)

13. Structure, gene cluster of the O antigen and biological activity of the lipopolysaccharide from the rhizospheric bacterium *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 / E.N. Sigida, K.Yu. Kargapolova, A.S. Shashkov, E.L. Zdorovenko, T.S. Ponomaryova, A.A. Meshcheryakova, **O.V. Tkachenko**, G.L. Burygin, Yu.A. Knirel // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – V. 154. – P. 1375–1381. (WoS, Scopus)

14. Effectiveness of inoculation of *in vitro*-grown potato microplants with rhizosphere bacteria of the genus *Azospirillum* / K.Y. Kargapolova, G.L. Burygin, **O.V. Tkachenko**, N.V. Evseeva, Y.V. Pukhalskiy, A.A. Belimov // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. – 2020. – V. 141. – P. 351–359. (WoS, Scopus)

15. Rhizobacteria Inoculation Effects on Phytohormone Status of Potato Microclones Cultivated *In Vitro* under Osmotic Stress / T.N. Arkhipova, N.V. Evseeva, **O.V. Tkachenko**, G.L. Burygin, L.B. Vysotskaya, Z.A. Akhtyamova, G.R. Kudoyarova // *Biomolecules*. – 2020. – V. 10. – 1231. (WoS, Scopus)

16. Morphogenesis of wheat calluses treated with *Azospirillum* lipopolysaccharides / **O.V. Tkachenko**, G.L. Burygin, N.V. Evseeva, Yu.P. Fedonenko, L.Yu. Matora, Yu.V. Lobachev, S.Yu. Shchyogolev // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. – 2021. – V. 147. – P. 147–155. (WoS, Scopus)

17. Lipopolysaccharide and flagellin of *Azospirillum brasilense* sp7 influence callus morphogenesis and plant regeneration in wheat / Y.V. Krasova, **O.V. Tkachenko**, E.N. Sigida, Yu.V. Lobachev, G.L. Burygin // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2022. – V. 38. – 62. (WoS, Scopus)

18. Structure, Physicochemical Properties and Biological Activity of Lipopolysaccharide from the Rhizospheric Bacterium *Ochrobactrum quorumnecens* T1Kr02, Containing D-Fucose Residues / A.A. Krivoruchko, E.L. Zdorovenko, M.F. Ivanova, E.E. Kostina, Y.P. Fedonenko, A.S. Shashkov, A.S. Dmitrenok, E.A. Ul'chenko, **O.V. Tkachenko**, A.S. Astankova, et al. // *International Journal of Molecular Science*. – 2024. – V. 25. – 1970. (WoS, Scopus)

Публикации в других рецензируемых журналах и изданиях

19. **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 // *Journal of Huazhong Agricultural University*. – 2000. – V. 19, N3. – P. 219–222.

20. 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, A.Yu. Mitrofanov, T.I. Djatchouk, S.Yu. Shchyogolev // *Wheat Information Service*. – 2002. – N 94. – P. 1–4.

21. Лобачев, Ю.В. Разработка методов культивирования клеток и тканей пшеницы *in vitro* / Ю.В. Лобачев, **О.В. Ткаченко** // Международный журнал экспериментального образования. – 2014. – № 3. – С. 157–158.
22. Влияние липополисахаридов бактерий на эмбриогенную способность каллусов пшеницы в культуре *in vitro* / Ю.В. Лобачев, **О.В. Ткаченко**, Н.В. Евсеева, Л.Ю. Матора, Г.Л. Бурыгин, С.Ю. Щеголев // Международный журнал экспериментального образования. – 2014. – № 3. – С. 158–159.
23. Особенности морфогенеза структурных элементов незрелых зародышей линии пшеницы, культивируемых *in vitro* / В.А. Спивак, К.И. Минликаева, Н.В. Евсеева, **О.В. Ткаченко**, Ю.В. Лобачёв // Бюллетень Ботанического сада Саратовского государственного университета. – Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2014. – Вып.12. – С.188–197.
24. Бойкова, Н.В. Семеноводство картофеля на основе биотехнологии / Н.В. Бойкова, **О.В. Ткаченко** // Математические методы в технике и технологиях (ММТТ). – 2014. – Т. 13, № 70. – С. 248–250.
25. Создание ассоциации *in vitro* картофеля с бактериями рода *Azospirillum* / Н.В. Бойкова, **О.В. Ткаченко**, Н.В. Евсеева, Л.Ю. Матора, Г.Л. Бурыгин, С.Ю. Щеголев // Аграрный научный журнал. – 2015. – № 7. – С. 3–7.
26. Бактериальный изолят из ризосферы картофеля (*Solanum tuberosum* L.), идентифицированный как *Ochrobactrum lupini* IPA7.2 / Г.Л. Бурыгин, И.А. Попова, К.Ю. Каргаполова, **О.В. Ткаченко**, Л.Ю. Матора, С.Ю. Щеголев // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т. 52, № 1. – С. 105–115.
27. Влияние ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* или компонентов их клеток на морфогенез пшеницы и картофеля в культуре *in vitro* / **О.В. Ткаченко**, Н.В. Евсеева, Г.Л. Бурыгин, Л.Ю. Матора, Ю.В. Лобачев, С.Ю. Щеголев // Актуальная биотехнология. – 2017. – № 2(21). – С. 218.
28. Применение ризосферных бактерий при микроклональном размножении картофеля. Методические рекомендации / Составители: **О.В. Ткаченко**, Н.В. Евсеева, М.В. Загоруйко, Г.Л. Бурыгин, – Саратов: Амирит, 2021. – 43 с.
29. Повышение морфогенетической активности каллусов пшеницы с использованием липополисахаридов ризобактерий / **О.В. Ткаченко**, Н.В. Евсеева, Г.Л. Бурыгин, Ю.П. Федоненко, Ю.В. Лобачев // Актуальная биотехнология. – 2021 – №1 (35) – С. 125.
30. Растительно-бактериальные ассоциации в условиях *in vitro* и *ex vitro*: эффект коинокуляции / Н.В. Евсеева, К.Ю. Каргаполова, **О.В. Ткаченко**, Г.Л. Бурыгин // Актуальная биотехнология. – 2021. – №1 (35) – С. 31.
31. Comparison of the effect of *Azospirillum baldaniorum* Sp245 and exogenous indolyl-3-acetic acid on the growth of ten varieties of potato microclones in *in vitro* culture / M.A. Grigoryan, A.A. Starchikov, **O.V. Tkachenko**, G.L. Burygin, L.G. Kurasova // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. – 2022. – V. 1010. – 012162.
32. Влияние липополисахаридов грамотрицательных бактерий различных таксономических групп на морфогенетическую активность каллусов мягкой пшеницы / Г.Л. Бурыгин, Е.Е. Костина, К.Ю. Каргаполова, Ю.В. Лобачев, **О.В. Ткаченко** // Biomix. – 2024. – Т.16(1). – С. 13–17.
33. Изменение химических, физико-химических и биологических свойств липополисахарида *Ochrobactrum cytisi* PA7.2 при О-деацилировании / Ю.А. Филиппчева, Е.Н. Сигида, **О.В. Ткаченко**, Г.Л. Бурыгин // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. – 2024. – Т. 24, вып. 1. – С. 44–50.

Публикации в сборниках и материалах конференций

34. **Ткаченко, О.В.** Генетические аспекты культивирования клеток и тканей пшеницы *in vitro* / **О.В. Ткаченко** // Современные проблемы генетики, биотехнологии и селекции растений: Тезисы 2-ой международной конференции 19-23 мая 2003 г. – Харьков, ИР им. В.Я. Юрьева, 2003. – С. 101–102.

35. **Ткаченко, О.В.** Сравнительный анализ действия *Rht*-генов на культуру тканей *in vitro* яровой мягкой и твердой пшеницы / **О.В. Ткаченко** // Тезисы докладов научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов, посвященной 115-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова – Саратов: Изд-во ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2002. – С. 127–128.

36. Isogenic analysis of morphogenetic processes in an *in vitro* culture of wheat / **O.V. Tkachenko**, N.V. Evseeva, Yu.V. Lobachev, S.Yu. Shchyogolev // VIII International Conference «The Biology of Plant Cells *In Vitro* and Biotechnology» – Saratov, 2003. – P. 318.

37. A novel molecular marker for morphogenesis in an *in vitro* culture of wheat / N.V. Evseeva, J.Yu. Fadeeva, S.Yu. Shchyogolev, **O.V. Tkachenko**, Yu.V. Lobachev // Annual Wheat Newsletter. USA. KSU, 2004. – V. 50. – P. 122–123.

38. Study of embryogenic processes in the wheat somatic callus with the use of genetic models / N.V. Evseeva, J.Yu. Fadeeva and S.Yu. Shchyogolev, **O.V. Tkachenko**, Yu.V. Lobachev // Annual Wheat Newsletter. USA. KSU, 2005. – V. 51. – P. 118.

39. Пролиферативный антиген инициальных клеток в сравнительном исследовании морфогенетических процессов *in vivo* и *in vitro* пшеницы / Н.В. Евсеева, И.Ю. Фадеева, Ю.В. Лобачев, **О.В. Ткаченко**, С.Ю. Щеголев // Молекулярные механизмы взаимодействия микроорганизмов и растений: фундаментальные и прикладные аспекты: Материалы Всероссийской конференции. – Саратов, 2005. – С. 43–44.

40. Изучение новых росторегулирующих веществ в культуре каллусных тканей *in vitro* / **О.В. Ткаченко**, М.В. Норицина, Ю.В. Лобачев // Вавиловские чтения – 2005. Материалы конференции, посвященной 118-й годовщине со дня рождения академика Николая Ивановича Вавилова. – Саратов, 2005. – С. 52–53.

41. **Ткаченко, О.В.** Эффекты генов короткостебельности в культуре пыльников *in vitro* мягкой пшеницы / **О.В. Ткаченко**, Ю.В. Лобачев // Вавиловские чтения – 2006: Материалы всероссийской научно-практической конференции, посвященной 119-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова 23-25 ноября 2006 г. – ФГОУ ВПО Саратовский ГАУ, 2006. – С. 58–59.

42. ПАИ в исследовании морфогенетических процессов в культуре *in vitro* пшеницы / И.Ю. Фадеева, Н.В. Евсеева, **О.В. Ткаченко**, Ю.В. Лобачев, С.Ю. Щеголев // Вавиловские чтения – 2006: Материалы всероссийской научно-практической конференции, посвященной 119-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова 23-25 ноября 2006 г. – ФГОУ ВПО Саратовский ГАУ, – С. 59-61.

43. Пролиферативный антиген инициалей в сравнительном исследовании морфогенетических процессов в каллусной культуре *in vitro* и в меристематических зонах *in vivo* пшеницы / Н.В. Евсеева, И.Ю. Фадеева, **О.В. Ткаченко**, Ю.В. Лобачев, С.Ю. Щеголев // Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем»: Материалы докладов VI съезда общества физиологов растений России – Сыктывкар, 2007. – Ч.3. – С. 341–343.

44. **Tkachenko, O.V.** The effects in bread wheat of some dwarfing genes *in vitro* androgenesis / **O.V. Tkachenko**, Yu.V. Lobachev // Annual Wheat Newsletter. USA. KSU, 2007. – V. 53. – P. 69–70.

45. Эффекты генов короткостебельности пшеницы на содержание пролиферативного антигена инициальных клеток в каллусах / **О.В. Ткаченко**, Ю.В. Лобачев, Н.В. Евсеева, С.Ю. Щеголев // Вавиловские чтения – 2007: Материалы международной конференции, посвященной 120-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова 26-30 ноября 2007 г. – Саратов: Научная книга, 2007. – С. 58.

46. **Tkachenko, O.V.** Using isogenic analysis to study 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.

47. **Ткаченко, О.В.** Изогенный анализ в культуре клеток и тканей *in vitro* пшеницы / **О.В. Ткаченко**, Ю.В. Лобачев // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология. Тезисы

9 Международной конференции. Звенигород, 8-12 сентября 2008 г. М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. – С. 404.

48. Influence of bacterial lipopolysaccharide on the morphogenetic and morphometric parameters of cultivation of wheat somatic callus. / Yu.V. Lobachev, **O.V. Tkachenko**, L.Yu. Matora, G.L. Burygin, N.V. Evseeva // Annual Wheat Newsletter // USA. KSU, 2009. – V. 55. – P. 184–185.

49. Влияние бактериального липополисахарида на морфогенетические и морфометрические показатели культивирования соматических каллусов пшеницы / **О.В. Ткаченко**, Л.Ю. Матора, Г.Л. Бурегин, Н.В. Евсеева, Ю.В. Лобачев // Вавиловские чтения – 2009: Материалы Межд. науч.-практ. конф. – Саратов: ООО Издательство «КУБиК», – 2009. – С. 65.

50. Effect of bacterial lipopolysaccharide on the morphogenetic potential of wheat callus cells *in vitro* / **O.V. Tkachenko**, Yu.V. Lobachev, L.Yu. Matora, N.V. Evseeva, G.L. Burygin, S.Yu. Shchyogolev // Annual Wheat Newsletter. USA. KSU, 2010. – V. 56. – P. 216–217.

51. Влияние бактериального липополисахарида на клеточную пролиферацию пшеницы / **О.В. Ткаченко**, Ю.В. Лобачев, Н.В. Евсеева, Л.Ю. Матора, Г.Л. Бурегин // Вавиловские чтения – 2010: Материалы Международной научно-практической конференции В 3 томах – Саратов: Изд-во КУБИК, 2010. – Т.1. – С. 84–85.

52. Бойкова, Н.В. Влияние бактерий *Azospirillum* на мериклоны картофеля и хризантемы *in vitro* и *ex vitro* / Н.В. Бойкова, **О.В. Ткаченко** // Специалисты АПК нового поколения: Материалы V Всероссийской научно-практической конференции / Под ред. И.Л. Воротникова. – ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов: ООО Издательство «КУБиК», 2011. – С. 16–18.

53. Бактериальные липополисахариды как факторы регулирования морфогенеза соматических клеток пшеницы в культуре *in vitro* / **О.В. Ткаченко**, Ю.В. Лобачев, Н.В. Евсеева, Л.Ю. Матора, Г.Л. Бурегин, В.В. Дмитриенко // Вавиловские чтения – 2011: Материалы межд. науч.-практ. конф. – Саратов: Изд-во «КУБиК», 2011. – С. 171.

54. Bacterial lipopolysaccharides in a culture of wheat calli / **O.V. Tkachenko**, Yu.V. Lobachev, L.Yu. Matora, N.V. Evseeva, V.V. Dmitrienko, G.L. Burygin, S.Yu. Shchyogolev // Annual Wheat Newsletter. USA. KSU, 2012. – V. 58. – P. 214.

55. Изучение растительно-микробных взаимодействий как направление агробиотехнологии / **О.В. Ткаченко**, Ю.В. Лобачев, Н.В. Евсеева, Л.Ю. Матора, Г.Л. Бурегин, С.Ю. Щеголев // Биология – наука XXI века: Материалы Международной конференции. Москва, 24 мая 2012 г. / Ред. Р.Г. Василев. – М.: МАКС Пресс, 2012. – С. 939–940.

56. Бойкова, Н.В. Биотехнологические приемы в семеноводстве картофеля / Н.В. Бойкова, **О.В. Ткаченко** // Вавиловские чтения – 2012: Материалы межд. науч.-практ. конф., посвященной 125-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова – Саратов: ИЦ Наука, 2012. – С. 46–47.

57. Физиолого-биохимические изменения в соматических каллусах пшеницы *in vitro* под влиянием бактериальных липополисахаридов / В.В. Дмитриенко, **О.В. Ткаченко**, Н.В. Евсеева, Г.Л. Бурегин, В.А. Спивак, Ю.В. Лобачев, Л.Ю. Мотора // Вавиловские чтения – 2012: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 125-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова – Саратов: ИЦ Наука, 2012. – С. 76–77.

58. Взаимодействие растений с бактериями рода *Azospirillum* в экспериментах *in vivo* и *in vitro* / Н.В. Евсеева, **О.В. Ткаченко**, Л.Ю. Мотора, Ю.В. Лобачев, С.Ю. Щеголев // Вавиловские чтения – 2012: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 125-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова – Саратов: ИЦ Наука, 2012. – С. 85–86.

59. Бойкова, Н.В. Клеточные технологии в семеноводстве картофеля / Н.В. Бойкова, **О.В. Ткаченко** // Молодые ученые – Агропромышленному комплексу Поволжского региона:

Сборник научных работ. Вып. 7. / Под ред. И.Л. Воротникова. – Саратов: Издательство «Саратовский источник», 2013. – С. 18–20.

60. Бойкова, Н.В. Взаимодействие мериклонов картофеля и бактерий *Azospirillum brasilense* в условиях *in vitro* и *ex vitro* / Н.В. Бойкова, **О.В. Ткаченко** // Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве: Материалы Международной научно-практической конференции. – Саратов: Издательство «КУБиК», 2013. – С. 142–143.

61. Моделирование растительно-микробных ассоциаций в культуре *in vitro* / **О.В. Ткаченко**, Н.В. Евсеева, Л.Ю. Матора, Г.Л. Бuryгин, Н.В. Бойкова, Ю.В. Лобачев, С.Ю. Щеголев // VII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» / Материалы VII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 19-22 Марта 2013 г. М.: ЗАО «Экспобиохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2013 – С. 399.

62. Растительно-бактериальные ассоциации в культуре *in vitro* пшеницы и картофеля / Н.В. Евсеева, **О.В. Ткаченко**, Л.Ю. Матора, Г.Л. Бuryгин, Н.В. Бойкова, Ю.В. Лобачев, С.Ю. Щеголев // Инновационные направления современной физиологии растений: Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием. – Москва: Изд-во МГУ, 2013. – С. 198.

63. Morphological-anatomical changes in somatic wheat calli *in vitro* under the effect of bacterial lipopolysaccharide / **O.V. Tkachenko**, Yu.V. Lobachev, N.V. Evseeva, L.Yu. Matora, G.L. Burygin, V.A. Spivak, K.I. Minlikayeva, S.Yu. Shchyogolev // Annual Wheat Newsletter. USA. KSU, 2013. – V. 59. – P. 131.

64. Creation and study of associative symbiosis of *Azospirillum brasilense* and *Solanum tuberosum* *in vitro* и *ex vitro* / N.V. Boykova, **O.V. Tkachenko**, N.V. Evseeva, L.Yu. Matora, G.L. Burygin, S.Yu. Shchyogolev // X International Conference «Plant Cell Biology *in vitro* and Biotechnology»: Abstracts. – Kazan, 2013. – С. 334.

65. Influence of bacterial lipopolisakharid on morphogenetic potential of wheat callus cells *in vitro* / **O.V. Tkachenko**, N.V. Evseeva, V.A. Spivak, L.Yu. Matora, G.L. Burygin, Yu.V. Lobachev, S.Yu. Shchyogolev // X International Conference «Plant Cell Biology *in vitro* and Biotechnology»: Abstracts. – Kazan. – 2013. – С. 150.

66. Инокуляция мериклонов картофеля бактериями *Azospirillum brasilense* Sp 245 / **О.В. Ткаченко**, Н.В. Бойкова, Н.В. Евсеева, Л.Ю. Матора, Г.Л. Бuryгин, С.Ю. Щеголев // Картофелеводство. Сборник научных трудов. Материалы международной научно-практической конференции «Методы биотехнологии в селекции и семеноводстве картофеля». – М: ГНУ ВНИИКХ Россельхозакадемии, 2014. – С. 209–211.

67. Specificity action of bacteria's lipopolysaccharide on wheat calli embryogenic ability in *in vitro* culture / **O.V. Tkachenko**, N.V. Evseeva, Yu.V. Lobachev, L.Yu. Matora, G.L. Burygin, S.Yu. Shchyogolev // Annual Wheat Newsletter // USA. KSU, 2014. – V. 60. – P. 123.

68. Создание и изучение ассоциативного симбиоза картофеля с ризосферными бактериями *in vitro* и *ex vitro* / **О.В. Ткаченко**, Н.В. Евсеева, Л.Ю. Матора, Г.Л. Бuryгин, С.Ю. Щеголев, Н.В. Бойкова, Е.В. Терентьева, К.Ю. Каргаполова // Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы (к 50-летию ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»). II Международная научная конференция, г. Минск, 13-16 октября 2015 г.: материалы конференции / Ред. колл.: А.В. Кильчевский и др.; Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2015 г. – С. 202.

69. Development of associations between *in vitro*-growing plants and *Azospirillum* rhizobacteria: a way to increase plant survivability *ex vitro* and enhance crop yields / **O.V. Tkachenko**, N.V. Evseeva, N.V. Boikova, L.Yu. Matora, G.L. Burygin, Yu.V. Lobachev, S.Yu. Shchyogolev // Microbiological aspects of optimization of the production process of cultured crops: proceedings of the International Scientific and Practical Internet Conference (Chernihiv, June 16-18, 2015). – Chernihiv – Nizhyn: Publisher PE Lysenko N.M., 2015. – P. 37–39.

70. Цито-гистологический анализ морфогенетических процессов в соматических каллусах пшеницы / В.А. Спивак, К.И. Дьякова, Н.В. Евсеева, **О.В. Ткаченко**, Ю.В. Лобачев

// Вавиловские чтения – 2015: Сборник статей международной научно-практической конференции, посвящённой 128-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова – Саратов: Амирит, 2015. – С. 156–157.

71. Изучение условий создания ассоциации *in vitro* картофеля с бактериями рода *Azospirillum* / Н.В. Бойкова, **О.В. Ткаченко**, Н.В. Евсеева, Л.Ю. Матора, Г.Л. Бурыгин, С.Ю. Щеголев // Вавиловские чтения – 2015: Сборник статей международной научно-практической конференции, посвящённой 128-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова – Саратов: Амирит, 2015. – С. 100-101.

72. Влияние ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* или компонентов их клеток на морфогенез пшеницы в культуре соматических тканей *in vitro* / **О.В. Ткаченко**, Н.В. Евсеева, Г.Л. Бурыгин, Ю.В. Лобачев, Л.Ю. Матора, С.Ю. Щеголев // Вавиловские чтения – 2017: Сборник статей международной научно-практической конференции, посвящённой 130-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова. – Саратов, Саратовский ГАУ, ООО «Амирит», 2017. – С. 168–169.

73. Влияние изолятов ризосферных бактерий T1Kr02, T1Ks14 на микрорастения картофеля / **О.В. Ткаченко**, К.Ю. Каргалова, Г.Л. Бурыгин // В сборнике: Доклады ТСХА. Материалы международной научной конференции. – М.: ТСХА, 2018. – С. 25–27.

74. Экономическая эффективность способов получения миниклубней картофеля в защищенных условиях / **О.В. Ткаченко**, О.В. Ивакин, С.А. Ткаченко // В сборнике: Вавиловские чтения – 2018: Сборник статей Международной научно-практической конференции, посвящённой 131-ой годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова, 2018. – С. 96–98.

75. Эффективность культивирования клеток и тканей растений *in vitro* в присутствии бактерий и их метаболитов // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология / **О.В. Ткаченко**, Н.В. Евсеева, Г.Л. Бурыгин, К.Ю. Каргаполова, Ю.В. Лобачев, Л.Ю. Матора, С.Ю. Щеголев // Международной конференции, которая знаменует полувековую историю по исследованию культивируемых *in vitro* клеток высших растений и 60-летие деятельности отдела биохимии и биотехнологии растений государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» (г. Минск, 23–27 сентября 2018 г.). – Минск: Медисонт, 2018. – С. 238.

76. Стратегия создания растительно-микробных ассоциаций *in vitro* для совершенствования агробиотехнологий в семеноводстве картофеля / **О.В. Ткаченко**, К.Ю. Каргаполова, Н.В. Евсеева, Г.Л. Бурыгин, Л.Ю. Матора, С.Ю. Щеголев // В книге: VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы Сборник тезисов Международного Конгресса. Санкт-Петербург, 2019. – С. 929.

77. Изучение устойчивости ассоциации *in vitro* микрорастений картофеля с бактериями *Azospirillum brasilense* / Е.Е. Костина, К.Ю. Каргаполова, Г.Л. Бурыгин, **О.В. Ткаченко** // В книге: VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы Сборник тезисов Международного Конгресса. Санкт-Петербург, 2019. – С. 858.

78. Влияние ризосферных бактерий и их биомакромолекул на соматические клетки и ткани растений в культуре *in vitro* / **О.В. Ткаченко**, Н.В. Евсеева, Г.Л. Бурыгин, К.Ю. Каргаполова, Ю.В. Лобачев, Е.Е. Костина, С.Ю. Щеголев // IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего»: Сборник тезисов Всероссийской научной конференции с международным участием 19-21 сентября 2019. – Казань, 2019. – С. 437.

79. Устойчивость ассоциации *in vitro* микрорастений картофеля с бактериями *Azospirillum brasilense* / Е.Е. Костина, К.Ю. Каргаполова, Г.Л. Бурыгин, **О.В. Ткаченко** // IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего»: Сборник тезисов Всероссийской научной конференции с международным участием 19-21 сентября 2019. – Казань, 2019. – С. 232.

80. Рост-стимулирующая активность липополисахаридов ризобактерий по отношению к микрорастениям и каллусам / Г.Л. Бурыгин, Е.Н. Сигида, Н.В. Евсеева, Ю.В. Лобачев, **О.В. Ткаченко** // Вавиловские чтения – 2019: Сборник статей международной научно-практической конференции, посвященной 132-ой годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова. – Саратов: Амирит, 2019. – С. 17–19.

81. Varietal features of potato responses to *Azospirillum* and exogenous indole-3-acetic acid / М.А. Grigoryan, А.А. Starchikov, **О.В. Tkachenko**, G.L. Burygin, N.V. Evseeva // Материалы 2-ой Международной научной конференции PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» 5-9 октября 2020 г., Саратов / отв. ред. И.А. Тихонович, 2020. – С. 94.

82. Эффективность коинокуляции микроклонов картофеля ризосферными бактериями различных таксономических групп в условиях *in vitro* / Н.В. Евсеева, Г.Л. Бурыгин, **О.В. Ткаченко**, А.А. Старчиков, М.А. Григорян // Материалы VIII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (22-26 сентября 2020 г.). – Ялта: Актуальная биотехнология, 2020. – № 3(34). – С. 109.

83. Ризосферные бактерии в изменении фитогормонального статуса микроклонов картофеля при осмотическом стрессе *in vitro* / Н.В. Евсеева, Т.Н. Архипова, **О.В. Ткаченко**, Г.Л. Бурыгин, Л.Б. Высоцкая, З.А. Ахтямова, Г.Р. Кудоярова // Вавиловские чтения – 2020: Сборник статей Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию открытия закона гомологических рядов и 133-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова. – Саратов: Амирит, 2020. – С. 119–120.

84. Ко-инокуляция микрорастений картофеля в условиях *in vitro* ассоциативными рост-стимулирующими бактериями разных таксономических групп / **О.В. Ткаченко**, Г.Л. Бурыгин, М.А. Григорян, Н.В. Евсеева, А.А. Старчиков // Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее». Годичное собрание общества физиологов растений России. Материалы докладов. (Москва, 27 сентября – 1 октября 2021г.) – Москва, 2021. – С. 302.

85. Влияние липополисахаридов ризобактерий на морфогенетическую активность соматических каллусов пшеницы в культуре *in vitro* / Н.В. Евсеева, **О.В. Ткаченко**, Г.Л. Бурыгин, Ю.П. Федоненко, Л.Ю. Матора, Ю.В. Лобачев, С.Ю. Щеголев // Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее». Годичное собрание общества физиологов растений России. Материалы докладов. (Москва, 27 сентября – 1 октября 2021г.) – Москва, 2021. – С. 278.

86. Влияние двух ризосферных штаммов на микрорастения картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro* / К.Ю. Каргаполова, **О.В. Ткаченко**, Г.Л. Бурыгин, Н.В. Евсеева // Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее». Годичное собрание общества физиологов растений России. Материалы докладов. (Москва, 27 сентября – 1 октября 2021г.) – Москва, 2021. – С. 277.

87. Растительно-микробные взаимодействия при коинокуляции *in vitro* картофеля рост-стимулирующими бактериями / **О.В. Ткаченко**, Г.Л. Бурыгин, М.А. Григорян, Н.В. Евсеева, К.Ю. Каргаполова // Экобиотех 2021. Материалы VII Всероссийской конференции с международным участием, г. Уфа 4-7 октября 2021 г. – Уфа: УИБ УФИЦ РАН, 2021. – с. 30-32.

88. Клональное микроразмножение картофеля с применением ризосферных бактерий / **О.В. Ткаченко**, Г.Л. Бурыгин, Н.В. Евсеева // II Международная научно-практическая конференция «Геномика и современные биотехнологии в размножении, селекции и сохранении растений» ФГБУН «НБС-ННЦ», г. Ялта, Республика Крым, Россия. 13-15 октября 2021 г. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2021. – С. 147-148.

89. Сравнительный анализ гидрофобности клеток ризосферных бактерий как фактора адгезии на корнях растений / А.А. Ханина, Г.Л. Бурыгин, **О.В. Ткаченко** // В сборнике: Вавиловские чтения - 2021. Сборник статей Международной научно-практической конференции, посвященной 134-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова. – Саратов: ФГБОУ ВО Вавиловский университет, 2022. – С. 263–265.

90. **Ткаченко О.В.** Стратегия создания растительно-микробных ассоциаций *in vitro* для совершенствования агробиотехнологий // Материалы 3-ей Международной научной конференции PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» 3-8 октября 2022 г., Санкт-Петербург / отв. ред. И.А. Тихонович – 2022. – С. 211.

91. Роль ризобактерий в формировании устойчивости микроклонов картофеля к условиям *ex vitro* / К.Ю. Каргаполова, **О.В. Ткаченко**, Н.В. Евсеева, А.Ю. Денисова, А.А. Куликов, Г.Л. Бурыгин // Материалы 3-ей Международной научной конференции PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» 3-8 октября 2022 г., Санкт-Петербург / отв. ред. И.А. Тихонович – 2022. – С. 107.

92. Влияние различных штаммов ризобактерий на рост микрорастений картофеля *in vitro* / М.А. Григорян, **О.В. Ткаченко**, Г.Л. Бурыгин, Н.В. Евсеева // Материалы 3-ей Международной научной конференции PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» 3-8 октября 2022 г., Санкт-Петербург / отв. ред. И.А. Тихонович – 2022. – С. 72.

93. Влияние ко-инокуляции различными штаммами ризосферных бактерий на морфологические параметры микрорастений картофеля сорта Невский // М.А. Григорян, **О.В. Ткаченко**, Г.Л. Бурыгин / Сборник статей Международной научно-практической конференции, посвященной 135-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова. – Саратов: ФГБОУ ВО Вавиловский университет, 2022. – С. 257-260.

94. Изучение консорциума PGPR *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 для положительного эффекта на рост растений картофеля в условиях теплицы / К.Ю. Каргаполова, **О.В. Ткаченко**, Г.Л. Бурыгин, Н.В. Евсеева // «Инновационные технологии создания и возделывания сельскохозяйственных растений»: Сборник статей IV Национальной научно-практической конференции, посвященной 150-летию со дня рождения Г.К. Мейстера (20 апреля 2023 г.) – Саратов: ФГБОУ ВО Вавиловский университет, 2023. – С. 117–123.

95. **Tkachenko O.**, Kulikov A. Alteration in expression level of some growth and stress-related genes of potato microplants after rhizobacteria inoculation // Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (PLANTGEN 2023): тезисы докладов / Под ред. А.А. Калачева, Т.А. Горшковой, М.Л. Пономаревой; ФИЦ «КазНЦ РАН» // VII Международная научная конференция (10–15 июля 2023 г., Казань, Россия). – Казань: ФЭН, 2023. – С. 409.

96. Влияние ризобактерий на рост и адаптацию микроклонов картофеля и земляники / **О.В. Ткаченко**, Н.В. Евсеева, К.Ю. Каргаполова, А.Ю. Денисова, Н.Н. Позднякова, Г.Л. Бурыгин, А.А. Куликов // X Съезд общества физиологов растений России «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата» (Уфа, 18-23 сентября 2023 г.) – Уфа: УИБ УФИЦ РАН, 2023. – С. 359.