

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

На правах рукописи



КАРГАПОЛОВА КРИСТИНА ЮРЬЕВНА

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА КЛОНАЛЬНОГО
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ КАРТОФЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ**

1.5.6. Биотехнология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата сельскохозяйственных наук

Научный руководитель:

кандидат сельскохозяйственных наук,

доцент Ткаченко Оксана Викторовна

Саратов – 2023

Оглавление

Введение.....	4
1. Обзор литературы.....	11
1.1. Влияние ризосферных микроорганизмов на рост растений.....	11
1.2. Использование культур PGPR для стимулирования роста картофеля.....	15
1.3. Биотехнологические методы в семеноводстве картофеля на оздоровленной основе.....	19
1.4. Создание растительно-микробных ассоциаций в культуре <i>in vitro</i> и изучение их влияния на адаптационную способность и продуктивность микрорастений <i>ex vitro</i>	24
2. Экспериментальная часть.....	27
2.1. Объекты и методы исследований.....	27
2.1.1. Объекты исследований.....	27
2.1.2. Культивирование микроклонов растений картофеля <i>in vitro</i>	28
2.1.3. Изучение коллекционных штаммов.....	30
2.1.4. Выделение изолятов бактерий из корней картофеля.....	31
2.1.5. Культивирование бактериальных штаммов и инокуляция микрочеренков картофеля.....	32
2.1.6. Выявление бактерий в составе растительно-микробной ассоциации.....	33
2.1.7. Оценка рост-стимулирующей активности бактерий в отношении микрорастений картофеля.....	35
2.1.8. Идентификация изолятов.....	36
2.1.9. Статистическая обработка.....	37
2.2. Результаты исследований и их обсуждение.....	38
2.2.1. Первичный скрининг коллекционных штаммов PGPR по ростостимулирующей способности в отношении микрорастений картофеля в условиях <i>in vitro</i> и <i>ex vitro</i>	38

2.2.2. Изучение ростостимулирующей способности отобранных коллекционных штаммов в отношении микрорастений картофеля в условиях <i>in vitro</i> и <i>ex vitro</i>	46
2.2.3. Выделение и изучение новых природных изолятов ризосферных бактерий.....	54
2.2.4. Изучение штамма <i>Ochrobactrum cytisi</i> IPA7.2 и его влияния на микрорастения картофеля в культуре <i>in vitro</i>	62
2.2.5. Изучение растительно-микробной ассоциации методом иммуноферментного анализа и иммунофлуоресцентной микроскопии.....	68
2.2.6. Идентификация изолята IPA7.2.....	70
2.2.7. Изучение ответных реакций двух сортов растений картофеля на коинокуляцию двумя штаммами бактерий <i>A. baldaniorum</i> Sp245 и <i>O. cytisi</i> IPA7.2.....	76
2.2.7.1. Влияние коинокуляции штаммами <i>A. baldaniorum</i> Sp245 и <i>O. cytisi</i> IPA7.2 на показатели микрорастений картофеля на этапе <i>in vitro</i>	76
2.2.7.2. Влияние коинокуляции штаммами <i>A. baldaniorum</i> Sp245 и <i>O. cytisi</i> IPA7.2 на показатели микрорастений картофеля на этапе <i>ex vitro</i>	80
2.2.7.3. Влияние коинокуляции штаммами <i>A. baldaniorum</i> Sp245 и <i>O. cytisi</i> IPA7.2 на рост и продуктивность растений картофеля в условиях теплицы...	85
Заключение.....	94
Выводы.....	100
Практические предложения.....	101
Перспективы дальнейшей разработки темы.....	101
Список сокращений и условных обозначений.....	102
Список литературы.....	103
Приложения.....	126

Введение

Актуальность темы. Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является четвертой по значимости продовольственной культурой в мире после риса, пшеницы и кукурузы. Более миллиарда человек во всем мире используют картофель в пищу (Growth and yield..., 2021). Выращивание картофеля отличается высокой потребностью в удобрениях и средствах защиты растений (Response of sweet..., 2021), в том числе на этапе производства семян. Это является причиной не только экологических проблем, но и повышает себестоимость продукции (Tilman, 2002). Более экологически чистый и экономичный подход к агротехнике культуры может заключаться в использовании агробiotехнологий на основе микроорганизмов ризосферы, в том числе рост-стимулирующих бактерий (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR) (Mohammadi, 2012). Исследования влияния PGPR проведены на различных культурах в условиях *in vitro* и *in vivo*. Положительная роль биотизации PGPR установлена для риса (Use of two PGPR..., 2009), кукурузы (Isolation and identification..., 2014), пшеницы (Isolation and characterization..., 2015; Isolation and identification..., 2016), сои (*Azospirillum brasilense* Az39..., 2009), бобовых (Perez-Montano, 2014) и подсолнечника (Root colonization and..., 2012).

Степень разработанности темы исследования. Важный этап в семеноводстве картофеля – получение оздоровленного посадочного материала в культуре *in vitro*. Инокулирование микрорастений культурами PGPR *in vitro* может положительно влиять на рост побегов и корней картофеля *in vitro* и адаптационную способность растений на этапе переноса в условия *ex vitro*. Показана возможность использования для инокулирования микрорастений *in vitro* штаммов бактерий родов *Pseudomonas* и *Methylovorus* (Влияние ассоциативных псевдомонад..., 2012). Одним из хорошо изученных объектов в исследовании ассоциативных симбиозов являются бактерии рода *Azospirillum*. Было показано, что штамм *Azospirillum baldaniorum* Sp245 способен усиливать рост и развитие микроклонов картофеля *in vitro* (Создание ассоциации *in vitro*..., 2015), стимулировать адаптацию

полученных регенерантов к условиям *ex vitro*, а также способствовать увеличению урожая мини-клубней (Improved potato microclonal..., 2015).

Создание активных растительно-микробных ассоциаций PGPR с микроклонами растений картофеля может стать основой инновационной технологии получения посадочного материала в культуре *in vitro*. При этом методология создания ассоциаций и ассортимент возможных штаммов-ассоциантов очень мало изучены.

Цель и задачи. Цель исследования – создание и изучение функционирования растительно-микробных ассоциаций ризосферных рост-стимулирующих бактерий с микрорастениями картофеля в культуре *in vitro* и *ex vitro* для развития экологически чистых агробιοтехнологий.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Провести оценку коллекционных штаммов ризосферных бактерий рода *Azospirillum* по их рост-стимулирующей способности в растительно-микробных ассоциациях с микроклонами картофеля в культуре *in vitro* и *ex vitro*.

2. Выделить природные рост-стимулирующие ризобактерии из ризосферы картофеля и провести оценку отобранных природных изолятов по их влиянию на ростовые процессы микрорастений картофеля в культуре *in vitro* и *ex vitro*.

3. Провести идентификацию выделенных природных ризосферных штаммов, обладающих максимальной способностью к стимулированию ростовых процессов микрорастений картофеля в культуре *in vitro* и *ex vitro*.

4. Изучить влияние условий инокуляции PGPR микрорастений картофеля на эффективность функционирования растительно-микробных ассоциаций.

5. Оценить возможность комбинированного использования наиболее эффективных коллекционных и природных штаммов PGPR в культуре *in vitro* и *ex vitro* картофеля.

Научная новизна

Впервые проведено комплексное изучение влияния штаммов бактерий рода *Azospirillum* из коллекции ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного

подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ФИЦ СЦ ИБФРМ РАН) (Саратов) (<http://collection.ibppm.ru/>) и оригинальных штаммов, выделенных с поверхностно-стерилизованных корней картофеля, выращенного в полевых условиях в Саратовской области, на рост микрорастений картофеля в условиях *in vitro* и адаптационный потенциал в условиях *ex vitro*. Идентифицированы новые штаммы ризосферных бактерий, обладающие рост-стимулирующим эффектом на микрорастения картофеля. Подобраны оптимальные условия создания активных микробно-растительных ассоциаций в культуре *in vitro* для различных штаммов ризосферных бактерий. Изучена возможность ко-инокуляции микрорастений картофеля одновременно двумя штаммами ризосферных бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2.

Теоретическое и практическое значение работы

Теоретически обоснована и разработана методика создания растительно-микробных ассоциаций в условиях культуры *in vitro* в зависимости от особенностей штаммов ризосферных бактерий (их способности утилизировать сахарозу). Установлена возможность повышения эффективности метода клонального микроразмножения картофеля с использованием штаммов рост-стимулирующих бактерий разных таксономических групп. Показана высокая вариабельность эффекта инокуляции в зависимости от штамма бактерий и сорта растений картофеля.

На основе методов секвенирования нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и 16S-23S межгенного спейсера идентифицировано 5 новых штаммов ризосферных бактерий, обладающих способностью стимулировать рост растений картофеля. Штаммы *Ensifer adhaerens* T1Ks14 (= RCAM04487), *Kocuria rosea* T1Ks19 (= RCAM04488), *Acinetobacter guillouiae* K2Kn02 (= RCAM04485), *Ochrobactrum sp.* T1Kr02 (= RCAM04486) и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. (= RCAM04481) депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ, Санкт-Петербург).

Для *O. cytisi* IPA7.2 проведено полногеномное секвенирование с депонированием данных в базе данных GenBank NCBI (MOEC01000000).

Методология и методы изучения. Изучение эффективности ассоциативного взаимодействия между микроорганизмами и растениями картофеля проводилось по стандартной методике клонального микроразмножения растений в культуре *in vitro* и по разработанному оригинальному методу внесения суспензий различных штаммов в разное время культивирования растений *in vitro*. Результаты ассоциативного взаимодействия оценивались по комплексу физиолого-морфологических и биохимических признаков растений. Обнаружение инокулированных ризосферных бактерий на растениях в созданных ассоциациях проводилось по комплексу иммунохимических тестов с использованием специфических поликлональных кроличьих антител к O-антигенам бактериальных клеток. Таксономическая идентификация новых штаммов проводилась методами молекулярно-генетического анализа на основании секвенирования нуклеотидной последовательности. Для построения филогенетических деревьев методом максимального правдоподобия применялся интегрированный пакет программ филогенетического анализа MEGA-6 с установками по умолчанию.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Коллекционные штаммы ризосферных бактерий рода *Azospirillum* оказывают рост-стимулирующее влияние на микрклоны картофеля в культуре *in vitro* и *ex vitro*.

2. Выделенные из ризосферы картофеля новые штаммы природных ризосферных рост-стимулирующих бактерий из ризосферы картофеля *Ensifer adhaerens* T1Ks14, *Kocuriarosea* T1Ks19, *Acinetobacter guillouiae* K2Kn02, *Ochrobactrum* sp. T1Kr02, *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2, способны стимулировать ростовые процессы микрорастений картофеля в культуре *in vitro* и *ex vitro*.

3. Методика инокуляции и совместного культивирования PGPR с микрорастениями картофеля применима для создания и эффективного функционирования растительно-микробных ассоциаций в культуре *in vitro*.

4. Ко-инокуляции микрорастений картофеля одновременно двумя штаммами ризосферных бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 стимулирует рост растений картофеля в условиях *in vitro*, адаптацию *ex vitro* и продуктивность растений в условиях грунтовой теплицы.

Работа выполнена на кафедре «Растениеводство, селекция и генетика» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» (ФГБОУ ВО Вавиловский университет) при частичной финансовой поддержке гранта: 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 агробiotехнологий».

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных результатов подтверждается не менее чем двукратным повторением опытов, наличием трехкратных повторностей вариантов внутри каждого опыта, общепринятыми методами оценки параметров роста растений, использованием статистических методов оценки полученных данных.

Результаты исследований были представлены на следующих конференциях: конференции профессорско-преподавательского состава и аспирантов Вавиловского университета по итогам научно-исследовательской, учебно-методической и воспитательной работы за 2015-2021 гг. (Саратов, 2016-2022); Международные научно-практические конференции «Вавиловские чтения» 2015-2022 гг. (Саратов, 2015-2022); V Российский симпозиум с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2016); Годичные собрания общества физиологов растений России (Санкт-Петербург, 2016; Судак, 2017; Казань, 2019; Москва 2021); VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы (Санкт-Петербург, 2019); II Международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы,

достижения, перспективы» (Минск, 2015); X и XI Международные научные конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2017, 2019); Международная научная конференция «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Минск, 2018); Международная научная конференция, посвященная 130-летию Н.И. Вавилова (Москва, 2017); Научная конференция с международным участием и школа молодых ученых «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (Санкт-Петербург, 2016); V Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2017); Международные научные конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC2018 (Уфа, 2018), PLAMIC2022 (Санкт-Петербург, 2022); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные проблемы картофелеводства: фундаментальные и прикладные аспекты» (Томск, 2018).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 29 работ, в том числе 3 в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК РФ, и 3 в журналах, входящих в международную наукометрическую базу Scopus.

Личный вклад соискателя заключается в проведении экспериментов на всех этапах диссертационного исследования, анализе полученных данных, проведении обзора литературы для обоснования актуальности изучаемой темы, подготовке текста диссертации, апробации материалов исследований на конференциях различного уровня, обработке и интерпретации основных научных положений, выносимых на защиту, подготовке научных публикаций по теме диссертации.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, двух глав (обзора литературы и экспериментальной части, включающей объекты и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение), а также заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Работа

изложена на 132 страницах и иллюстрирована 21 рисунком и 33 таблицами. Список литературы включает 209 наименований, в том числе 33 отечественных и 176 зарубежных.

1. Обзор литературы

1.1. Влияние ризосферных микроорганизмов на рост растений

Современное сельское хозяйство зависит от использования химических удобрений и пестицидов для достижения более высокого урожая. Эта зависимость связана с такими проблемами, как загрязнение окружающей среды, опасность для здоровья, прерывание естественного экологического круговорота питательных веществ и разрушение биологических сообществ. Использование биоресурсов для замены химических удобрений и пестицидов растет с каждым годом. На данный момент микроорганизмы, способствующие росту растений, часто являются новыми и потенциальными инструментами для обеспечения высокого урожая в сельском хозяйстве (Richardson, 2011; Sivasakthi, 2014; Kumar, 2021).

Поскольку микробные инокулянты обладают способностью стимулировать рост растений, обогащать питательными веществами, поддерживать здоровье растений (Plant Growth Promoting..., 2023), они обозначены как перспективная часть комплексных решений агроэкологических проблем. Было показано, что инокуляция микробными консорциумами или бактериями, способствующими росту растений, повышают эффективность использования питательных веществ, главным образом азота и фосфора (Посыпанов, 2000; Soil enzyme activities..., 2014; Physiological and genetic..., 2014; Kivi, 2014).

Растения и микроорганизмы в естественных условиях активно взаимодействуют друг с другом, в том числе устанавливая симбиотические отношения. Ассоциации штаммов PGPR, стимулирующих рост растений, варьируются по степени близости бактерий к корню. Данные микроорганизмы можно разделить на внеклеточных бактерии, существующие в ризосфере, ризоплане или в пространствах между клетками коры корня и внутриклеточные бактерии, существующие внутри клеток корня, как правило, в специализированных узловых структурах. К последним относятся виды ризобий и франкий, которые фиксируют азот в симбиозе с растениями. Во время исследований симбиоза ризобий и бобовых произошло значительное развитие в понимании сигнальных

механизмов микроорганизмов, и это может служить моделью знаний о перекрестных связях и механизмах стимулирования роста растений (Gray, 2005; Bhattacharyya, 2012). Большинство бактерий, обитающих в сфере корней растений, антагонистически ориентировано по отношению к другим микроорганизмам. Ризосферные микроорганизмы обладают важным биоресурсом биологически активных веществ – антибиотиков, биосурфактантов, ферментов и осмопротекторных веществ (Compant, 2005; Berg, 2009; Plant Growth Promoting..., 2017).

В корневой зоне растений обитают микроорганизмы разных систематических групп: *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Derxia*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Agrobacterium*. Однако не все бактерии способны к азотофиксации (Khammas, 1989; Cocking, 2003). Высоким потенциалом азотофиксации отличаются бактерии, относящиеся к родам *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Herbaspirillum* и другие (Микроорганизмы – продуценты стимуляторов..., 2006).

Биологическая азотфиксация у бактерий, в том числе у ризобий происходит преимущественно в клубеньках корней или стеблей. Этот симбиотический процесс проявляет положительное влияние бобовых на почву и их пищевую и кормовую ценность. Симбиотическая азотфиксация использует солнечную энергию, накопленную растениями в форме органических веществ, для восстановления инертного газа N_2 до аммиака при нормальной температуре и давлении. Накопленный органический азот является важным компонентом питания человека и животных. Это определяет роль азотофиксации для устойчивого производства продуктов питания (Волкогон, 2003). Таким образом, взаимодействие между ризобиями и растениями анализируется на агрономическом, физиологическом, микробиологическом и молекулярном уровнях, чтобы получить достаточную информацию о вовлеченных процессах (Andrews, 2017; Lindström, 2019;). Отбор штаммов микроорганизмов, может стать решающей стратегией для создания инновационных методов экологически безопасной агрономии (Тихонович, 2009; Sturz, 2000; Getting the hologenome..., 2016; Deciphering the Symbiotic..., 2019).

Биостимуляторы на основе PGPR широко используются в сельскохозяйственной практике (Brown, 2015). Согласно мировому стратегическому бизнес-отчету о биостимуляторах за 2016-2021 годы, в производстве биостимуляторов участвуют более 80 мировых компаний (Novozymes, Monsanto, Lallemand, PisasPA и др.), которые охватывают Канаду, Японию, Европу, Азиатско-Тихоокеанский регион, Латинскую Америку и остальной мир (Kolodziejczyk, 2014; Endophytic bacteria in..., 2015; Plant Growth Promoting..., 2019). Биоудобрения могут обладать высоким потенциалом в современной агробιοтехнологии (Bloemberg, 2001; Vessey, 2003; Advances in plantgrowth-promoting..., 2014; Plant Growth Promoting..., 2021).

PGPR могут способствовать росту растений прямыми и косвенными механизмами (Glick, 1995). Прямые механизмы определяются как использование тех бактериальных признаков, которые приводят к прямому стимулированию роста растений. Они включают в себя выработку ауксина, 1-аминоциклопропан-1 карбоксилат дезаминазы (АЦК-дезаминазы), цитокинина, гиббереллина, фиксацию азота, солюбилизацию фосфора и связывание железа бактериальными сидерофорами. Косвенные механизмы относятся к бактериальным признакам, которые подавляют функционирование одного или нескольких патогенных организмов растений как грибов, так и бактерий. Эти механизмы включают антибиотики, ферменты, разрушающие клеточную стенку, цианистый водород, индуцированную системную резистентность и подавление чувства кворума (Добровольская, 2002). В дополнение к вышеупомянутым методам, штаммы PGPR в качестве биоконтроля некоторых бактериальных фитопатогенов могут быть получены путем селективного использования бактериофагов (Микроорганизмы – продуценты стимуляторов..., 2006; Karagöz, 2016; Tariq, 2016; Olanrewaju, 2017; Tsukanova, 2017).

Наиболее известным прямым механизмом влияния микроорганизмов является способность продуцировать ауксин (Evaluation of native..., 2022). Glick установил, что около 80% бактерий могут синтезировать и выделять ауксин в качестве вторичного метаболита (Glick, 1995). Ауксины у растений участвуют в

фототропизме, геотропизме, дифференцировке сосудистой ткани, делении клеток, удлинении корня и побега (Reetha, 2014; Grosbeak, 2015; Tabatabaei, 2016).

Этилен влияет практически на все ткани растений и стадии их развития. На выработку этилена в определенном растении влияют температура, свет, другие гормоны, абиотический/биотический стресс (Gamalero, 2015). Повышение концентрации этилена в растениях – это реакция на различные стрессы (1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)..., 2012; Ali, 2014). Выработка этого гормона до порогового уровня вызывает «этиленовый стресс», который влияет на ростовые процессы растений. Штаммы PGPR, продуцирующие АЦК-деаминазу, восстанавливают нормальное развитие растений (Promotion of plant..., 2007), за счёт ингибирования синтеза этилена.

Микроорганизмы могут солюбилизовать фосфор (Isolation of phytase-producing..., 2013; Evaluation of PGPR..., 2014; Aiori, 2017). Бактерии превращают нерастворимые неорганические и органические фосфаты в форму, которая доступна для растений. Различные условия окружающей среды, почвы, растений и другие бактерии влияют на действие фосфатных солюбилизаторов (Plant growth promoting..., 2015; Delfin, 2015; Phosphorous and phosphate..., 2017). Микроорганизмы родов *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus*, а также несимбиотические азотфиксаторы *Azotobacter* и *Azospirillum*, являются наиболее мощными солюбилизаторами фосфора (Banerjee, 2006; Saharan, 2011; Phosphorous and phosphate..., 2017; Plant Growth-Promoting..., 2021).

Основным косвенным механизмом действия PGPR является синтез антибиотиков для противодействия фитопатогенам (Haas, 2003; *Pseudomonas fluorescens* and..., 2009; Raaijmakers, 2012). Некоторые антибиотики получены из бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*. Эти микроорганизмы продуцируют метаболиты, которые служат противовирусными, антигельмитными, антибактериальными, противоопухолевыми и цитотоксическими средствами (Chang, 2007; Portraying mechanics of..., 2016; Effects of Plant Growth..., 2016; Endophytic bacteria and..., 2019).

Адгезия бактерий к корням растений является первым физическим шагом во взаимодействиях между микроорганизмами и растениями. Адгезия оказывает положительный и отрицательный эффект на сельскохозяйственные растения. Это зависит от того, появляются ли стимулирующие рост, симбиотические или патогенные отношения между бактериями и растениями (Collagen-like proteins..., 2015; Wheatley, 2018).

Стимулирующие рост растений ризобактерии могут синтезировать экзополисахариды (ЭПС) (Naseem, 2014). Микроорганизмы, продуцирующие ЭПС, могут поддерживать более высокое содержание влаги в почве. ЭПС, производимые бактериями, образуют комплекс вокруг корней и защищают корневую систему растений от засухи длительное время. Растения, инокулированные бактериями, накапливают больше сахаров, пролина, аминокислот при дефиците воды (Palsaha, 2003; Trivedi, 2005; Exopolysaccharides producing rhizobacteria..., 2018).

Взаимодействия между микроорганизмами и растениями до конца не изучены, хотя становится ясно, что большинство свойств PGPR положительно влияет на растения (Plant Growth-Promoting..., 2023). Для успешного использования микроорганизмы должны быть способны выживать в почве агробиоценозов, где на них могут влиять много факторов – тип растений, характеристики почвы, агротехнические приемы возделывания растений (Perez-Montano, 2014). Главная задача правильно подобрать соответствующие ризобактерии с конкретным растением и условиями окружающей среды для достижения наилучших результатов по стимулированию роста растений (Yarte, 2022).

1.2. Использование культур PGPR для стимулирования роста картофеля

Картофель является одной из основных культур по объему производства, поэтому он занимает одно из центральных мест, как для производителей, так и для потребителей (Частная селекция полевых..., 2005). Такие проблемы, как резкое изменение климата, низкое качество посадочного материала, засоленность почвы и многие другие проблемы создали препятствия для увеличения производства

картофеля (Regulation of antioxidant..., 2019). Во время посадки или при появлении всходов картофеля огромный вред наносит возбудитель *Rhizoctonia solani* J.G. Kuhn. Этот грибок поражает практически все органы картофеля. Химическая обработка клубней защищает только сам клубень, поэтому это малоэффективный прием. Поэтому необходим поиск методов улучшения устойчивости картофеля к патогенам (Larkin, 2016).

Ризосфера содержит разнообразные и богатые микробные сообщества, которые подпитываются корневыми экссудатами. Эти микроорганизмы играют важную роль в биогеохимическом цикле, метаболизме растений, потоке питательных веществ (Chararro, 2014; Microbial interactions in..., 2015; Secondary metabolite genes..., 2017). Картофель выделяет большое количество соединений в ризосферу чтобы облегчить взаимодействие с биотической средой. Корни картофеля выделяют глюкозу, арабинозу, фруктозу (Monosaccharide constituents of..., 2021).

Выращивание картофеля с использованием микроорганизмов активно развивается в настоящее время. К сожалению, данные по колонизации PGPR, о подавлении заболеваний (Bioprospecting in potato..., 2013) и стимулировании роста картофеля микроорганизмами (Bio-preparates support..., 2014) имеются в ограниченном количестве. Актуальной задачей является проведение исследования скрининга штаммов PGPR, связанных с ризосферой картофеля.

Значительное стимулирование роста картофеля, урожайности и качества клубней наблюдалось при инокуляции микроорганизмами *Bacillus subtilis* и *Bacillus megaterium*. Положительная реакция растений картофеля на бактериальную инокуляцию указывает на перспективный биотехнологический инструмент для адаптации картофеля к полевым условиям и улучшения роста растений (Ekin, 2019).

Учеными из Пакистана был выделен и идентифицирован штамм *Bacillus subtilis* KPS-11 из почв картофельных полей. Анализ генома данного штамма показал его потенциальную эффективность, в связи с наличием таких полезных признаков, как солюбилизацию неорганического фосфата, выработку индолил-3-

уксусной кислоты и минерализацию органического фосфата. Наряду с многогранными характеристиками у штамма *B. subtilis* KPS-11 обнаружен потенциал стимулирования роста картофеля *in vivo* (Isolation and characterization..., 2015).

Naqqash с коллегами, проведя скрининг микроорганизмов из ризосферы картофеля, показали, что среди полученных изолятов штамм *Azospirillum* sp. TN10 обладал наибольшим потенциалом стимулирования роста картофеля. Данный штамм был способен продуцировать ауксин и преобразовывать атмосферный азот в пригодную форму для использования растениями. Штамм *Azospirillum* sp. TN10 может быть перспективным кандидатом в качестве компонента биоудобрения для ускорения роста картофеля (Differential response of..., 2016).

Ученые из Индонезии проводили исследование по выявлению и физиологической характеристике ризосферных бактериальных изолятов, обладающих свойствами биоудобрений, биостимуляторов, биопротекторов, которые могут положительно влиять на рост растений и обеспечивать защиту от почвенных патогенов. Результаты их опытов показывают, что бактерии, выделенные из ризосферы картофеля на острове Хартапель Буру, обладали более чем одним полезным физиологическим признаком. Изолят HB8 продуцировал ИУК до высокого уровня концентрации, а изолят HB32 производил большое количество гиббериллиновой кислоты (Isolation and physiological..., 2015).

Одна из главных задач при применении микроорганизмов в сельском хозяйстве – это уменьшение использования химических удобрений. В 2021 году группа ученых изучала реакции растений сладкого картофеля на применение культур PGPR и внесение азотных удобрений в сравнении с инокулированными растениями. Для инокуляции в поле использовали штаммы бактерий *Klebsiella* sp. UPMSP9, *Erwinia* sp. UPMSP10, *Azospirillum brasilense* Sp7, *Bacillus sphaericus* UPMB10. Растения удобряли азотными удобрениями в количестве 0, 33 и 100 кг азота на га. По результатам данных исследований можно сделать вывод, что значительное количество азотных удобрений можно сэкономить, заменив их на инокуляцию бактериями штамма *Klebsiella* sp. UPMSP9, которая может быть

эффективна, как одна треть рекомендуемого использования азотного удобрения. Полевая инокуляция штаммом *Klebsiella* sp. UPMSP9 в дополнение к 33 кг азота на га увеличила способность к поглощению питательных веществ, продуцированию ИУК, стимулировала рост растений сладкого картофеля и улучшала химические свойства почвы (Response of sweet ..., 2021).

В 2018 году ученые проводили полевой опыт с разными вариантами: с применением химических удобрений, микроорганизмов, гормонов (гибереллин). Применение микроорганизмов существенно повлияло на урожайность картофеля. Средняя высота побегов картофеля составляла 27,4 см при применении бактерий, в то время как контрольные растения имели среднюю длину 19,3 см. Урожайность клубней была выше при использовании бактерий, чем у контроля. Микроорганизмы значительно увеличили производство картофеля, так как бактерии *Rhizobium* sp., *Pseudomonas* sp. и *Bacillus* sp. могли создать симбиоз с корнями растений картофеля. Симбиоз увеличил поглощение минералов, что привело к лучшему росту корней и побегов. Такая ассоциация бактерий с корневой поверхностью приводила к стимулированию образования корневых волосков, усилению ветвления, к изменению функционирования клеток коры корня. Повышение количества корней давало возможность растениям картофеля увеличить поглощение воды (The growth and..., 2019).

Так же ученые из Индонезии проводили эксперимент по выделению изолятов из двух разных участков, на которых произрастал сладкий картофель. По результатам опыта они пришли к выводу, что на рост и качество сладкого картофеля влияет колонизация корней PGPR. Выделение изолятов проводили на основе нескольких селективных свойств PGPR с последующим секвенированием последовательности гена 16S рРНК. Результаты указывают на преобладание трех таксономических групп PGPR в ризосферном бактериальном сообществе сладкого картофеля: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* (Comparison of plant..., 2017).

Помимо полевых экспериментов взаимодействия микроорганизмов с растениями картофеля изучают в условиях aeropоники. Ткаченко О.В. совместно с коллегами изучали способ улучшения производства высококачественных семян

картофеля в аэропонике с помощью ризобактерий. Бактериальную суспензию *A. baldaniorum* Sp245 добавляли в питательный раствор для выращивания картофеля в аэропонных условиях. Бактериальная инокуляция увеличивала вегетативную массу растений, количество и урожайность мини-клубней (Improved Production of..., 2021).

1.3. Биотехнологические методы в семеноводстве картофеля на оздоровленной основе

В настоящее время имеется огромное количество различных литературных источников, содержащих оценку развития картофелеводства в России и в мире (Размножение перспективных гибридов..., 2009; Osipov, 2019). Увеличение конкурентоспособности картофельной продукции и поддержка продовольственной безопасности страны представляют собой важные задачи современного отечественного сельского хозяйства. Повышение производства картофеля в Российской Федерации возможно с помощью получения раннего урожая картофеля (Лутова, 2010; Competitiveness of Early..., 2020). Для получения высоких урожаев картофеля предлагается приобретать оздоровленный семенной материал картофеля у отечественных предпринимателей, производимый внутрихозяйственными отделами по оздоровлению посадочного материала картофеля на меристемной основе или лабораториями при научно-исследовательских институтах (Дубинин, 2013).

Семеноводство – одно из важных звеньев в структуре производства картофеля. Семеноводство картофеля занимается размножением семян, улучшением и сохранением их сортовых, урожайных и посевных качеств. Доказано, что валовые сборы и урожай сельскохозяйственных культур повышаются на 20-25 % благодаря использованию качественных семян (Свист, 2004; Efficient Protocol for..., 2018). Семенной материал считается одним из незаменимых и важнейших факторов, через который передаются генетические свойства сортов из поколения в поколения.

Наибольшие затраты в структуре производства картофеля связаны с дороговизной семенного материала. Для решения этой проблемы необходимо разработать и внедрить наиболее эффективные технологии получения семенного материала картофеля (Федорова, 2006).

Интенсивность «вырождения» картофеля очень высока, и размножение в течение 7-8 лет приводит к накоплению фитопатогенов в посадочном материале и снижению урожайности. Поэтому лучшим решением проблемы производства является применение методов биотехнологии (*In vitro* propagation..., 2014). Именно методы и способы биотехнологии гарантируют получение совершенно здоровых растений картофеля в больших объемах при сокращении срока размножения. Производительность семеноводства в зависимости от устойчивости сорта, условий выращивания, методик, применяемых при выращивании семенного материала, и может повышаться на 5-14% (Potato biology and..., 2007). Поэтому необходим поиск методов повышения эффективности биотехнологии.

Микроразмножение является реальным биотехнологическим коммерчески жизнеспособным инструментом, базирующимся на методе клонального размножения *in vitro* для широкого спектра растений (Sathish, 2011; Artemisinin accumulation and..., 2011). Термин «метод культивирования тканей» охватывает множество методов, включая культивирование *in vitro* органов (часть побегов, часть корней, сегменты стебля, цветы, пыльники и т.д.), тканей, клеток и протопластов. В картофеле различные ткани могут быть использованы в качестве эксплантов непосредственно для регенерации побегов (Anjum, 2004; Mohapatra, 2017).

Существует несколько методов культивирования растительных тканей. Основные этапы клонального микроразмножения растений *in vitro*:

1. Стерилизация исходных растительных эксплантов. Например, этиолированные побеги из клубней стерилизуют 5% раствором гипохлорита натрия, содержащего 0,5% Твин 20 в течение 10 мин., затем трижды промывают стерилизованной дистиллированной водой (Koleva, 2012; Xhulaj, 2018).

2. Далее побеги разделяют на черенки с одной почкой или под бинокулярной лупой вычлняют апикальные меристемы и аккуратно помещают на обогащенную питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) в пробирки (Espinosa-Leal, 2018).

3. Выращивание эксплантов происходит при температуре 22-25°C, фотопериоде 16/8 часа (свет/темнота) и при освещенности 1000 лк. Регенеранты или придаточные побеги образуются из растительного экспланта через четыре недели (Koleva, 2012; Xhulaj, 2018).

4. Каждый образец черенкуют и переносят на питательную среду. Такая манипуляция продолжается до получения необходимого объема микроклонов (Badr, 2015).

5. Полученные микроклоны укореняют и адаптируют к условиям естественного выращивания (*ex vitro*).

Микроразмножение активно используется в современной биотехнологии. В этом методе есть преимущества перед традиционным вегетативным способом размножения (Narayani, 2017; Kane, 2018; Analysis of potato..., 2020):

- ускоренный метод размножения растений. Через несколько месяцев получают тысячи микроклонов, идентичных материнской линии;
- сравнительно короткие циклы роста;
- приобретение оздоровленного посадочного материала без вирусов и других фитопатогенов;
- независимость от географических, сезонных и экологических изменений;
- непрерывное производство с одинаковым качеством и урожайностью;
- отсутствие необходимости в применении пестицидов и гербицидов;
- для большинства видов растений имеется возможность консервации избыточно посадочного материала;

Отрицательным фактором микроразмножения *in vitro* является отсутствие «иммунитета» микроклонов при посадке в грунт. Микрорастения чаще всего не могут противостоять фитопатогенным бактериям и стрессовым условиям окружающей среды.

Успех любого протокола микроразмножения зависит от акклиматизации регенирированных клонов во внешней среде при высокой выживаемости и низких затратах. Во время этого переходного периода, от культуры *in vitro* к условиям *ex vitro* и далее в открытый грунт, микрорастения должны преодолеть многие неблагоприятные условия, так как они культивировались в асептических условиях, в среде, содержащей достаточное количество питательных веществ, с низкой интенсивностью света. Поэтому после трансплантации *ex vitro* растениям требуется несколько недель акклиматизации. Выживаемость растений в условиях *ex vitro* зависит от многих факторов, в том числе от использования подходящего почвенного субстрата (Яковлева, 2005; Historical Perspective and..., 2017).

Самый результативный способ оздоровления растительного материала от микоплазм, виридов и вирусов это культивирование меристем побегов растений (Гавриленко, 2005; Vhuiyan, 2013; Naque, 2017; Efficiency of regenerating..., 2018). Существует несколько методов устранения вирусных инфекций в картофеле и оптимизации процесса получения безвирусного материала. Очистить растение от вирусов относительно трудно даже при использовании апикальных меристем и при использовании разнообразных способов лечения (Awan, 2007; Emami, 2011). Один из наиболее эффективных методов очистки от вирусных инфекций растений картофеля является химиотерапия (Determining Effective Methods..., 2020). Совершенствование метода клонального микроразмножения картофеля продолжается до настоящего времени.

Одним из основных количественных показателей культуры тканей *in vitro* является образование междоузлий на регенирированном микрорастении (Банадысев, 2003; Rapid multiplication techniques..., 2014). Известно, что чем выше количество междоузлий, тем больше микрорастений может быть получено путем микрочеренкования. В большинстве случаев этот показатель зависит от сортовых особенностей и регулируется внутренними и внешними факторами. К внешним факторам относят свет, влагу, тепло, а к внутренним содержание компонентов питательной среды. Последний фактор оказывает влияние на органогенез растений *in vitro*. Поэтому, чтобы улучшить эффективность ускоренного микроразмножения

оздоровленного посадочного материала на безвирусной основе необходимо внедрять в состав питательной среды дополнительные ингредиенты (Morozov, 2018).

Для нормальной работы биохимических процессов растения картофеля, в основном, нуждаются в витаминах, как и животные, но в большинстве случаев растения могут самостоятельно синтезировать нужные им витамины. Но в определенных условиях микрорастения не могут синтезировать некоторые витамины. При добавлении витаминов в питательную среду, рост растений значительно увеличивается (Salem, 2017; *In vitro* micropropagation..., 2019). Витамины могут взаимодействовать друг с другом и микрорастения могут положительно или отрицательно реагировать на различные витамины (Shoot proliferation from..., 2018; Application of tissue..., 2018).

Для индукции клеточных делений и дедифференцировки клеток необходимы гормоны (Core features of..., 2018). Для этой цели в рецептуре питательных сред, как правило, должны быть ауксины (вызывающие клеточную дифференцировку), цитокинины (индуцирующие деление дедифференцированных клеток), гиббереллины (стимулирующие растяжение и деление). При индукции стеблевого морфогенеза в питательной среде ауксинов должно быть меньше или они могут быть полностью исключены. Кроме цитокининов и ауксинов, отдельные питательные среды включают гибберелловую кислоту. Ее присутствие не является обязательным, но в некоторых случаях она способствует образованию более вытянутых побегов, стимулируя тем самым рост растительной ткани (*In vitro* regeneration..., 2019; Effects of growth..., 2020).

Освещение и температура относятся к физическим факторам. Освещенность составляет от 1000 до 3000 лк, фотопериод 14-16 часов. В зависимости от сорта картофеля эти параметры могут варьировать. При высокой интенсивности света у растений образуются хлорозы, задерживается развитие (Effect of sunlight..., 2018). Существенную роль в развитие растений играет спектральный состав. Установлено, что красный свет способствует увеличению роста побегов, длины и ширины листа (Production of potato..., 2021). Однако спектральный состав света

может не одинаково влиять на разные сорта картофеля и в некоторых случаях наблюдается противоположный эффект (Optimization of light..., 2019).

При культивировании картофеля температура колеблется в интервале 22-26°C днем и 18-22°C ночью. Понижение температуры в отдельных случаях приводит к увеличению эффективности размножения (Struik, 2007; Effects of high..., 2018).

1.4. Создание растительно-микробных ассоциаций в культуре *in vitro* и изучение их влияния на адаптационную способность и продуктивность микрорастений *ex vitro*

В природе между бактериями и корневой системой растений формируется ассоциативное взаимодействие (Singh, 2013). Опираясь на знания о растительно-микробных ассоциациях и на примеры улучшения питания и роста растений благодаря инокуляции полезными штаммами микроорганизмов (Zelicour, 2013; Igiehon, 2018; Morphological and Metabolite..., 2021) можно прийти к некоторым выводам. Во-первых, положительное влияние ассоциативных штаммов бактерий затрагивает процессы метаболизма растений и их взаимодействия с окружающей средой (Influence of associative..., 2020; Study of the effect..., 2020). Во-вторых, атакуемые фитопатогенными микроорганизмами и находящиеся в неблагоприятных условиях среды растения нуждаются в дополнительном питании и энергии, снижении воздействия стресса, оптимизации гормонального фона (Khan, 2019). В-третьих, ассоциации между растениями и бактериями обладают новыми и уникальными качествами (Benefits associated with..., 2018; Alawiye, 2019; Plant beneficial endophytic..., 2019).

Имеются сведения о положительном влиянии ассоциативных бактерий на растения в условиях *in vitro* (Каменева, 1999; Создание ассоциации *in...*, 2015; Endophytic Colonization of..., 2009; Orlikowska, 2017).

Был исследован способ инокуляции проростков культуры ткани бананов культурами *B. subtilis* (штаммы EPB56 и EPB10) и *Pseudomonas fluorescens* (штамм Pf1). Благодаря инокуляции вовремя микроразмножения ростки бананов выросли

почти в два раза больше по сравнению с контролем. Все испытанные штаммы эндофитов ризобактерий приводили к значительному снижению в последующем фузариоза у микрорастений. Заражение *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* происходило позднее в теплице и в поле (Kavino, 2018).

Было проведено исследование по характеристике стимулирующих рост растений ризосферных и эндофитных бактерий и их влиянию на рост сортов пшеницы. Микроорганизмы выделяли из почвы ризосферы (250 изолятов) и из поверхностно стерилизованных корней (150 изолятов) пшеницы. Из выделенных бактерий 8 изолятов были использованы для инокуляции пшеницы в культуре *in vitro*. Установлено, что при комбинированной инокуляции двух групп (ризосферных и эндофитных) бактерий показатели роста растений повышаются по сравнению с индивидуальными инокуляциями, что свидетельствует о синергетическом действии ризобактерий с эндофитами (Emami, 2019).

Изучали влияние бактерий *Arthrobacter agilis* UMCV2 и *Bacillus methylotrophicus* M4-96 на растениях земляники. Микрорастения инокулировали в культуре *in vitro* бактериями, а затем культивировали в теплице в течение 10 месяцев. Бактеризованные растения имели на 42% более высокий урожай плодов, чем стерильные контрольные растения земляники (Hernandez-Soberano, 2020).

Сотрудниками кафедры «Растениеводство, селекция и генетика» Вавиловского университета было проведено исследование по использованию ризосферных бактерий рода *Azospirillum* для повышения адаптационной способности микрорастений картофеля. Одна из главных целей этого исследования заключалась в изучении метода увеличения эффективности роста и улучшения адаптационной способности микроклонов картофеля с помощью создания в культуре *in vitro* функционирующей растительно-микробной ассоциации. Для создания ассоциации использовали бактерии *A. baldaniorum* Sp245 (Бойкова, 2012). Использовали стерильные микрорастения картофеля сортов Невский и Кондор. Через 10 суток культивирования в культуре *in vitro* на питательной среде МС (с пониженным содержанием агар-агара – 3,5 г/л и без регуляторов роста) проводили инокуляцию растений бактериальной суспензией *A. baldaniorum* Sp245 по 0,1 мл.

Итоговая концентрация бактерий в питательной среде состояла 10^6 кл/мл раствора. Стерильные микрорастения картофеля без инокуляции использовались в качестве контроля. Опытные и контрольные растения высаживали в сосуды с почвой через 20 суток культивирования *in vitro* для адаптации к условиям *ex vitro*, а затем высаживали в открытый грунт. В культуре *in vitro* установлены различия в развитии опытных и контрольных растений. Инокулированные микрорастения двух сортов отличались большим количеством корней и узлов на побегах по сравнению с контролем. Несмотря на стресс, процент приживаемости опытных растений в грунте был выше в 2 раза в отличии от показателей контрольных растений. По результатам данного исследования можно прийти к выводу, что использование инокуляции штаммом *A. baldaniorum* Sp245 микроклонов картофеля является одним из перспективных направлений агробиотехнологии. Бактериальная инокуляция дает возможность улучшить развитие микрорастений *in vitro*, повысить приживаемость растений к условиям *ex vitro* (Бойкова, 2012).

Для создания растительно-микробных ассоциаций особый интерес представляют бактериальные ассоцианты, выделяемые *in situ* из ризосферы растений и почвы. Такие ассоциации применяются для получения высококачественного оздоровленного посадочного материала и создания систем экологически безопасного сельского хозяйства, которые направлены на замещение пестицидов и минеральных удобрений микробиологическими препаратами (Таксономическое положение бактериального..., 2017; Bensalim, 1998).

2. Экспериментальная часть

2.1. Объекты и методы исследований

2.1.1. Объекты исследований

Для создания растительно-микробных ассоциаций, исследования механизмов их формирования и функционирования в модельных системах *in vitro*, *ex vitro* и *in vivo* в качестве макропартнера были использованы микрорастения картофеля сортов Кондор и Невский из *in vitro*-коллекции биотехнологической лаборатории кафедры «Растениеводство, селекция и генетика» ФГБОУ ВО Вавиловский университет.

В исследовании использовали сорта картофеля, рекомендованные Государственной комиссией Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений (ФГБУ «Госсорткомиссия») для выращивания в Нижневолжском регионе, в том числе в Саратовской области (<https://gossortrf.ru/>).

Сорт Невский – картофель среднеранний, для столового назначения. Растения картофеля средней высоты, полупрямостоячие. Листья средние, светло-зеленые. Венчик у цветка белого цвета. Клубни и мякоть светло-бежевого цвета. Глазки мелкие и розового цвета. Товарная урожайность 380-500 ц/га. Товарность 90-95%. Масса товарного клубня 90-130 г. Содержание крахмала в клубнях 10-12%. Вкус хороший и удовлетворительный. Картофель устойчив к возбудителю рака, ризоктониозу. Растения картофеля умеренно восприимчивы к фитофторозу по клубням и ботве. Заявитель: ФГБНУ Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха (1982 г.) (<https://reestr.gossortrf.ru/sorts/7805632/>).

Сорт Кондор – картофель среднеранний, для столового назначения. Цветки окрашены в темно-красно-пурпурный цвет. Клубни картофеля длинноовальной формы, красного цвета с светло-желтой мякотью. Глазки у клубней среднеглубокие. Товарная урожайность в Центральном регионе 184-330 ц/га, на 27-67 ц/га выше стандарта Невский. Максимальная урожайность - 357 ц/га, выше стандарта на 156 ц/га (Брянская обл.). В Центрально-Черноземном регионе товарная урожайность 250 ц/га, на 116 ц/га выше стандарта Брянский ранний. Масса товарного клубня 88-176 г. Содержание крахмала в клубнях 9,2-13,8%, на

уровне стандарта Невский. Вкус клубней удовлетворительный. Товарность 92,0-95,9%, на 3,0-9,4% выше стандарта. Лежкость 74-91%. Растения картофеля устойчивы к раку, выше среднего поражаются фитофторозом, средневосприимчивы к вирусным болезням и парше обыкновенной. Ценность сорта: высокая продуктивность и товарность клубней. Заявитель: AGRICO U.A. (Нидерланды) (1995 г.) (<https://reestr.gosstrf.ru/sorts/8752990/>).

В качестве микропартнеров для создания растительно-микробных ассоциаций в серии экспериментов использовали коллекционные штаммы бактерий: *Azospirillum brasilense* SR8, SR64, SR87, Sp7^T, SR75, SR80, SR88, S27; *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T; *Azospirillum lipoferum* SR61, SR85, SR42; *Niveispirillum irakense* KBC1^T; *Azospirillum halopraeferens* Au4^T; *Azospirillum sp.* SR38; *Enterobacter cloacae* K7; *Pseudomonas chlororaphis* K3. Данные штаммы бактерий были взяты из коллекции свободноживущих почвенных микроорганизмов института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук № 1021 (WDCM – World Data Centre for Microorganisms) (<http://collection.ibppm.ru>) (Таблица 1). Так же изучали штамм *Rhizobium radiobacter* LCu4A. Кроме того, из гомогената отмытых корней картофеля сортов Невский и Кондор при участии автора в лаборатории иммунохимии ФИЦ СЦ ИБФРМ РАН были выделены 13 бактериальных изолятов в 2012 году и 158 изолятов в 2016 году.

2.1.2. Культивирование микроклонов растений картофеля *in vitro*

Исследования проводились в биотехнологической лаборатории кафедры «Растениеводство, селекция и генетика» Вавиловского университета.

Микрорастения картофеля для проведения экспериментов были получены из апикальных меристем и культивировались *in vitro* в контролируемых условиях среды по стандартной методике (Гончаров, 1981). Для поддержания коллекции использовалась питательная среда Мурасиге-Скуга (МС) (Murashige, 1962) без гормонов с содержанием сахарозы 30 г/л и агар-агара 7 г/л. Микрорастения культивировали при температуре 22-24°C на стеллажах с освещением люминесцентными лампами Flora с интенсивностью освещения 4-5 тыс. лк при 16-

часовом фотопериоде. Коллекция микроклонов картофеля в культуре *in vitro* поддерживалась путем микрочеренкования и пересадки на свежие питательные среды каждые 4-6 недель.

Таблица 1 – Коллекционные штаммы ризосферных бактерий

№ п/п	Штамм	Объект, из которого выделен штамм	Орган растения	Автор, место
<i>Azospirillum brasilense</i>				
1	SR8	Кострец безостый (<i>Bromus inermis L.</i>)	корни	Л.И. Позднякова, Л.С. Федорова, Россия
2	SR87	Пшеница твердая (<i>Triticum durum L.</i>)	проростки	Л.И. Позднякова, Л.С. Федорова, Россия
3	Sp7 ^T	Росичка лежачая (<i>Digitaria decumbens L.</i>)	корни	J. Dobereiner, Бразилия
4	SR75	Пшеница мягкая (<i>Triticum aestivum L.</i>)	проростки	Л.И. Позднякова, Л.С. Федорова, Россия
5	SR80	Пшеница мягкая (<i>Triticum aestivum L.</i>)	проростки	Л.И. Позднякова, Л.С. Федорова, Россия
6	SR88	Пшеница твердая (<i>Triticum durum L.</i>)	проростки	Л.И. Позднякова, Л.С. Федорова, Россия
7	S27	Эхиохилон (<i>Sericoctoma pauciflorum L.</i>)	корни	A.N. Lahiri, Индия
<i>Azospirillum lipoferum</i>				
8	SR61	Пшеница мягкая (<i>Triticum aestivum L.</i>)	корни	Л.И. Позднякова, Л.С. Федорова, Россия
9	SR 85	Пшеница мягкая (<i>Triticum aestivum L.</i>)	проростки	Л.И. Позднякова, Л.С. Федорова, Россия
10	SR42	Пшеница мягкая (<i>Triticum aestivum L.</i>)	корни	Л.И. Позднякова, Л.С. Федорова, Россия
<i>Niveispirillum irakense</i>				
11	KBC1 ^T	Рис посевной (<i>Oryza sativa L.</i>)	корни	C. Elmerich, Ирак
<i>Azospirillum halopraeferens</i>				
12	Au4 ^T	<i>Leptochloa fusca L.</i>	корни	B. Reinhold, Пакистан
<i>Azospirillum sp.</i>				
13	SR38	Ежа сборная (<i>Dactylis glomerata L.</i>)	проростки	Л.И. Позднякова, Л.С. Федорова, Россия
14	SR64	Пшеница мягкая (<i>Triticum aestivum L.</i>)	корни	Л.И. Позднякова, Л.С. Федорова, Россия
<i>Enterobacter cloacae</i>				
15	K7	Топинамбур (<i>Helianthus tuberosus L.</i>)	ризоплана	Е.В. Крючкова, Россия
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>				
16	K3	Кукуруза сахарная (<i>Zea mays L.</i>)	ризоплана	Е.В. Крючкова, Россия
<i>Azospirillum baldaniorum</i>				
17	Sp245	Пшеница (<i>Triticum sp</i>)	корни	V.L.D. Baldani, Бразилия

Для постановки экспериментов микрорастения картофеля в ламинар-боксе в асептических условиях черенковали таким образом, чтобы на каждом черенке была одна почка. Верхушечную почку не использовали. Микрочеренки переносили в пробирки с жидкой (без агар-агара) питательной средой МС без гормонов с содержанием сахарозы 30 г/л на мостики из фильтровальной бумаги или твердой питательной средой МС аналогичного состава с содержанием агар-агара 7 г/л.

2.1.3. Изучение коллекционных штаммов

Бактерии, способные использовать сахарозу в качестве единственного источника углерода, могут активно самостоятельно развиваться на сахарозосодержащей среде и ингибировать рост микрорастений, что является существенным ограничением использования бактерий для совместного культивирования с растениями в культуре *in vitro*. Поэтому предварительно проводили оценку способности бактерий к росту на среде с сахарозой. Коллекционные штаммы культивировали на твердой питательной среде МС без гормонов с содержанием сахарозы 30 г/л в чашке Петри в течение 2-3 суток. Затем визуально оценивали рост колоний на среде. Для дальнейшего исследования отбирали штаммы бактерий, которые не произрастали или ограниченно росли на питательной среде МС с сахарозой.

Совместно с сотрудниками лаборатории иммунохимии ФИЦ СНЦ ИБФРМ РАН изучали активность фермента ИУК-оксидазы в ферментной вытяжке по реакции Сальковского (Паламарчук, 1965). Ферментную вытяжку готовили следующим путем: навеску из растительной ткани 1 грамм измельчали в предварительно охлажденной ступке и добавляли охлажденный фосфатный буфер. Конечный объем гомогената нужно довести фосфатным буфером до 10 мл. Оставляли на 30 минут в холодильной камере. После гомогенат центрифугировали в течение 10 минут. К реакционной смеси добавляли 0,2 мл ферментной вытяжки и реактив Сальковского. Сразу же отбирали по 0,1 мл в лунку планшета. Определение синтеза ауксина из триптофана ризосферными бактериями проводили спектрофотометрическим методом с реактивом Сальковского. 0,3 г триптофана растворяли в 30 мл воды на

мешалке с подогревом. Добавляли реактив Сальковского 200 мкл. Оптическую плотность проверяли в ридере при длине волны 492 и 540 нм.

Продукцию ИУК и фиксацию азота бактериями оценивали на предмет их способности синтезировать ИУК. С этой целью их выращивали при 35°C в течение 5 суток в жидкой малатной среде, содержащей 180 мкг мл⁻¹ l-триптофана (Zakharova, 2000). Культуральную жидкость анализировали на содержание ИУК высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) (*Ochrobactrum cytisi* IPA7.2..., 2019) с прибором Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, США).

Активность ферментов фиксации азота бактериями проводилась в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (Санкт-Петербург, Россия) (ВНИИСХМ). Способность к азотфиксации оценивали по росту бактерий на безазотистой среде Nfb (малатная среда без хлорида аммония) и по активности ацетилен-редукции 5-суточной бактериальной суспензией как описано (Belimov et al., 1995) с помощью газового хроматографа GC-2010 (Shimadzu, Япония).

2.1.4. Выделение изолятов бактерий из корней картофеля

Выделение инокулятов и подготовка суспензий бактерий выполнялись в ФИЦ СЦ ИБФРМ РАН сотрудниками лаборатории иммунохимии при участии автора.

Изоляты ризосферных бактерий были выделены из растений картофеля сорта Невский и Кондор. Растения отбирали на трех стадиях: появление всходов, бутонизация-цветение, цветение. Растения с корнями и комом земли были выкопаны в полевых условиях: в Красноармейском районе Саратовской области (51.1883, 45.5124), тип почвы – чернозем южный солонцеватый; в Марксовском районе Саратовской области (51.613483, 46.542159), тип почвы – темно-каштановый; в Энгельском районе Саратовской области (51.390279, 46.126442), тип почвы - темно-каштановый. Корни растений 5 раз по 10 минут отмывали стерильной дистиллированной водой на качалке и стерилизовали в колбе со

стеклянным песком 2 раза по 10 минут. Для отмыва корней использовали 7 колб по 100 мл воды. Одну часть корней растирали в ступке со стеклом и 2 мл PBS. Из четвертого, пятого, шестого разведений производился высеv на твѐрдую малатную среду MSM (Döbereiner, 1976). Питательная среда содержит в г/л: малат Na 5; K_2HPO_4 0,4; K_2HPO_4 0,4; NaCl 0,1; MgSO_4 0,2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,002 и NH_4Cl 1. (pH 6,8–7,0). Вторую часть корней стерилизовали в спирте 70% 5 минут, далее хлорным раствором 5 минут, потом – в спирте 5 минут и в конце отмывали дисциллированной водой 10 минут. После чего получали их гомогенат. Буфер готовили в 6 кратном разведении. Из второго и третьего разведений производился высеv на твѐрдую малатную среду MSM. Изоляты получали отсевом культуры из отдельных колоний. Один стерильный корень помещали на питательную среду для роста колоний бактерий.

Выросшие изоляты проверяли на рост в жидкой безазотистой среде Nfb. Состав среды аналогичен среде MSM, но без добавления NH_4Cl (Döbereiner, 1976). Способность к утилизации сахарозы определяли посевом на среду MSM с заменой малата на сахарозу 10 г/л.

2.1.5. Культивирование бактериальных штаммов и инокуляция микрочеренков картофеля

Подготовка суспензий бактерий выполнялись в ФИЦ СИЦ ИБФРМ РАН сотрудниками лаборатории иммунохимии при участии автора. Для инокуляции микрорастений картофеля культуры бактерий выращивали до конца экспоненциальной фазы (18 часов) на жидкой среде Nfb при 30°C на роторном шейкере с частотой вращения 120 оборотов. Клетки осаждали центрифугированием и переносили в 0,12 М фосфатный буфер (PBS) (pH 7,2), содержащий K_2HPO_4 0,43 г/л; Na_2HPO_4 , 1,68 г/л; NaCl 7,2 г/л. Для промывки от жидкой среды бактерии дважды центрифугировали в PBS. При микрочеренковании растений бактериальную суспензию добавляли по 0,1 мл в пробирки с 10 мл питательной среды с расчетом, чтобы итоговая концентрация бактерий в питательной среде составила 10^6 кл/мл.

Скрининг изолятов проводили по показателям отсутствия фитотоксичного влияния на микрочеренки картофеля в культуре *in vitro*, а также их способности к стимулированию роста побегов и корней. Исследование изолятов проводили на жидкой питательной среде МС совместно с растениями картофеля сортов Невский и Кондор. В течение 10 суток визуально проверяли фитотоксичность и ингибирование. Отобранные штаммы и изоляты культивировали с микрорастениями картофеля в течение 30 суток. В качестве контроля использовали стерильные растения инокулированные бактериями (с добавлением буфера PBS в том же объеме, что при инокуляции бактериями). В качестве положительного контроля использовали микрорастения, ассоциированные с бактериями *A. baldaniorum* Sp245 аналогично опытным вариантам.

2.1.6. Выявление бактерий в составе растительно-микробной ассоциации

Для анализа сформированной растительно-микробной ассоциации совместно с сотрудниками ФИЦ СНЦ ИБФРМ РАН проводили оценку содержания бактерий на сформировавшихся на микрочеренках картофеля адвентивных корнях после 30 суток совместного культивирования *in vitro*.

Бактерии на корнях растений обнаруживали методом иммуноферментного анализа (ИФА) после инкубирования в течение 10 минут при 100°C гомогенатов корней для инактивации растительной пероксидазы (Assessing the efficacy..., 2016). Для определения бактериальных клеток в корневой системе растений использовали полученные в работе поликлональные кроличьи антитела к фиксированным 2%-ным глутаровым альдегидом клеткам и флуоресцентно-меченные анти-кроличьи антитела (Alexa Fluor® 532, Invitrogen, США) (Бактериальный изолят из..., 2017). Количество бактерий определяли соотношением оптической плотности при 492 нм растворов после ферментативных реакций для гомогенатов корней и суспензиями бактерий с известной концентрацией.

Идентификацию бактерий на корнях растений также проводили методом иммунофлуоресцентного анализа с использованием штаммо-специфичных антител,

как описано (Wheat root colonization..., 2010). Контролем служили инокулированные и инокулированные корни растений, обработанные неспецифическими антителами. Неспецифическую сорбцию антител блокировали 2-часовой инкубацией отрезков корней при комнатной температуре в 0,05 % растворе полиэтиленгликоля (MW 20000) в фосфатном буфере.

Для иммунофлуоресцентной микроскопии применяли конфокальный лазерный микроскоп TCS SP5 (Leica-microsystems, Германия) на базе ЦКП «Симбиоз» ФИЦ СНЦ ИБФРМ РАН. Для регистрации сигналов использовали аргоновый мультилинейный лазер с полосой возбуждения 488 нм (мощность 20%), гелий-неоновый лазер 543 нм (мощность 20%). Регистрацию эмиссии осуществляли по каналам 496-506 нм и 553-580 нм. Использовали сухой воздушный объектив x10. XY сканирование проводили с разрешением 1024x1024 и 2048x2048 и цифровом увеличении x1000- x3000. Обработку полученных изображений проводили на рабочей станции конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Германия). Для иммунофлуоресцентной детекции присутствия и локализации бактерий *in situ* на корнях картофеля использовали флуоресцентно меченые козьи анти-кроличьи антитела меченные TRITC.

Иммуномечение инокулированных корней проростков картофеля проводили по стандартной методике (протоколы Abscam), для чего корни разрезали на примерно одинаковые фрагменты длиной 15-20 мм. В качестве контроля использовали стерильные корни, а также корни инокулированных проростков, обработанные неспецифическими Ат. Окраска проводилась в 6-луночных планшетах, все этапы окраски и промывки проводились с использованием шейкера-инкубатора, для инкубации с антителами и остальными растворами добавлялось по 500 мкл раствора в лунку. Неспецифическую активность блокировали 1-часовой инкубацией при комнатной температуре в блокирующем растворе Blocking solution (3% BSA в PBS). Инкубацию с первичными антителами проводили в разведении 1: 200 (кроличьи Ат на ЛПС штамма Sp245 и IPA 7.2) в AB-solution (0,2% Triton X-100 и 0,3% BSA в PBS) следующим образом: инкубировали ночь при 4°C, затем продолжали инкубацию 2 часа при комнатной

температуре. Инкубацию с вторичными антителами в рабочем разведении 1:500 (меченые TRITC козы анти-кроличьи антитела («Abcam», США) в AB-solution проводили 2 часа при комнатной температуре. На всех этапах нанесения антител осуществляли 3-кратную промывку образцов 15-минутной инкубацией с раствором Washing solution (0,2% Triton X-100 в PBS). Завершающим этапом был перенос корней на стекло и нанесение 15-20 мкл монтирующей жидкости (50% глицерин в PBS), препарат накрывали покровным стеклом и микроскопировали.

2.1.7. Оценка рост-стимулирующей активности бактерий в отношении микрорастений картофеля

Для оценки эффективности ассоциативного растительно-микробного взаимодействия в условиях культуры *in vitro* после микрочеренкования и инокуляции бактериями каждые 10 суток снимали морфометрические показатели микрорастений (длина побега (мм), средняя длина корней (мм), количество узлов на побеге (шт.), количество корней (шт.)). Эффект влияния бактерий по показателям роста растений рассчитывали в процентах по отношению к контрольному варианту (без инокуляции) или к варианту с инокуляцией *A. baldaniorum* Sp245.

Для изучения влияния бактерий на адаптационную способность микрорастений в условиях *ex vitro*, сформировавшиеся растения высаживали в сосуды с почвой и выращивали в условиях оранжереи с освещением люминисцентными лампами Floros при фотопериоде 16 часов и температуре 22-25°C. Через 10 и 20 суток измеряли длину побегов (мм), количество узлов (шт.) и площадь трех верхних листьев (мм²).

Для изучения влияния бактериальных штаммов и изолятов на рост растений в грунте и продуктивность мини-клубней адаптированные в условиях оранжереи в сосудах с почвой (*ex vitro*) микрорастения высаживали в грунтовую каркасную теплицу в 3-ей декаде мая. Растения картофеля высаживали в предварительно нарезанные борозды. Расстояние между растениями составляло между рядами 35 см в ряду 20 см. В период вегетации проводили уход за растениями: полив, прополку, рыхление почвы, окучивание, подкормку комплексом удобрений, обработку препаратами против болезней и вредителей. В фазу активного роста (3

недели после высадки), бутонизации-начала цветения оценивали морфологические параметры растений: высота побегов (см), количество побегов (шт.), количество листьев (шт.), площадь листьев (см²). После уборки мини-клубней оценивали количество клубней на растении (шт.), вес клубней (г), максимальный и минимальный диаметр клубней (мм).

2.1.8. Идентификация изолятов

Идентификацию бактериальных изолятов проводили по совокупности их морфологических, физиологических и биохимических признаков, а также с использованием анализа нуклеотидных последовательностей генома.

Таксономическая идентификация бактериальных штаммов молекулярно-генетическими методами проводилась в Казанском институте биохимии и биофизики – обособленном структурном подразделении Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук» (Казань, Россия) (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН) и Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (Санкт-Петербург, Россия).

Геномную ДНК штаммов выделяли из клеток, культивированных на твердой питательной среде, и очищали согласно описанию (Dedysh, 1998). Фрагменты ДНК гена 16S рРНК подтверждали ПЦР-амплификации с использованием универсальных праймеров (529R, 350F и 1492R) и соответствующих протоколов. После сборки полученная последовательность ДНК гена 16S рРНК штаммов депонирована в GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Бактериальный изолят из..., 2017).

При выравнивании исходный набор гомологичных последовательностей ДНК гена 16S рРНК штаммов – представителей родов, близкородственных изолятам, составляли с применением технологии BLASTN (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=TargetLociBlast). Кроме того, при отборе референтных штаммов для филогенетического анализа учитывалось их соответствие базе данных SILVA

(<https://www.arb-silva.de/>). Приведенные на этом сайте биоинформационные ресурсы использовались для сравнения филогенетических конструкций, полученных традиционными методами и с помощью анализа на основе специально разработанных методов выравнивания последовательностей 16S рРНК (Pruesse, 2012). При сравнительном изучении последовательностей ДНК и РНК применяли алгоритмы попарного и множественного выравнивания: <http://www.ezbiocloud.net/taxonomy>, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/> и http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html.

Для построения филогенетического дерева по последовательностям 16S рРНК (<https://www.arb-silva.de/aligner>) либо их генов применялись методы MrBayes (http://www.phylogeny.fr/one_task.cgi?task_type=mrbayes) и Neighbor Joining из интегрированного пакета программ филогенетического анализа MEGA v.6 (<http://www.megasoftware.net/mega.php>). Эти построения выполняли по множественным выравниваниям, полученным с использованием алгоритма Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) и ресурса SINA Alignment Service (<https://www.arb-silva.de/aligner>), расположенного на портале SILVA (<https://www.arb-silva.de>) (Бактериальный изолят из..., 2017).

2.1.9. Статистическая обработка

Статистическую оценку результатов проводили математическим методам однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа со сравнением частных средних по тесту Дункана с использованием пакета программ AGROS версия 2.10 (Пакет программ статистического..., 2000). Во всех экспериментах с растениями каждый вариант опыта анализировался в трехкратной повторности не менее, чем по 10 ратений в каждой повторности (в общей сложности по варианту опыта $n=30$). Каждый эксперимент повторен не менее 2 раз.

2.2. Результаты исследований и их обсуждение

2.2.1. Первичный скрининг коллекционных штаммов PGPR по ростостимулирующей способности в отношении микрорастений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro*

Целью исследования являлся скрининг штаммов бактерий (Таблица 2) из коллекции ризосферных микроорганизмов ФИЦ СЦ ИБФРМ РАН на пригодность к совместному культивированию с микрорастениями картофеля в условиях *in vitro*, а также оценка влияния инокуляции микрорастений картофеля этими штаммами на морфометрические параметры в условиях *in vitro* и *ex vitro*. Штаммы исследовали в несколько этапов.

Таблица 2 – Изучаемые штаммы микроорганизмов и их способность утилизировать сахарозу

№ п.п.	Вид	Штамм	Способность утилизировать сахарозу
1.	<i>Azospirillum brasilense</i>	SR8	-
2.		SR64	+
3.		SR87	-
4.		Sp7 ^T	-
5.		SR75	+
6.		SR80	-
7.		SR88	-
8.		S27	-
9.	<i>Azospirillum baldaniorum</i>	Sp245	-
10.	<i>Azospirillum lipoferum</i>	SR61	+
11.		SR 85	-
12.		SR42	-
13.	<i>Niveispirillum irakense</i>	KBC1 ^T	+
14.	<i>Azospirillum halopraeferens</i>	Au4 ^T	-
15.	<i>Azospirillum sp.</i>	SR38	-
16.	<i>Enterobacter cloaceae</i>	K7	+
17.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	K3	+
18.	<i>Rhizobium radiobacter</i>	LCu4A	+

Ризосферные бактерии при культивировании на искусственной питательной среде, содержащей различные источники углерода, создают колонии, потребляют питательные элементы и выделяют продукты обмена. В результате при совместном

культивировании микрорастений с бактериями, потребляющими сахарозу, происходит контаминация культуры. Поэтому для создания активных растительно-микробных ассоциаций в культуре *in vitro* необходим подбор ризосферных ростостимулирующих бактерий, не способных к потреблению сахарозы и самостоятельному росту на питательной среде для культивирования микрорастений. Поэтому, штаммы оценивали по их способности использовать сахарозу в качестве источника углерода на плотной среде МС. Через 3 суток обнаружили, что из 18 изученных штаммов (см. Таблица 2) 11 штаммов не росли на среде с сахарозой, а другие 7 штаммов (*A. brasilense* SR64 и SR75, *A. lipoferum* SR61, *R. radiobacter* LCu4a, *P. chlororaphis* K3, *E. cloacae* K7, и *N. irakense* KBC1^T) росли на среде МС (Рисунок 1). Эти штаммы не были использованы в дальнейших экспериментах, так как инокуляция растений *in vitro* сопровождалась увеличением бактериальных клеток и помутнением среды, что является негативным фактором при микроклональном размножении растений (Рисунок 2). На рисунке 1 виден рост бактериальных колоний на среде. Под номером 10 штамм *A. baldaniorum* Sp245 не был обнаружен на среде с сахарозой.

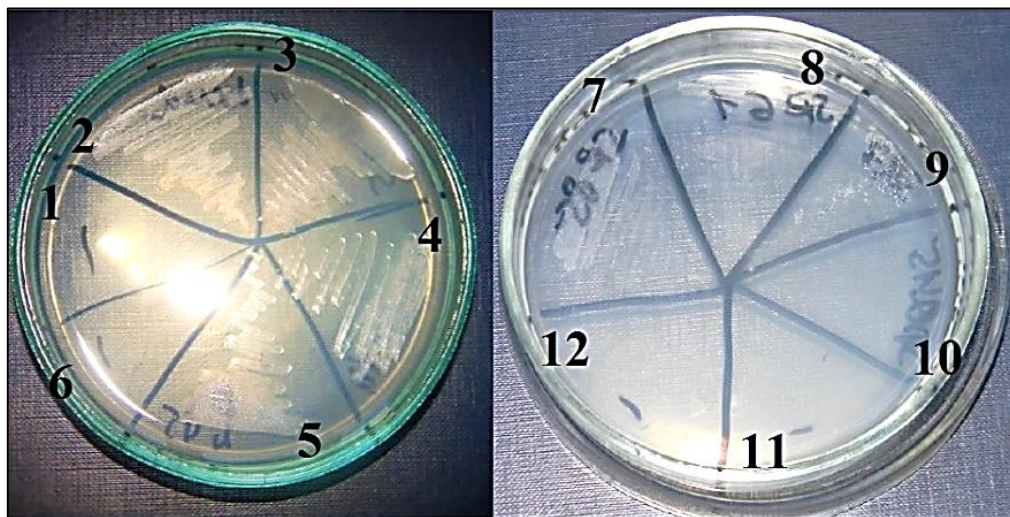


Рисунок 1 – Изучаемые штаммы микроорганизмов и их способность утилизировать сахарозу на питательной среде MS: 1, 6, 11, 12 – контроль (чистая питательная среда), 2 – *A. brasilense* SR64, 3 – *A. brasilense* SR75, 4 – *R. radiobacter* LCu4a, 5 – *E. cloacae* K7, 7 – *N. irakense* KBC1^T, 8 – *A. lipoferum* SR61, 9 – *P. chlororaphis* K3, 10 – *A. baldaniorum* Sp245



Рисунок 2 – Контаминация питательной среды MS микроорганизмами

На рисунке 2 видно разрастание бактерий в питательной среде. В таких условиях происходит ингибирование роста микрорастений.

Далее в нескольких последовательных экспериментах изучали эффективность ассоциативного взаимодействия микрорастений картофеля сорта Невский с коллекционными ризосферными бактериями в культуре *in vitro*.

В первом эксперименте изучали влияние 5 штаммов: *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* Sp7^T, *A. brasilense* S27, *A. brasilense* SR80 и *A. lipoferum* SR42. Установлено достоверное влияние штаммов на ростовые процессы микрорастений (Таблицы 3, 4).

Между вариантами обнаружены достоверные различия. Наилучшие показатели роста оказались у микрорастений, инокулированных штаммами ризобактерий *A. brasilense* Sp7^T, *A. baldaniorum* Sp245. Ниже всех показатели роста были у контроля, кроме средней длины корня на 10 сутки. По длине побега особенно отличился вариант со штаммом *A. brasilense* Sp7^T в течение всего совместного культивирования. На 10 сутки длина побега увеличилась на 10 %, на 20 сутки – 28%, на 30 сутки – 60% (здесь и далее рассчитано превышение значений у описываемого варианта по отношению к контрольному варианту). Максимальная

длина корня была так же в варианте со штаммом *A. brasilense* Sp7^T (превышение по суткам на 3, 22 и 60%) в течение всего опыта по сравнению с остальными вариантами. Штамм *A. baldaniorum* Sp245 увеличивал длину побега на 10 сутки на 6%, на 20 сутки на 23%, на 30 сутки на 61%. Данный штамм ингибировал длину корня на 10 сутки на 10%, но на 20 сутки оказывал положительное действие на 8%, а на 30 сутки был на уровне с контролем.

Таблица 3 – Влияние коллекционных штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* SP7^T, *A. brasilense* S27, *A. brasilense* SR80, *A. lipoferum* SR42 на длину побега и корней микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Длина побега, мм			Средняя длина корня, мм		
	10 сутки	20 сутки	30 сутки	10 сутки	20 сутки	30 сутки
Контроль	48,50a	57,50a	57,50a	39,00c	41,50a	47,25a
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	51,25bc	71,00b	92,75d	34,75a	44,75b	47,50a
<i>A. brasilense</i> Sp7 ^T	53,25d	73,50d	94,50e	40,25d	51,00e	75,50e
<i>A. brasilense</i> S27	52,25cd	73,50d	78,50b	37,75b	50,50de	56,50b
<i>A. brasilense</i> SR80	49,50a	72,75cd	83,25c	38,25bc	44,50b	70,50d
<i>A. lipoferum</i> SR42	48,50a	58,25a	83,25c	37,25b	47,75c	65,00c
F _{факт.}	22,433*	314,471*	1309,431*	24,920*	106,769*	379,901*
HCP _{0,05}	1,27	1,30	1,10	1,12	1,08	1,83

Таблица 4 – Влияние коллекционных штаммов *A. baldaniorum* SP245, *A. brasilense* SP7^T, *A. brasilense* S 27, *A. brasilense* SR80, *A. lipoferum* SR 42 на количество узлов на побегах и корней у микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Количество узлов, шт.			Количество корней, шт.		
	10 сутки	20 сутки	30 сутки	10 сутки	20 сутки	30 сутки
Контроль	5,10a	7,30a	7,55a	4,25b	4,50a	5,05a
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	6,10bcd	8,40d	9,25bc	5,30e	6,05c	9,00f
<i>A. brasilense</i> Sp7 ^T	5,40a	8,15c	10,05d	4,20b	6,00c	8,00e
<i>A. brasilense</i> S27	6,45d	8,05bc	9,20bc	4,30b	6,15c	6,90c
<i>A. brasilense</i> SR80	6,20cd	8,05bc	9,40c	4,55c	6,00c	7,50d
<i>A. lipoferum</i> SR42	5,25a	7,90b	9,00b	3,70a	4,20a	6,50b
F _{факт.}	19,064*	40,059*	62,287*	59,296*	207,292*	152,488*
HCP _{0,05}	0,39	0,17	0,31	0,22	0,18	0,39

На 10 сутки наблюдались достоверные различия между изучаемыми вариантами по количеству узлов. Наибольшее количество узлов в варианте со

штаммом *A. brasilense* S27 (26%). На 20 и 30 сутки вариант со штаммом *A. brasilense* Sp7 имел наибольшее количество узлов (12%, 33%). На 10 сутки отличился вариант со штаммом *A. brasilense* SR80, у которого было больше корней на побеге (7%). На 20 сутки по количеству корней варианты со штаммами *A. brasilense* Sp7^T, *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* SR80, *A. brasilense* S27 имели одинаковое количество корней. На 30 сутки вариант со штаммом *A. baldaniorum* Sp245 имел наибольшее количество корней в отличие от контроля на 78%.

После 30 суток культивирования микрорастения высадили в почву. На 10-е и 20-е сутки выращивания в условиях *ex vitro* провели измерение морфометрических параметров растений картофеля (Таблица 5).

Таблица 5 – Влияние коллекционных штаммов *A. baldaniorum* SP245, *A. brasilense* SP7^T, *A. brasilense* S 27, *A. lipoferum* SR 42, *A. brasilense* SR80 на рост растений картофеля сорта Невский в культуре *ex vitro*

Вариант	Длина побега, мм		Количество листьев, шт.		Площадь листовой поверхности, мм ²	
	10 сутки	20 сутки	10 сутки	20 сутки	10 сутки	20 сутки
Контроль	31,50a	71,25a	6,40a	8,00a	262,99a	409,19a
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	61,50c	129,25b	6,65ab	10,00c	855,51e	1457,75d
<i>A. brasilense</i> Sp7 ^T	50,62b	141,00cd	8,65e	11,50e	274,12ab	599,04ab
<i>A. brasilense</i> S27	76,25d	142,62d	7,23bc	9,00b	341,09b	620,08ab
<i>A. lipoferum</i> SR42	63,50c	118,00b	8,40de	10,00c	475,32d	799,13b
<i>A. brasilense</i> SR80	64,50c	125,75b	7,80cd	10,75d	453,66cd	1135,57c
F _{факт.}	92,575*	52,619*	16,894*	71,710*	93,046*	21,037*
НСР _{0,05}	4,79	10,89	0,67	0,44	68,79	256,48

В течение всего опыта наблюдались достоверные различия между вариантами. Контрольные растения имели наименьшие показатели морфометрических параметров. По признаку «Длина побега» максимальное положительное влияние по сравнению с контролем (без инокуляции) показал штамм *A. brasilense* S27 на 10 и 20 сутки (142%, 99% соответственно) и *A. brasilense* Sp7^T на 20 сутки (98%). По признаку «Количество листьев» отличился вариант с инокуляцией штаммом *A. brasilense* Sp7^T (35%, 43%). По признаку «Площадь

листовой поверхности» лучшим оказалось влияние штамма *A. baldaniorum* Sp245 (225%, 256%).

Таким образом, для дальнейшего исследования по данным первого эксперимента отобрали штаммы *A. brasilense* Sp7^T, S27, *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* SR80.

В следующем эксперименте исследовали 4 коллекционных штамма. В таблицах 6, 7 представлены результаты изучения в культуре *in vitro*.

Таблица 6 – Влияние коллекционных штаммов *A. brasilense* SR8, *A. lipoferum* SR85, *A. brasilense* SR87, *A. brasilense* SR88, на длину побегов и корней микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Длина побега, мм			Средняя длина корня, мм		
	10 сутки	20 сутки	30 сутки	10 сутки	20 сутки	30 сутки
Контроль	31,69bc	53,72	81,52	23,75	37,08	57,83bc
<i>A. brasilense</i> SR8	25,75a	51,53	84,35	22,14	39,31	52,61abc
<i>A. lipoferum</i> SR85	26,53a	55,28	84,48	21,81	38,89	50,22abc
<i>A. brasilense</i> SR87	32,44c	58,19	82,61	25,42	39,72	47,39a
<i>A. brasilense</i> SR88	25,75a	53,75	86,74	23,67	41,94	59,78c
F _{факт.}	3,560*	1,028	0,955	1,607	1,097	2,384*
HCP _{0,05}	4,64	-	-	-	-	9,11

Таблица 7 – Влияние коллекционных штаммов *A. brasilense* SR8, *A. lipoferum* SR85, *A. brasilense* SR87, *A. brasilense* SR88, на количество узлов на побеге и корней у микрорастения картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Количество узлов, шт.			Количество корней, шт.		
	10 сутки	20 сутки	30 сутки	10 сутки	20 сутки	30 сутки
Контроль	7,58	8,03b	10,13abc	4,14	6,19	6,30a
<i>A. brasilense</i> SR8	5,19	7,22a	9,65a	3,50	5,58	7,04ab
<i>A. lipoferum</i> SR85	5,25	7,17a	9,78abc	3,56	5,28	6,74a
<i>A. brasilense</i> SR87	7,61	7,64ab	9,26a	4,08	5,89	7,83bcd
<i>A. brasilense</i> SR88	5,17	7,17a	10,61c	3,75	5,83	8,13cd
F _{факт.}	0,881	3,643*	3,226*	1,674	1,621	7,300*
HCP _{0,05}	-	0,50	0,83	-	-	0,83

По результатам видно, что особых отличий вариантов от контроля на большинстве этапов нет. На 10 сутки по длине побега на уровне с контролем был штамм *A. brasilense* SR87. На 30 сутки по длине корня на уровне с контролем были

штаммы *A. brasilense* SR8, *A. lipoferum* SR85, *A. brasilense* SR88. На 20, 30 сутки по длине побега нет достоверных различий между вариантами, на 10 и 20 сутки по длине корня так же нет достоверных различий между вариантами.

На 10 сутки по количеству узлов не обнаружено достоверных различий между вариантами, а на 20 сутки на уровне с контролем были варианты с инокуляцией штаммом *A. brasilense* SR87. По признаку «Количество корней» на 10, 20 сутки нет достоверных различий между вариантами. На 30 сутки имел наибольшее преимущество вариант с *A. brasilense* SR88 (29%).

Далее инокулированные растения изучали в условиях *ex vitro* (Таблица 8).

Таблица 8 – Влияние коллекционных штаммов *A. brasilense* SR8, *A. lipoferum* SR85, *A. brasilense* SR87, *A. brasilense* SR88, на микрорастения картофеля сорта Невский в культуре *ex vitro*

Вариант	Длина побега, мм		Количество листьев, шт.		Площадь листовой поверхности, мм ²	
	10 сутки	20 сутки	10 сутки	20 сутки	10 сутки	20 сутки
Контроль	59,00	106,00d	6,90ab	9,40c	386,22a	1011,08a
<i>A. brasilense</i> SR8	52,00	82,00abc	6,30a	8,60ab	759,88c	1375,27bc
<i>A. lipoferum</i> SR85	40,50	70,00a	6,40a	8,40ab	525,95abc	1375,32c
<i>A. brasilense</i> SR87	50,00	91,00c	7,60b	10,40d	311,64a	1381,60c
<i>A. brasilense</i> SR88	52,00	70,00a	6,10a	8,00a	365,02a	951,42a
F _{факт.}	1,445	9,798*	3,049*	11,473*	4,862*	5,663*
HCP _{0,05}	-	12,90	0,87	0,74	269,43	279,87

В условиях *ex vitro* есть достоверные различия между вариантами, кроме показателя «Длина побега на 10 сутки». На 20 сутки контрольные растения имели наибольшую длину побега. Наибольшее количество листьев наблюдалось в варианте со штаммом *A. brasilense* SR87 (+11% к контролю). По признаку «Площадь листовой поверхности» на 20 сутки наибольшее положительное влияние оказали штаммы *A. brasilense* SR8 (36%), *A. lipoferum* SR85 (36%), *A. brasilense* SR87 (36%).

Таким образом, по результатам данного эксперимента для дальнейшего исследования отобрали штамм *A. brasilense* SR88, так как он оказывал положительное влияние по большинству показателей.

В третьем эксперименте изучили 3 штамма. Было проведено исследование в культуре *in vitro* (Таблицы 9, 10).

Таблица 9 – Влияние коллекционных штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *Azospirillum* sp. SR38, *A. halopraeferens* Au4 на длину побегов и корней у микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Длина побега, мм			Средняя длина корня, мм		
	10 сутки	20 сутки	30 сутки	10 сутки	20 сутки	30 сутки
Контроль	28,00b	65,42	93,92	30,83c	35,29d	49,42d
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	30,28b	65,42	94,50	33,17c	34,71d	47,69cd
<i>Azospirillum</i> sp SR38	28,47b	63,42	88,00	26,00b	27,57b	39,58b
<i>A. halopraeferens</i> Au4	23,47a	63,53	90,04	20,33a	22,29a	33,35a
F _{факт.}	5,201*	0,246	1,756*	10,347*	25,209*	9,553*
HCP _{0,05}	3,25	-	-	4,42	3,01	5,87

Таблица 10 – Влияние коллекционных штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *Azospirillum* sp. SR38, *A. halopraeferens* Au4 на количество узлов на побеге и корней у микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Количество узлов, шт.			Количество корней, шт.		
	10 сутки	20 сутки	30 сутки	10 сутки	20 сутки	30 сутки
Контроль	4,57b	8,51c	9,83	3,77b	8,38a	10,35a
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	4,77b	8,80c	10,00	3,00ab	9,94bc	12,04c
<i>Azospirillum</i> sp. SR38	4,60b	8,03ab	10,20	2,77a	9,88bc	10,00abc
<i>A. halopraeferens</i> Au4	4,07a	7,69a	9,77	2,23a	8,81ab	10,22a
F _{факт.}	5,686*	7,614*	1,071	4,067*	3,285*	3,128*
HCP _{0,05}	0,34	0,44	-	0,80	1,22	1,30

По признаку «Длина побега» на 20, 30 сутки не было достоверных отличий между вариантами. На 10 сутки на уровне с контролем были штаммы *A. baldaniorum* Sp245, *Azospirillum* sp. SR38. В варианте со штаммом *A. halopraeferens* Au4 у микрорастений картофеля была наименьшая длина побега (на 16% меньше контроля) и корня на 10 сутки (34%), на 20 сутки (37%), на 30 сутки (32%). Данный штамм не проявлял положительного влияния на рост микрорастений. На уровне с контрольными микрорастениями был вариант со штаммом *A. baldaniorum* Sp245.

Штамм *A. halopraeferens* Au4 оказывал ингибирующее действие на количество узлов и корней у микрорастений картофеля. Остальные варианты были

на уровне с контролем. На 20 и 30 сутки варианты с контрольными растениями отличались по количеству корней. Наибольшее количество корней было в варианте со штаммом *A. baldaniorum* Sp245 на 20 сутки (9 шт.) и на 30 сутки (12 шт.).

В таблице 11 представлены результаты измерения растений, высаженных в сосуды с почвой и выращенных в условиях *ex vitro*.

Таблица 11 – Влияние коллекционных штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *Azospirillum* sp. SR38, *A. halopraeferens* Au4 бактерий на рост микрорастения картофеля сорта Невский в условиях *ex vitro*

Вариант	Длина побега, мм		Количество листьев, шт.		Площадь листовой поверхности	
	10 сутки	20 сутки	10 сутки	20 сутки	10 сутки	20 сутки
Контроль	100,25	154,00	8,00	10,60b	1354,24c	1870,13a
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	98,90	145,75	7,65	10,30ab	1467,95c	2524,36c
<i>Azospirillum</i> sp SR38	87,90	146,00	7,05	9,30a	1125,47ab	1490,19a
<i>A. halopraeferens</i> Au4	93,50	133,00	7,50	9,60ab	1272,56bc	2346,89bc
F _{факт.}	2,447	1,332	1,060	2,983*	9,740*	12,639*
НСР _{0,05}	-	-	-	0,99	212,42	365,24

В условиях *ex vitro* в течение всего опыта по длине побега и по количеству листьев на 10 сутки не обнаружено достоверных различий. На 20 сутки существенных различий не было между вариантами по длине побегов. Площадь листовой поверхности была максимальной у контрольных растений и в вариантах со штаммами *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4 на 10 сутки. На 20 сутках наибольшую площадь имели растения в вариантах со штаммами *A. baldaniorum* Sp245 (35%) и *A. halopraeferens* Au4 (25%) по сравнению с контролем. В данном опыте для дальнейшего исследования не были отобраны штаммы.

2.2.2. Изучение ростостимулирующей способности отобранных коллекционных штаммов в отношении микрорастений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro*

В следующей серии экспериментов проводили повторное изучение ранее отобранных штаммов, имевших наибольшее положительное влияние на рост растений картофеля.

В таблицах 12, 13 показаны результаты изучения влияния отобранных штаммов на микрорастения картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*.

Таблица 12 – Влияние коллекционных штаммов *A. brasilense* Sp7^T, *A. brasilense* S27, *A. brasilense* SR80, *A. brasilense* SR88 на длину побегов и корней у микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Длина побега, мм			Средняя длина корня, мм		
	10 сутки	20 сутки	30 сутки	10 сутки	20 сутки	30 сутки
Контроль	27,20	61,83с	68,07а	21,25bc	35,75b	40,00а
<i>A. brasilense</i> Sp7 ^T	23,93	51,17а	70,13а	17,10ab	29,50а	51,25b
<i>A. brasilense</i> S27	26,53	52,93ab	73,03ab	15,30а	35,25b	50,50b
<i>A. brasilense</i> SR80	28,97	58,03bc	71,90ab	23,80cd	38,50bc	61,50d
<i>A. brasilense</i> SR88	29,30	57,10bc	77,70b	26,45d	41,00с	59,75cd
F _{факт.}	2,183	4,591*	2,595*	6,695*	8,854*	14,632*
HCP _{0,05}	-	5,17	6,76	4,48	3,75	5,70

Таблица 13 – Влияние коллекционных штаммов *A. brasilense* Sp7^T, *A. brasilense* S27, *A. brasilense* SR80, *A. brasilense* SR88 бактерий на количество узлов на побеге и корней у микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Количество узлов, шт.			Количество корней, шт.		
	10 сутки	20 сутки	30 сутки	10 сутки	20 сутки	30 сутки
Контроль	4,44	7,24	8,48b	4,00ab	6,08ab	7,00b
<i>A. brasilense</i> Sp7 ^T	4,28	7,16	7,84а	3,48а	5,68а	5,84а
<i>A. brasilense</i> S27	4,24	7,00	8,48b	3,68а	6,40ab	6,92b
<i>A. brasilense</i> SR80	4,76	7,64	8,96bc	4,72bc	7,80cd	8,80cd
<i>A. brasilense</i> SR88	4,72	7,60	9,12с	5,12с	8,00d	9,00d
F _{факт.}	2,105	1,678	5,703*	4,054*	7,395*	13,477*
HCP _{0,05}	-	-	0,52	0,88	0,96	0,92

По признаку «Длина побега» на 10 сутки нет достоверных различий между вариантами. Микрорастения, инокулированные штаммом *A. brasilense* Sp7^T на 20 сутки, имели длину 51,17 мм, что меньше контрольных растений на 17%. На 30 сутки данный вариант был на уровне с контролем. Мериклоны, инокулированные штаммами *A. brasilense* S27, *A. brasilense* SR80, *A. brasilense* SR88, были на уровне с контролем по длине побега. По длине корня отличились варианты мериклонов растений, инокулированные штаммами *A. brasilense* SR80, *A. brasilense* SR88. В данных вариантах у растений наблюдалась наибольшая длина корня. На 10 сутки в

вариантах с двумя штаммами бактерий отмечено превышение к контролю: *A. brasilense* SR80 на 12%, *A. brasilense* SR88 на 24%. На 20 сутки в вариантах с *A. brasilense* SR80 на 8%, *A. brasilense* SR88 на 15%. На 30 сутки в вариантах с *A. brasilense* SR80 на 53%, *A. brasilense* SR88 на 49%.

На 10 и 20 сутки по количеству узлов не обнаружено достоверного различия между вариантами. На 30 сутки наименьшее количество узлов имел вариант со штаммом *A. brasilense* Sp7^T на 7%. Штамм *A. brasilense* S27 не оказал достоверного влияния, штамм *A. brasilense* SR80 существенно увеличивал образование корней по сравнению с контролем. У мериклонов растений, инокулированных штаммом *A. brasilense* SR88 наблюдалось наибольшее количество узлов 8% на 30 сутки культивирования и корней в течение всего опыта.

Далее данные растения исследовали в условиях *ex vitro* (Таблица 14).

Таблица 14 – Влияние коллекционных штаммов *A. brasilense* Sp7^T, *A. brasilense* S27, *A. brasilense* SR80, *A. brasilense* SR88 на рост микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *ex vitro*

Вариант	Длина побега, мм		Количество листьев, шт.		Площадь листовой поверхности, мм ²	
	10 сутки	20 сутки	10 сутки	20 сутки	10 сутки	20 сутки
Контроль	79,35a	152,00bc	8,05bcd	9,75ab	372,69a	410,30a
<i>A. brasilense</i> SP7 ^T	70,25a	139,50a	7,25a	9,35a	477,53a	606,18a
<i>A. brasilense</i> S27	69,25a	142,25ab	7,25ab	9,65ab	828,96c	939,06c
<i>A. brasilense</i> SR80	92,25bc	168,75d	8,15cd	10,40bc	990,51de	938,26c
<i>A. brasilense</i> SR88	93,00c	153,50bc	8,85d	10,70c	1071,52e	1212,39d
F _{факт.}	8,945*	8,066*	5,937*	3,059*	33,809*	12,757*
НСР _{0,05}	10,20	10,68	0,78	0,83	145,09	238,38

На 10 сутки выращивания микрорастений в почве по длине побега не отличались варианты с инокуляцией штаммами *A. brasilense* Sp7^T, *A. brasilense* S27. Наибольшее количество узлов отмечено в вариантах со штаммами *A. brasilense* SR80 – 16%, *A. brasilense* SR88 – 17%. На 20 сутки растения в варианте со штаммами *A. brasilense* Sp7^T, *A. brasilense* S27 имели наименьшую длину побега, но штамм *A. brasilense* SR88 оказывал влияние на уровне с контролем (152 мм) и в варианте со штаммом *A. brasilense* SR88 наблюдалась наибольшая длина побега, на

11% больше, чем у контрольных растений. По количеству листьев варианты со штаммами *A. brasilense* Sp7^T и *A. brasilense* S27 незначительно отличались от контрольных растений. Штамм *A. brasilense* SR88 сильнее других стимулировал образование листьев на 20 сутки. По площади листовой поверхности на уровне с контролем были растения, инокулированные штаммом *A. brasilense* Sp7^T. Хорошей площадью листовой поверхности обладали растения, бактеризованные штаммом *A. brasilense* SR88 (на 195% выше контроля).

Таким образом, по результатам опыта установлено, что наилучшей ростостимулирующей способностью среди изученных штаммов обладал штамм *A. brasilense* SR88.

Повторный эксперимент с тем же набором штаммов *A. brasilense* Sp7^T, *A. brasilense* S27, *A. brasilense* SR80, *A. brasilense* SR88 проводили с дополнительным контролем – штаммом *A. baldaniorum* Sp245, для которого ранее была установлена ростостимулирующая способность в отношении микроклонов картофеля.

В таблицах 15, 16 показаны результаты исследований в культуре *in vitro*.

Таблица 15 – Влияние коллекционных штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* S27, *A. brasilense* Sp7^T, *A. brasilense* SR80, *A. brasilense* SR88 на длину побегов и корней микрорастения картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Длина побега, мм			Средняя длина корня, мм		
	10 сутки	20 сутки	30 сутки	10 сутки	20 сутки	30 сутки
Контроль	25,75ab	55,00bcd	75,00a	21,75c	33,88ab	48,55a
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	27,70cd	57,14cd	81,55b	22,50c	40,64c	47,80a
<i>A. brasilense</i> Sp7 ^T	24,75a	51,32ab	83,47b	17,90b	31,92a	50,25a
<i>A. brasilense</i> S27	26,60bc	53,90abc	90,93cd	16,24a	33,48ab	48,42a
<i>A. brasilense</i> SR80	28,24d	49,04a	83,93b	24,24d	36,54b	47,50a
<i>A. brasilense</i> SR88	28,70d	59,66d	93,12d	26,24e	35,70ab	56,80b
F _{факт.}	10,155*	4,815*	11,432*	48,209*	5,453*	4,275*
HCP _{0,05}	1,44	5,17	5,85	1,64	3,87	5,12

Растения, инокулированные штаммом *A. baldaniorum* Sp245, по большинству показателей превышали контроль или были на уровне с ними (по длине корня на 10 и 30 сутки культивирования). На уровне варианта со штаммом *A. baldaniorum*

Sp245 были растения, инокулированные штаммами *A. brasilense* S27 и *A. brasilense* SR88 по длине побега в течение всего опыта. По длине корня лучшим был вариант со штаммом *A. brasilense* SR88.

Таблица 16 – Влияние коллекционных штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* S27, *A. brasilense* Sp7^T, *A. brasilense* SR80, *A. brasilense* SR88 на количество узлов на побеге и корней у микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Количество узлов, шт.			Количество корней, шт.		
	10 сутки	20 сутки	30 сутки	10 сутки	20 сутки	30 сутки
Контроль	4,50	6,66b	8,95	4,25ab	7,48d	8,45bc
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	5,00	7,16cd	8,70	5,00bc	7,40d	7,57a
<i>A. brasilense</i> SP7 ^T	4,50	7,20d	9,62	3,50a	6,96cd	7,80ab
<i>A. brasilense</i> S27	4,50	7,26d	9,23	5,50c	6,72bc	8,43bc
<i>A. brasilense</i> SR80	4,25	6,30a	9,20	5,25c	5,82a	8,75cd
<i>A. brasilense</i> SR88	5,00	6,72b	9,25	5,50c	5,94a	9,30d
F _{факт.}	1,901	10,704*	2,195	10,043*	10,043*	6,349*
HCP _{0,05}	-	0,34	-	0,76	0,76	0,75

По признаку «Количество узлов» нет достоверных различий у растений на 10 и 30 сутки. На 20 сутки на уровне с вариантом инокуляции штаммом *A. baldaniorum* Sp245 были растения, бактериализованные штаммами *A. brasilense* Sp7^T, *A. brasilense* S27. На уровне с контрольными растениями был вариант со штаммом *A. brasilense* SR88. Меньше всего узлов на 20 сутки было у растений в варианте со штаммом *A. brasilense* SR80 на 5%. По количеству корней достоверное отличие было между вариантами в течение всего эксперимента. Больше всего корней наблюдалось у микрорастений, инокулированных штаммом *A. brasilense* SR88, превышение на 10 суки на 29% и на 30 сутки на 10%.

Исследуемые микрорастения высаживали в сосуды с грунтом и проводили анализ на 10 и 20 сутки выращивания (Таблица 17).

В условиях *ex vitro* растения, инокулированные штаммами *A. brasilense* SR80, *A. brasilense* SR88 были на уровне варианта со штаммом *A. baldaniorum* Sp245 по длине побега и по количеству листьев. По площади листовой поверхности данные штаммы обладали лучшим стимулирующим эффектом по сравнению с контролем

и штаммом *A. baldaniorum* Sp245. На 10 сутки у растений, инокулированных штаммом *A. brasilense* SR80, площадь листьев была на 75% больше контроля, а у растений, инокулированных штаммом *A. brasilense* SR88 – на 48%. На 20 сутки площадь листовой поверхности растений, инокулированных штаммами *A. brasilense* SR80 и *A. brasilense* SR88 превышала контроль соответственно на 72% и 46%.

Таблица 17 – Влияние коллекционных штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* S27, *A. brasilense* Sp7^T, *A. brasilense* SR80, *A. brasilense* SR88 бактерий на рост микрорастения картофеля сорта Невский в культуре *ex vitro*

Вариант	Длина побега, мм		Количество листьев, шт.		Площадь листовой поверхности, мм ²	
	10 сутки	20 сутки	10 сутки	20 сутки	10 сутки	20 сутки
Контроль	107,50b	178,40b	8,70ab	10,70b	2042,91c	2178,20c
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	119,20bcd	189,20bcd	9,00bc	11,00bc	2405,37d	2555,20d
<i>A. brasilense</i> SP7 ^T	89,60a	159,60a	8,10a	9,80a	1192,55a	1300,40a
<i>A. brasilense</i> S27	114,00b	182,00b	8,60ab	10,60b	1760,21b	1892,14b
<i>A. brasilense</i> SR80	128,40cd	198,40cd	9,60c	11,60c	3588,77f	3738,62f
<i>A. brasilense</i> SR88	129,40d	199,40d	8,80ab	10,80b	3023,05e	3173,04e
F _{факт.}	13,978*	13,015*	3,813*	6,180*	201,948*	196,584*
HCP _{0,05}	11,73	12,13	0,74	0,69	180,28	185,77

По итогам третьего эксперимента можно сделать вывод, что из изученных коллекционных штаммов можно рекомендовать для совместного культивирования с микрорастениями картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro* два штамма: *A. brasilense* SR80, *A. brasilense* SR88. Данные штаммы по ростостимулирующей активности в отношении микрорастений картофеля сорта Невский были на уровне со штаммом *A. baldaniorum* Sp245 или выше его.

Оценивали приживаемость растений в грунте в условиях *ex vitro* (Рисунок 3).

Показатель приживаемости стерильных растений после высадки в почву вносит наибольший вклад в экономическую рентабельность клонального микроразмножения растений. При переносе микрорастений из условий *in vitro* в условия *ex vitro* приживаемость микроклонов контрольной группы наблюдалась на уровне $68 \pm 8 \%$ (см. Рисунок 3).

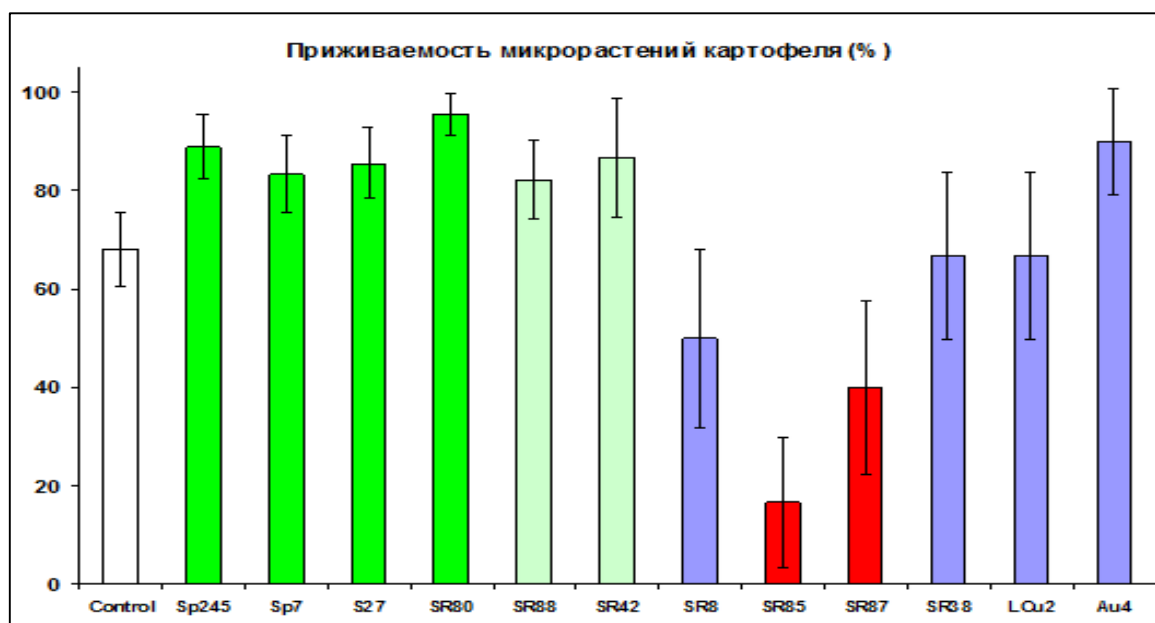


Рисунок 3 – Приживаемость микрорастений картофеля сорта Невский, инокулированных ризосферными бактериями в культуре *in vitro*, после высадки в почву в условия *ex vitro*, выраженная в %, бары показывают $\pm p$ при $P=0,05$

Оценка влияния бактеризации на приживаемость микрорастений в условиях *ex vitro* выявила достоверное повышение показателя относительно контрольных растений при инокуляции культурами шести штаммов: для *A. lipoferum* SR42 и *A. brasilense* SR88 при $P=0,05$ ($t_{\text{факт.}} > t_{0,05}$), и для *A. brasilense* Sp7^T, S27, SR80 и для *A. baldaniorum* Sp245 при $P=0,01$ ($t_{\text{факт.}} > t_{0,01}$). Наилучшая приживаемость показана для варианта с инокуляцией штаммом *A. brasilense* SR80 ($95,6 \pm 5,7$ % при $P=0,01$). Для двух штаммов *A. lipoferum* SR85 и *A. brasilense* SR87 установлено достоверное снижение приживаемости микрорастений в 4 и 1,7 раза, соответственно. Влияние инокуляции культурами остальных четырех штаммов достоверно не влияло на данный показатель.

Штаммы с наибольшим ростостимулирующим эффектом оценивали на способность синтезировать индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) из триптофана и способность к азотфиксации (Таблица 18). Четыре ризосферных штамма, продемонстрировавших наилучшее стимулирование роста микрорастений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro* (*A. brasilense* Sp7^T, S27, SR80 и *A. baldaniorum* Sp245), были исследованы на способность фиксировать атмосферный

азот (восстанавливать ацетилен). Оценка активности нитрогеназы и роста бактериальной культуры на безазотистой среде Nfb показала, что азотфиксирующими являются 3 штамма: *A. brasilense* Sp7^T, S27 и *A. baldaniorum* Sp245 – со следующими показателями ацетилен-редукции: $3,03 \pm 0,33$; $7,48 \pm 1,68$ и $7,15 \pm 1,08$ нмоль C₂H₂ день⁻¹ мл⁻¹, соответственно. Культура штамма *A. brasilense* SR80 не росла на среде Nfb, и нами не было выявлено нитрогеназной активности у этого штамма (Таблица 18).

Таблица 18 – Качественное и количественное определение азотфиксирующей активности и способности продуцировать ИУК пятью штаммами

Штамм	Азотфиксирующая активность		Продукция ИУК	
	Рост на среде Nfb	Активность ацетиленредукции, (нмоль C ₂ H ₂ день ⁻¹ мл ⁻¹)	Реакция Сальковского	ВЭЖХ анализ (мкг мл ⁻¹)
<i>A. brasilense</i> Sp7 ^T	+	$3,03 \pm 0,33^*$	+	$63,6 \pm 2,4$
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	+	$7,48 \pm 1,68$	+	$87,3 \pm 4,5$
<i>A. brasilense</i> S27	+	$7,15 \pm 1,08$	+	$3,74 \pm 0,4$
<i>A. brasilense</i> SR80	-	0	+	$47,5 \pm 1,6$
<i>A. brasilense</i> SR88	+	ND	+	$27,2 \pm 2,0$

Примечание – «*» – приведены доверительные интервалы для $p < 0,05$.

Ризосферные штаммы были исследованы на способность продуцировать ИУК из триптофана. Культуральная жидкость 5-суточных культур штаммов *Azospirillum brasilense* Sp7^T, S27, SR80, SR88 и *A. baldaniorum* Sp245, реагировала с реактивом Сальковского с увеличением поглощения света раствором при 540 нм, что свидетельствовало о накоплении индолил-содержащих метаболитов, отличных от триптофана. Анализ культуральной жидкости методом ВЭЖХ продемонстрировал присутствие пиков ИУК в препаратах всех пяти штаммов: Sp7^T – $63,6 \pm 2,4$ мкг мл⁻¹, Sp245 – $87,3 \pm 4,5$ мкг мл⁻¹, S27 – $3,74 \pm 0,4$ мкг мл⁻¹, SR80 – $47,5 \pm 1,6$ мкг мл⁻¹ и SR88 – $27,2 \pm 2,0$ мкг мл⁻¹ (Таблица 18).

Таким образом, для изученных коллекционных PGPR отмечено положительное влияние на рост и развитие микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro* и в условиях *ex vitro*. Однако только для двух штаммов

A. baldaniorum Sp245 и *A. brasilense* SR80 установлено положительное действие на микрорастения на всех этапах микроклонального размножения.

Замечена высокая вариабельность эффекта от инокуляции штаммами на растения, что зависит от вида бактерий. В связи с этим необходим подбор благоприятных штаммов для изучения микробно-растительных ассоциаций, обнаружения рост-стимулирующего эффекта микроорганизмов на растения в культуре *in vitro* и в условиях *ex vitro*. Растительно-микробные ассоциации имеют в будущем хорошие перспективы в агробιοтехнологиях, применяемых в сельском хозяйстве.

2.2.3. Выделение и изучение новых природных изолятов ризосферных бактерий

Ц

е

л

ь

ю В 2012 году было выделено из корней картофеля 13 изолятов (7.1, 7.2, 8, 9, 0, 1, 2, 4, 9.1, 1.1, 12, 21, 86) на стадии начала формирования клубней растений, выращенных в полевых условиях (3-х км на Юго-Восток от пос. Новопушкинское Энгельсского района Саратовской области, Россия; координаты 51.212804, 46.92382; тип почвы – тёмно-каштановый). В 2016 году было выделено еще 158 бактериальных изолятов из корней растений картофеля сортов Невский и Кондор, выращенных в полевых условиях Саратовской области в Марксовском районе на темно-каштановой почве (координаты: 51.1101, 45.3020) и в Красноармейском районе на черноземной почве (координаты: 51.613483, 46.542159).

в Из полученных изолятов только 117 могли быть поддержаны в культуре при периодическом пересеве на безазотистой среде. Изучали только штаммы, неспособные к росту на питательной среде, содержащей сахарозу, таковых оказалось 24 изолята 2016 года. Половина из них (12 изолятов) были проверены на фитотоксичность в отношении микрорастений картофеля того сорта, из корней

б

ы

растений которого они были выделены: 7 бактериальных изолятов на сорте Кондор и 5 – на сорте Невский. Из них 4 изолята (1 изолят из корней сорта Невский и 3 изолята из корней сорта Кондор) ингибировали рост микрорастений картофеля. Из 8 штаммов один не вырос при пересеве. 7 оставшихся изолятов проверили на способность стимулировать рост растений в условиях *in vitro* и *ex vitro*.

Итого 13 изолятов 2012 года и 12 изолятов 2016 года проверили на фитотоксичность. 5 изолятов 2012 года оказались фитотоксичными и не пригодными для создания растительно-микробных ассоциаций в культуре *in vitro*. Оставшиеся изоляты проверили в серии экспериментов на способность стимулировать рост растений картофеля сортов Невский (Таблица 19) и Кондор в условиях *in vitro* (Таблица 20).

Таблица 19 – Влияние природных изолятов на рост микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*, в % от контроля

№	Год выделен ия	Вариант	Длина побега	Средняя длина корня	Количество узлов	Количество корней
1	-	<i>A. baldaniorum</i> Sp245	+25	+11*	+34*	+32*
2	2012	Изолят 7.1	+25	+13*	+40*	-27*
3	2012	Изолят 7.2	+39	+5*	+29*	-30*
4	2012	Изолят 2	+166	+148	+143	+100
5	2012	Изолят 9.1	-31	-42	-56	-57
6	2012	Изолят 1	-27*	-13*	-6*	-9*
7	2012	Изолят 12	-63*	-62*	-28*	-18*
8	2012	Изолят 21	-10*	-4*	-9*	-9*
9	2012	Изолят 86	-51*	-13*	-9	+18*
10	2016	Изолят T1Ns10	0	0	0	0
11	2016	Изолят T1Nn01	+18*	+12*	+13*	+46*

Примечание – «*» – достоверное отличие от контрольных (неинокулированных) микрорастений ($P = 0,05$) по данным дисперсионного анализа.

Коллекционный штамм *A. baldaniorum* Sp245 был взят в качестве контроля. Микрорастения инокулировали изолятами во время черенкования, кроме T1Ks14, T1Kr02, которые вносили в среду культивирования на 15 сутки после черенкования картофеля.

Таблица 20 – Влияние природных изолятов на рост микрорастений картофеля сорта Кондор в культуре *in vitro*, в % от контроля

№	Год выделения	Вариант	Длина побега	Средняя длина корня	Количество узлов	Количество корней
1	-	<i>A. baldaniorum</i> Sp245	+97*	+64*	+71*	+114*
2	2012	Изолят 7.1	-32*	+4	-7	-11
3	2012	Изолят 7.2	-10*	+19	-16	-27
4	2012	Изолят 2	+61*	-37*	+108*	+300*
5	2012	Изолят 9.1	-1*	-44*	-59*	-47*
6	2016	Изолят К2Кп02	-23*	0	-8*	0
7	2016	Изолят К2Кп09	0	-15*	0	0
8	2016	Изолят Т1Кs19	0	-32*	0	0
9	2016	Изолят Т1Кг02	+18*	+8*	0	+25*
10	2016	Изолят Т1Кs14	0	0	0	+15*

Примечание – «*» – достоверное различие от контрольных (неинокулированных) микрорастений ($P = 0,05$) по данным дисперсионного анализа.

Природные изоляты по-разному оказали влияние на микрорастениями картофеля сорта Невский. Изолят Т1Nп01 положительно влиял на все показатели роста растений в культуре *in vitro* по сравнению с контролем (вариант с не бактеризованными растениями), но его действие не отличалось от влияния штамма *A. baldaniorum* Sp245. Варианты с инокуляцией изолятами 2, 9.1 достоверно не отличались от контрольных вариантов. Изоляты 7.1 и 7.2 положительно оказывали воздействие на длину корня и количество узлов, но ингибировали образование новых корней. Изоляты 1, 12, 21, 86 достоверно отрицательно влияли на все ростовые процессы в растениях. На растениях сорта Невский изолят Т1Ns10 не оказал достоверного влияния по сравнению со стандартными стерильными растениями.

На микрорастениях сорта Кондор так же замечено различное воздействие природных изолятов. Изоляты 7.1, 7.2, 9.1 негативно влияли на рост черенков картофеля. Изолят 2 положительно влиял на длину побега, количество узлов и корней, но ингибировал длину корня. Микрорастения, инокулированные изолятами контрольных растений. Изолят Т1Кг02 оказывал стимулирующее действие на рост

микрочеренков.

Далее исследуемые изоляты T1Ns10 и T1Nn01, K2Kn02, K2Kn09, T1Ks19,

Таблица 21 – Влияние природных изолятов на рост растений картофеля в условиях *ex vitro*, % от контроля

№	Вариант	Сорт картофеля	Длина побега	Количество листьев	Площадь листовой поверхности
1	<i>A. baldaniorum</i> Sp245	Невский	+12*	0	+13*
2	T1Ns10		+13*	0	-12*
3	T1Nn01		+20*	+12*	0
4	<i>A. baldaniorum</i> Sp245	Кондор	+10*	0	+9*
5	K2Kn02		+8*	0	-45*
6	K2Kn09		-10*	0	-20*
7	T1Ks19		+8*	0	-39*
8	T1Kr02		0	0	-35*
9	T1Ks14		0	0	0

Примечание – «*» – достоверное различие от контрольных (неинокулированных) микрорастений ($P = 0,05$) по данным дисперсионного анализа.

В условиях *ex vitro* изолят T1Nn01 так же оказывал ростстимулирующее влияние по отношению к растениям. Изолят K2Kn09 обладал ингибирующим эффектом по отношению к растениям. Остальные изоляты оказывали неоднозначное влияние, параметры растений были достоверно ниже, чем контроль либо на уровне его.

Таким образом, скрининг природных изолятов позволил для дальнейшего исследования выделить несколько изолятов с ростостимулирующими свойствами: среди изолятов, выделенных из корней картофеля сорта Невский, – изолят T1Nn01 и 7.1, а изоляты из сорта Кондор были на уровне контрольных растений и не проявляли ингибирующее действие на растения, а штаммы T1Kr02 и T1Ks14 стимулировали рост побегов или образование корней на микропобегах картофеля *in vitro*, T1Ks19 и K2Kn02 повышали длину побегов картофеля *ex vitro*.

В последующей работе было определено таксономическое положение бактериальных штаммов, для которых было показано ростстимулирующее действие на микрорастения картофеля и проростки пшеницы.

Были секвенированы и получены последовательности генов 16S рДНК и межгенного (16S-23S) транскрибируемого спейсера ITS, а также изучены биохимические свойства штаммов с помощью системы мультисубстратного тестирования Biolog. Анализ полученных данных позволил идентифицировать штаммы следующим образом: *Ensifer adhaerens* T1Ks14 (= RCAM04487, приложение 1), *Kocuria rosea* T1Ks19 (= RCAM04488, приложение 2) и *Acinetobacter guillouiae* K2Kn02 (= RCAM04485, приложение 3), штамм T1Kr02 (приложение 4) был описан как представитель альфа-протеобактерий порядка *Rhizobiales* семейства *Brucellaceae* рода *Ochrobactrum*. Идентичность последовательности ITS штамма T1Kr02 составила не более 93,4% с аналогичными последовательностями типовых штаммов рода *Ochrobactrum*, имеющимися в базе данных GenBank NCBI, что ниже уровня внутривидовой варибельности.

При секвенировании гена 16S рРНК были получены нуклеотидные последовательности длиной 910 п.о. для изолята T1Ks14 и 1437 п.о. для изолята T1Ks19. BLASTN анализ позволил установить принадлежность штамма T1Ks14 к таксономической группе *Sinorhizobium/Ensifer* с 99% и выше идентичности последовательности с представителями 10 бактериальных видов. Филогенетический анализ (Рисунок 4) позволил идентифицировать штамм как *Ensifer adhaerens* T1Ks14 (99,9% идентичности с типовым штаммом LMG20216^T) (Видовая идентификация рост-стимулирующих..., 2017).

Филогенетический анализ (Рисунок 5) показал нахождение штамма T1Ks19 (по последовательности 16S рРНК) в одной монофилитической ветви с типовым штаммом *K. rosea* DSM20447^T (Видовая идентификация ростстимулирующих..., 2017).

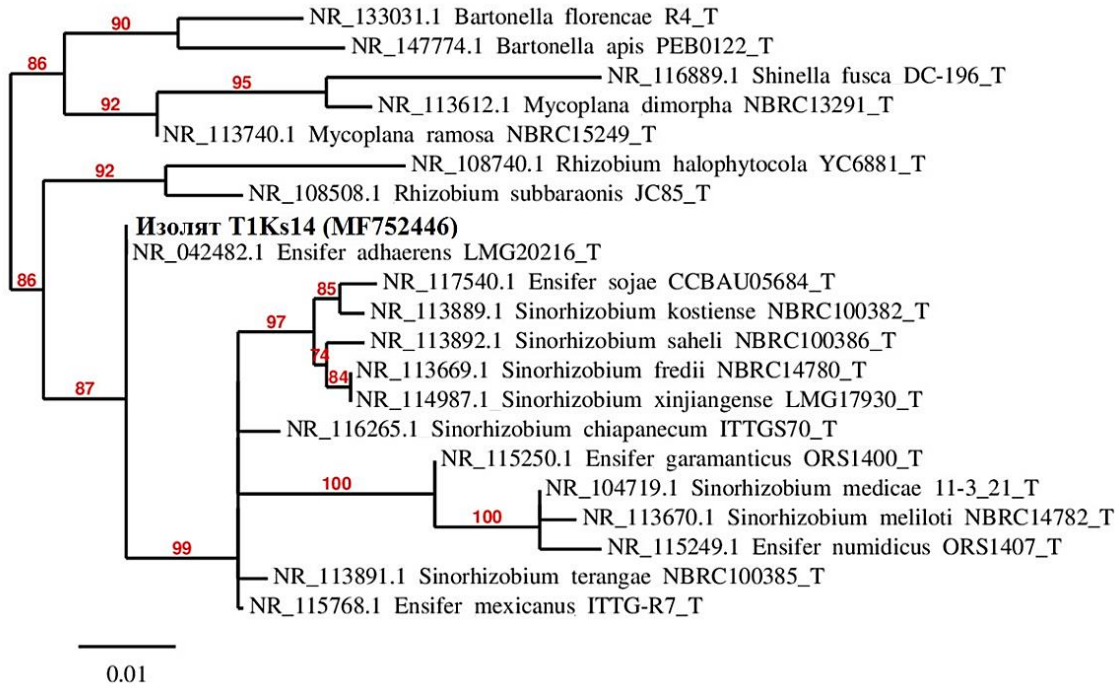


Рисунок 4 – Филогенетическое древо по последовательностям генов 16S рРНК, демонстрирующее эволюционную близость штамма T1Ks14 с типовым штаммом *Ensifer adhaerens* LMG20216T

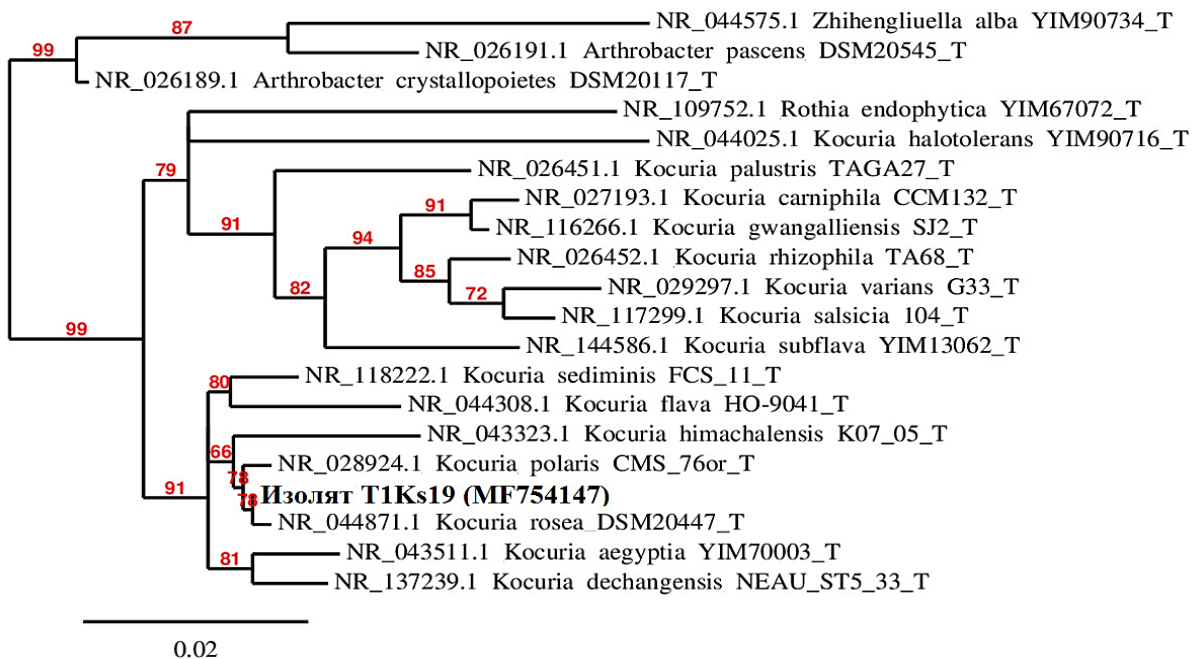


Рисунок 5 – Филогенетическое древо по последовательностям генов 16S рРНК, демонстрирующее эволюционную близость штамма T1Ks19 с типовым штаммом *K. rosea* DSM20447^T

Мультисубстратный анализ Biolog ожидаемо показал идентичность биохимических профилей изолята K2Kn02 (Видовая идентификация ростстимулирующих..., 2017) и обоих типовых штаммов *A. guillouiae* ATCC11171^T и *A. bereziniae* ATCC17924^T, поскольку по изученным биохимическим свойствам представители этих 2-х видов практически не различаются (Рисунок 6).

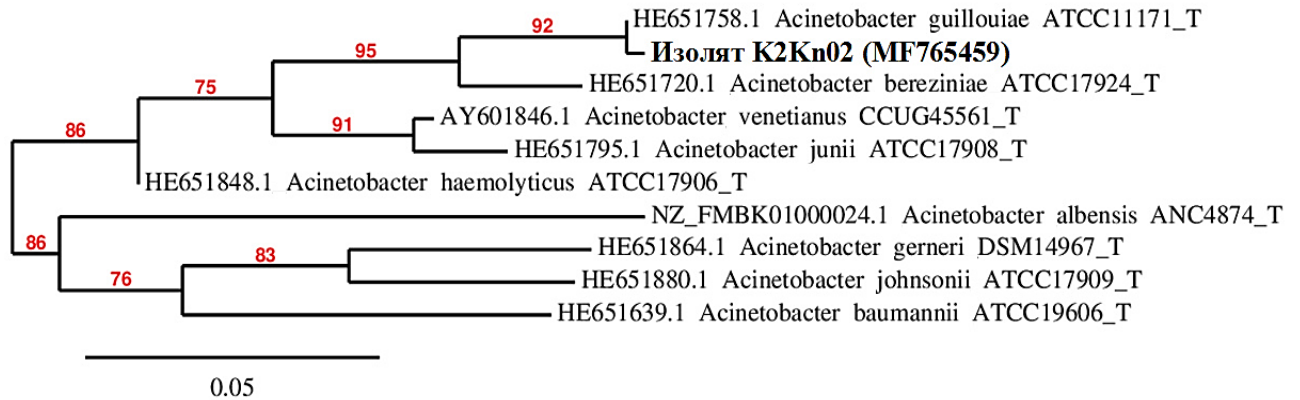


Рисунок 6 – Филогенетическое древо по нуклеотидным последовательностям межгенного (16S-23S) транскрибируемого спейсера ITS, демонстрирующее эволюционную близость штамма K2Kn02 с типовым штаммом *A. guillouiae*

Филогенетический анализ по последовательности гена 16S рРНК с близкородственными штаммами (Рисунок 7) выявил нахождение штамма T1Kr02 в одной монофилетической группе с 8 другими штаммами рода *Ochrobactrum* (*O. pseudogrignonense*, *O. thiophenovorans* и *Ochrobactrum* sp.), из которых 5 были выделены из ризосферы растений, а 3 из почвы сельскохозяйственных полей. Таким образом, эта группа содержит ризосферные и почвенные штаммы, равноудалённые по маркеру 16S рРНК от типовых штаммов описанных видов рода *Ochrobactrum* (Таксономическое положение бактериального..., 2017).

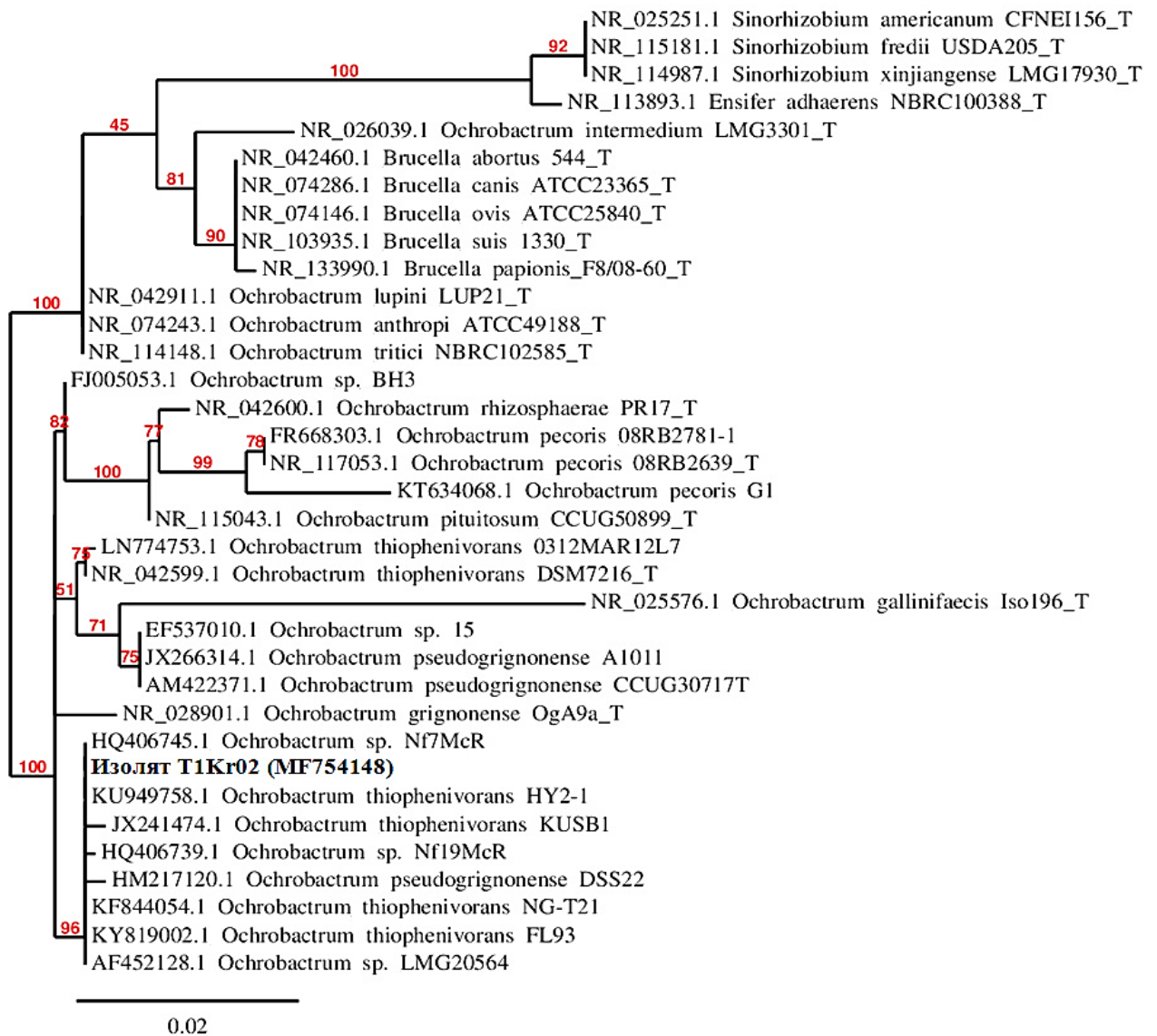


Рисунок 7 – Филогенетическое древо по последовательностям генов 16S рРНК бактериальных штаммов, наиболее эволюционно близких изоляту Т1Kr02

Анализ последовательности межгенного (16S-23S) транскрибируемого ITS спейсера изолята Т1Kr02 выявил низкий процент идентичности с генами типовых штаммов рода *Ochrobactrum* (не выше 93,4%). На филогенетическом древе по последовательности ITS региона (Рисунок 8) изолят Т1Kr02 (также, как и для гена 16S рРНК) находится на отдельной монофилетической ветви, что позволяет нам предположить принадлежность этого штамма к новому (ранее неопisanному) виду бактерий рода *Ochrobactrum*. Наиболее близкими к изоляту Т1Kr02 были типовые штаммы *O. grignonense* и *O. Pseudogrignonense* (Таксономическое положение бактериального..., 2017).

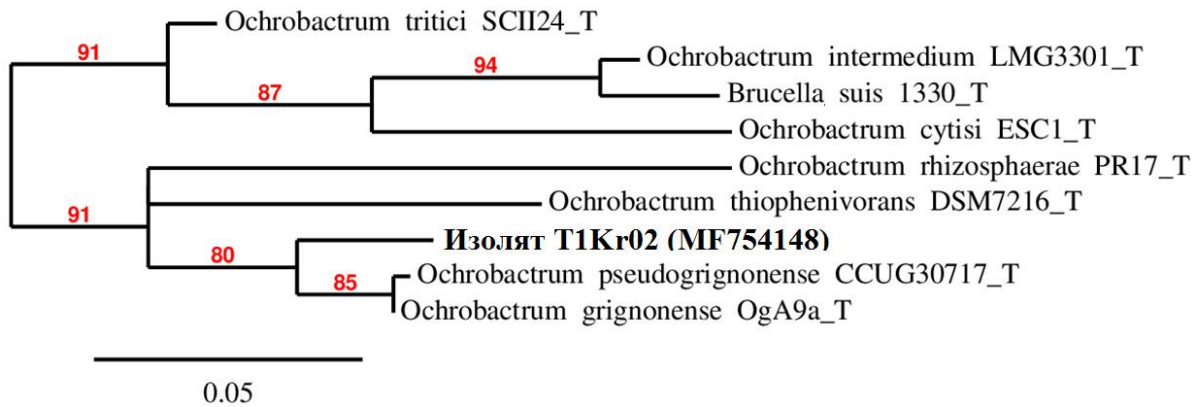


Рисунок 8 – Филогенетическое древо по последовательностям межгенного (16S-23S) транскрибируемого ITS спейсера

Таким образом, из выделенных в 2016 году 158 природных изолятов ризосферных бактерий из корней картофеля сортов Невский и Кондор, 3 могут быть использованы для инокуляции микрорастений картофеля в культуре *in vitro* с целью стимулирования их роста и адаптационной способности. На микрорастения картофеля сорта Невский наибольшее положительное влияние оказал бактериальный изолят Т1Nn01, на микрорастения сорта Кондор – изоляты К2Kn09, Т1Ks19. Было определено таксономическое положение бактериальных штаммов Т1Kr02, К2Kn02, Т1Ks19, Т1Ks14. Изученные штаммы К2Kn02, Т1Kr02, Т1Ks14, Т1Ks19 депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) в 2017 году. Из выделенных изолятов в 2012 году для дальнейшего изучения использовали IPA7.2.

2.2.4. Изучение штамма *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 и его влияния на микрорастения картофеля в культуре *in vitro*

По первичным данным в 2012 году был отобран природный бактериальный изолят IPA7.2. В дальнейших экспериментах провели исследование влияния способа и условий инокуляции микрорастений картофеля данным штаммом. Изучали различные концентрации суспензии бактерий изолята IPA7.2: 10^5 , 10^6 , 10^7 кл/мл. Культивирование растений проводили на полутвердой среде МС (содержание агар-агара 3,5 г/л). Полученные данные приведены в таблицах 22 и 23.

Таблица 22 – Влияние изолята IPA7.2 на надземную часть микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Длина побега, мм			Количество узлов, шт.		
	7 сутки	14 сутки	21 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Контроль	11	41,25	53,0	3	4	5
10 ⁵	10,25	23,75	38,25	2,75	3,75	4,75
10 ⁶	12,5	24,75	39,75	3	3,5	4,75
10 ⁷	11,5	24,5	37,75	2,75	4	5,25
F _{факт.}	9,053	17,207*	6,225*	5,150	0,108	10,638
НСР _{0,05}	-	6,53	9,31	-	-	-

Таблица 23 – Влияние изолята IPA7.2 на подземную часть микрорастений картофеля в культуре *in vitro*

Вариант	Средняя длина корня, мм			Количество корней, шт		
	7 сутки	14 сутки	21 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Контроль	-	36,25	41,25	-	4,25	4,25
10 ⁵	-	17,35	27,80	-	2,5	2,5
10 ⁶	-	13,83	19,25	-	2,5	3,0
10 ⁷	-	12,40	18,77	-	2,25	2,7
F _{факт.}	-	44,708*	46,216*	-	9,462*	4,143*
НСР _{0,05}	-	5,29	4,94	-	0,96	1,22

Достоверные различия между растениями установлены только по показателю «Длина побега» на 14 и 21 сутки. Во всех вариантах инокуляции микрорастений бактериями наблюдалось достоверное уменьшение длины побегов по сравнению со стерильным контролем. Количество узлов на побегах во всех вариантах в течение всего опыта не различалось.

По показателям «Длина корня» и «Количество корней» установлено достоверное отрицательное влияние изолята IPA7.2 по сравнению с контролем во всех вариантах опыта (Таблица 23).

Далее изучаемые растения высаживали в сосуды с грунтом для изучения процесса адаптации к естественным условиям *ex vitro*. В оптимальных условиях приживаемость опытных и контрольных растений была одинакова. На 20 сутки установлено, что на всех растениях формировалось равное количество листьев (Таблица 24). Длина побегов в контроле и варианте с бактериями в концентрации 10⁶ не различались, в отличие от двух других вариантов, имевших меньшую длину

побега. При этом площадь образовавшихся листьев в варианте с бактериями в концентрации 10^5 достоверно превосходила все другие варианты, в том числе контроль.

Таблица 24 – Влияние изолята IPA7.2 на рост микрорастений картофеля сорта Невский в условиях *ex vitro* на 20 сутки выращивания

Вариант	Длина побега, мм	Количество листьев, шт.	Площадь листьев, см ²
Контроль	152ab	13,20a	203a
10^5	163b	14,10bc	350c
10^6	149ab	14,40c	266b
10^7	140a	13,40a	270b
F _{факт.}	2,86*	13,5*	20,3*
НСР _{0,05}	16,20	0,540	46,40

Таким образом, при инокуляции черенков растений картофеля бактериями изолята IPA7.2 в условиях *in vitro* на 21 сутки наблюдалось помутнение среды (развитие бактериальной культуры вне растений) и ингибирование развития растений. При этом, положительный эффект бактеризации был выявлен на стадии роста растений в условиях *ex vitro*. Инокулированные микрорастения сравнивались с контрольными по длине побегов, имели большее количество листьев на одно растение, и значительно превосходили контрольные растения по площади листьев. Полученные данные можно объяснить негативным влиянием метаболитов бактерий, накапливающихся в питательной среде, или усилением фитоиммунных реакций растительных клеток, положительным влиянием бактериальной инокуляции на процессы преадаптации микрорастений к нестерильным условиям *ex vitro* и проявлением рост-стимулирующего эффекта, приводящего к более активному развитию побега в условиях *ex vitro* (Влияние штамма IPA7.2..., 2016).

При модификации эксперимента, бактериальную инокуляцию (10^6 кл/мл) растений проводили не при черенковании, а на 15-ый день культивирования микроклонов картофеля, когда уже были сформированы корни и побеги микрорастений (Влияние штамма IPA7.2..., 2016). В результате, на стадии культивирования в условиях *in vitro* из негативных эффектов было отмечено лишь

уменьшение длины корневой системы (Таблица 25). С другой стороны, у бактеризованных растений выявлено увеличение длины побега (на 34%), количества листьев (на 7%) и корней (на 16%) относительно стерильных растений (Таблица 25).

Таблица 25 – Влияние изолята IPA7.2 на рост микрорастений картофеля сорта Невский в условиях *in vitro* на 30 сутки выращивания при инокуляции на 15-ый день культивирования растений

Вариант	Длина побега, мм	Средняя длина корня, мм	Количество узлов, шт.	Количество корней, шт.
Контроль	53,50a	78,50b	8,05a	7,10a
Опыт	71,50b	72,30a	8,60b	8,25b
F _{фак}	3940*	101*	33,0*	31,1*
НСР _{0,05}	0,90	2,10	0,30	0,66

Процент приживаемости в почве микроклонов, инокулированных на 15-тые сутки, составил 100% против 94 % контрольных растений, что говорит о лучшей адаптации бактеризованных растений к условиям *ex vitro*. К 20-му дню культивирования *ex vitro* фотосинтетическая поверхность опытных растений была на 77% выше, чем у контрольных (Таблица 26). Соизмеримо больше оказалась и сухая масса бактеризованных растений: на 84% сухая массы побегов и на 61% сухая масса корней. Инокуляция микроклонов за 1 день до перевода растений из условий *in vitro* в условия *ex vitro* (30-ый день культивирования) не оказывала никакого влияния на морфометрические параметры растений на 20-ый день культивирования *ex vitro*.

При инокуляции 15-ти суточных растений бактериальной суспензией изолята IPA7.2 через сутки было выявлено увеличение активности меристем корня (Рисунок 9). Митотический индекс у опытных растений возрастал в 1,7 раза при инокуляции 10^4 кл/мл и примерно в 2 раза при более высоких концентрациях инокулята (10^5 - 10^7 кл/мл). Этот показатель, как правило, коррелирует с активностью роста растений, и также может быть связан с повышением уровня ауксина в корнях растений под действием бактерий.

Таблица 26 – Влияние изолята IPA7.2 на рост микрорастений картофеля сорта Невский в условиях *ex vitro* на 20 сутки выращивания при инокуляции на 15-ый и 30-й день культивирования растений

Вариант	Длина побега, мм	Количество листьев, шт.	Площадь листовой поверхности, см ²
Контроль	96,50a	8,75a	646a
Инокуляция на 15 суток	115,50b	9,50b	1143b
Инокуляция на 30 суток	95,30a	8,75a	750a
F _{фак}	48,4*	9,00*	69,9*
НСР _{0,05}	5,64	0,49	108

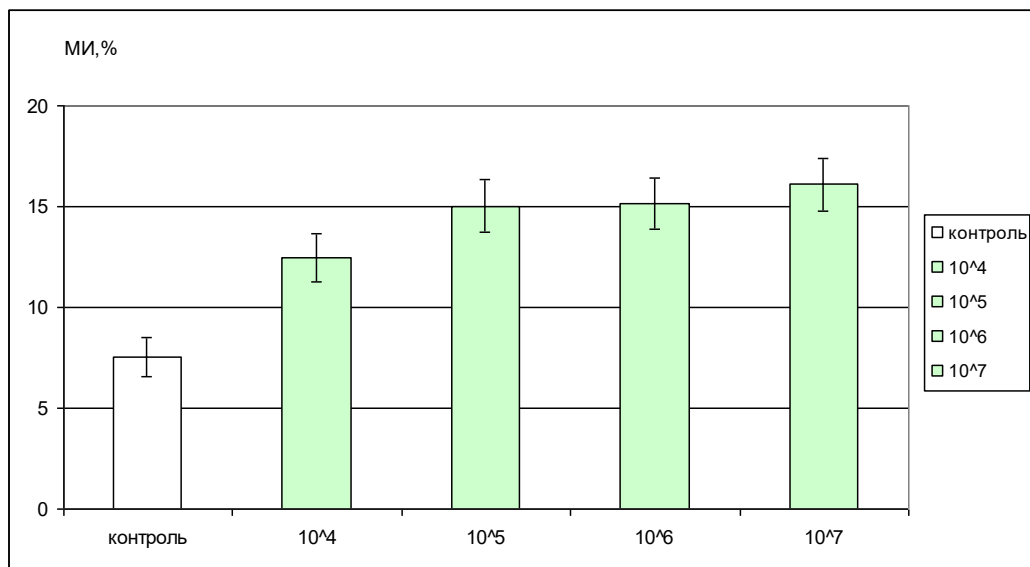


Рисунок 9 – Митотический индекс клеток корневых меристем растений картофеля, инокулированных мизолятом IPA7.2 10^4 - 10^7 кл/мл по сравнению с меристемами стерильных растений (контроль)

Некоторые ризосферные бактерии обладают способностью фиксировать атмосферный азот, что положительно влияет на рост растений ассоциантов. Нами был проведен эксперимент по изучению сравнения активности растительно-микробной ассоциации бактерий изолята IPA7.2 в двух концентрациях бактериальной суспензии (10^5 и 10^7 кл/мл) и микрорастений картофеля сорта Невский при культивировании на питательной среде МС полного состава, но без минеральных источников азота (Таблица 27).

Таблица 27 – Влияние изолята IPA7.2 на рост микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro* на питательной среде МС полного состава и без азота

Вариант	Длина побега, мм		Количество узлов, шт.		Средняя длина корня, мм		Количество корней, шт.	
	14 сутки	21 сутки	14 сутки	21 сутки	14 сутки	21 сутки	14 сутки	21 сутки
Контроль	56,17	62,57	6,77	8,67	53,83	53,50	7,93	7,43
10 ⁵	61,83	60,80	6,67	8,00	52,00	49,73	9,37	7,60
10 ⁷	63,67	68,43	6,77	7,70	56,67	39,57	6,67	7,30
Контроль без N	14,50	18,23	3,97	5,10	37,50	36,00	5,13	6,67
10 ⁵ без N	16,50	16,33	3,80	4,43	38,17	40,67	4,73	5,87
10 ⁷ без N	18,23	20,83	4,13	4,03	39,50	32,93	5,63	5,53
F _{факт.}	166,296*	185,955*	37,440*	124,840*	56,718*	23,982*	47,874*	14,240*
НСР _{0,05}	5,94	5,79	0,78	0,57	3,67	5,13	0,81	0,72

В ходе эксперимента установлено, что на питательной среде без азота у микрорастений картофеля наблюдалось ингибирование роста побегов и корней по всем показателям. Инокуляция микрорастений бактериями не приводила к повышению ростовых показателей. Следовательно, бактерии изучаемого штамма в культуре *in vitro* не обладают способностью фиксировать атмосферный азот в количестве необходимом для компенсации растениям при недостатке данного элемента.

Полученные результаты подтверждают данные исследования по влиянию бактерий *A. baldaniorum* Sp245 на микрорастения картофеля в культуре *in vitro* (Создание ассоциации..., 2015). Вероятно, результат стимулирования ростовых показателей растений, наблюдаемый в экспериментах по совместному культивированию микрорастений картофеля и ризосферных бактерий, не связан с увеличением содержания в среде азота, а, видимо, определяется гормонами, которые выделяют бактерии. Стимуляция роста, наблюдаемая в корневой системе микрорастений, может происходить за счет выделяемых бактериями дополнительных гормонов ауксинов.

2.2.5. Изучение растительно-микробной ассоциации методом иммуноферментного анализа и иммунофлуоресцентной микроскопии

Имунофлюоресцентная микроскопия корней картофеля сорта Невский с антителами к фиксированным клеткам изолята ПА7.2 на корнях растений, выращенных в условиях *in vitro*, и инокулированных суспензией изолята ПА7.2 (10^6 кл/мл), показала, что бактериальные клетки были выявлены как на поверхности корня, так и на корневых волосках (Рисунок 10). Для некоторых корневых волосков отмечены вздутия/расширения (либо в верхней их части, либо в середине), в которых выявляются скопления бактерий.

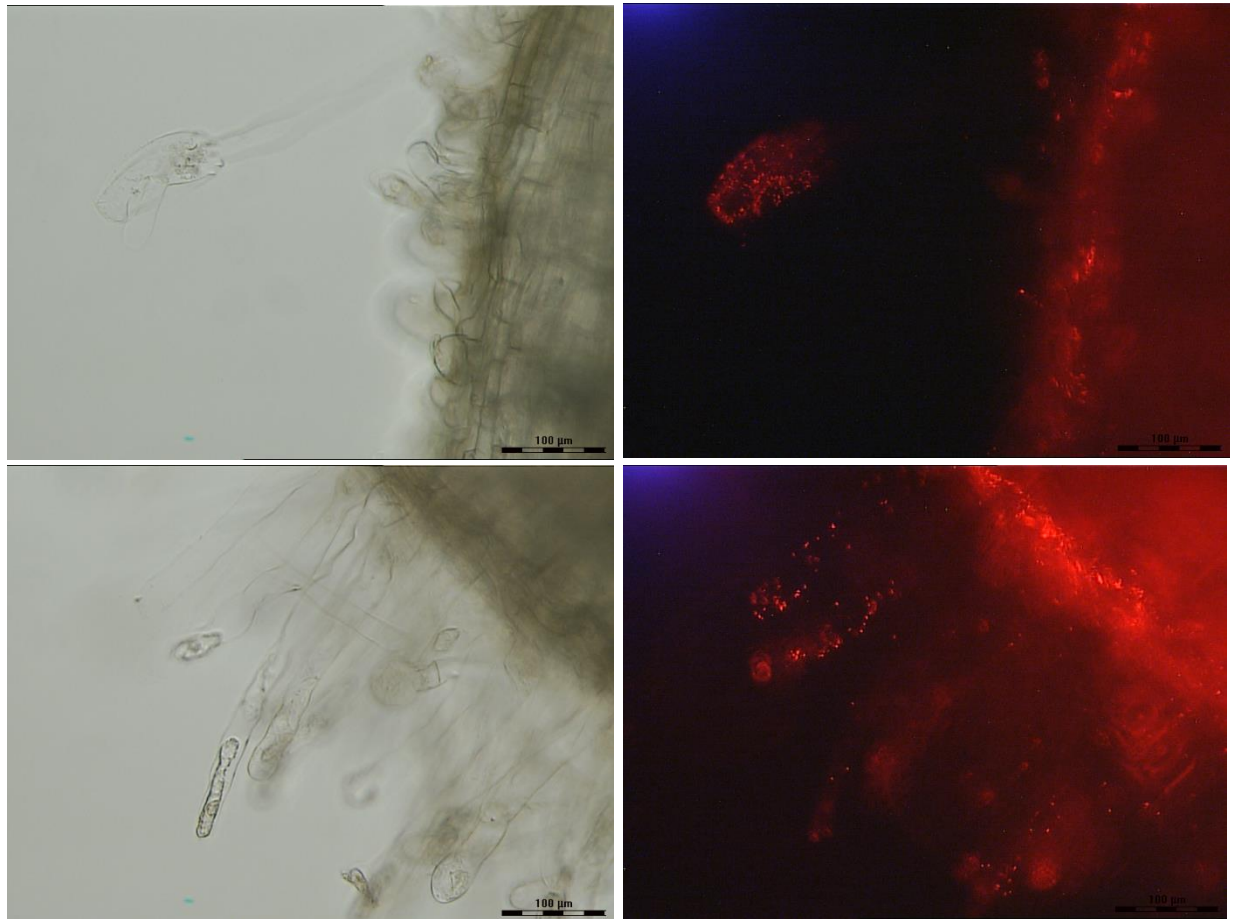


Рисунок 10 – Имунофлюоресцентное выявление бактерий изолята ПА7.2 на корнях микрорастений картофеля сорта Невский

Оценку содержания бактерий изолята ПА7.2 на корнях микрорастений картофеля сорта Невский проводили после 20 суток совместного культивирования

in vitro. Идентифицировали бактерии методом иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител, специфичных для данного штамма, полученных сотрудниками ФИЦ СЦ ИБФРМ РАН. На рисунке 11 представлены результаты иммуноферментного анализа.

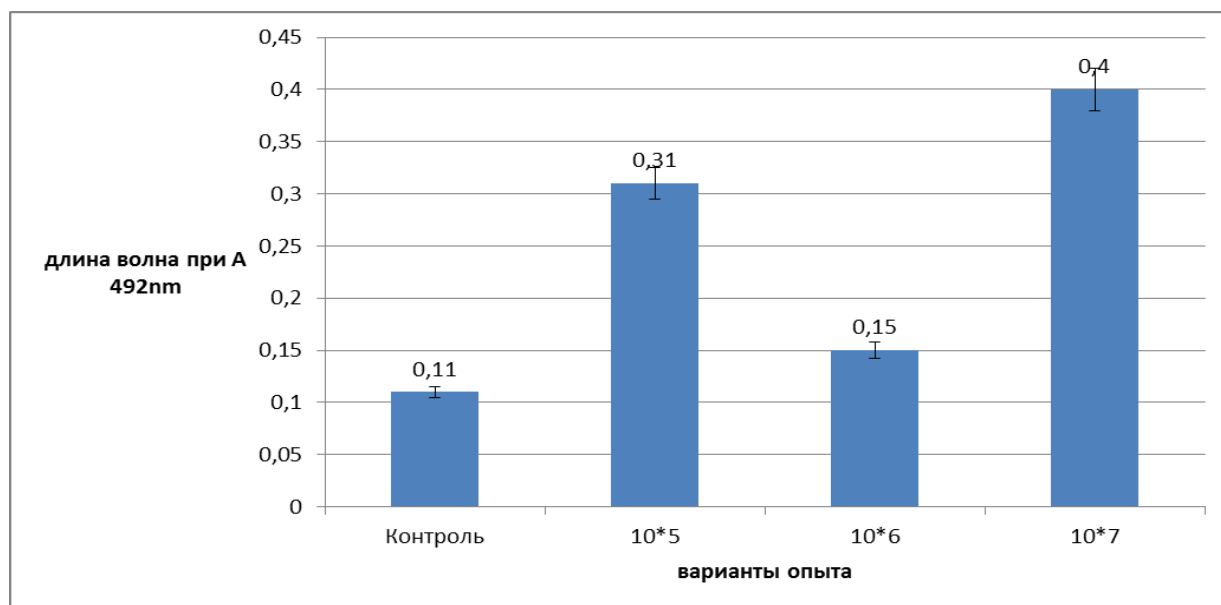


Рисунок 11 – Иммуноферментный анализ бактерии изолята ПРА7.2 на корнях микрорастений картофеля в трех вариантах инокуляции (10^5 , 10^6 , 10^7)

Установлено, что бактерии на корнях микрорастений, инокулированных бактериями, обнаружены во всех трех вариантах инокуляции (10^5 , 10^6 , 10^7). Наиболее оптимальной концентрацией для инокуляции был признан вариант с концентрацией бактерий 10^7 кл/мл. Концентрация 10^6 кл/мл показала наименьшую сохранность бактерий на корнях после 20 суток культивирования.

Для определения количественного содержания бактерий на корнях микрорастений картофеля оценивали ИФА при кратном разведении суспензии (Рисунок 12). В качестве контроля были использованы гомогенаты корней неинокулированных растений.

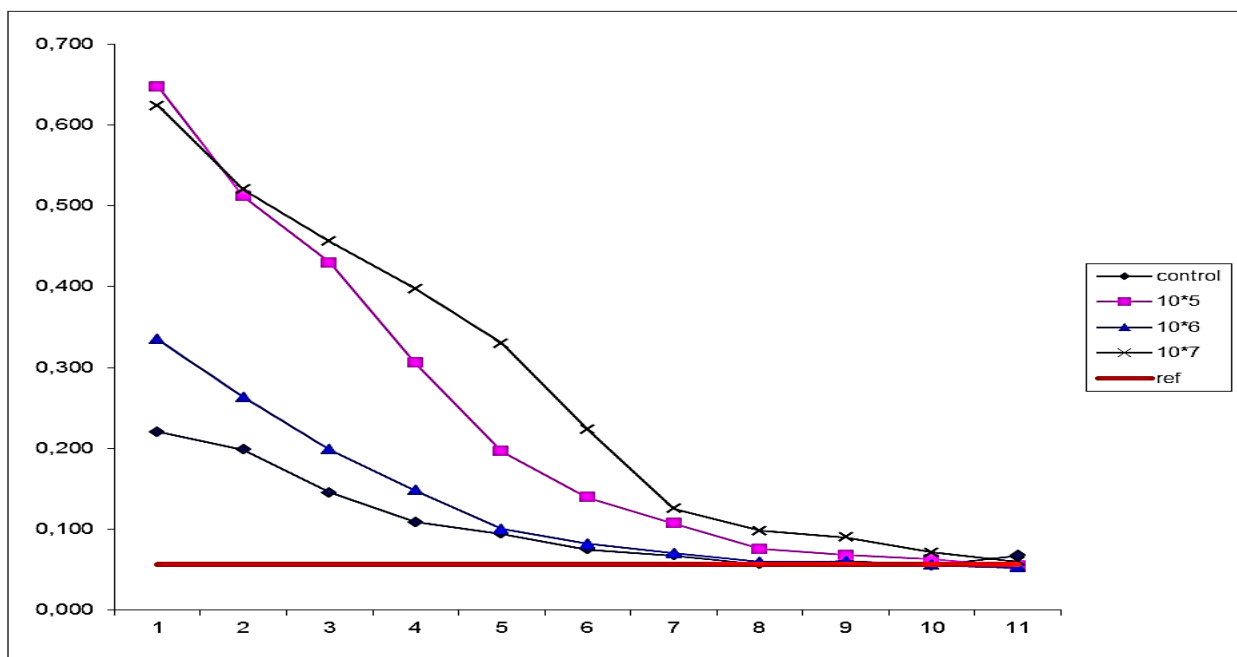


Рисунок 12 – Определение количества бактерий на корнях микрорастений картофеля в вариантах инокуляции бактериями изолята IPA7.2 в различных концентрациях методом иммуноферментного анализа

Сравнение вариантов с кратным разведением субстрата показало, что после 20 суток совместного культивирования на корнях микрорастений картофеля в варианте с концентрацией 10^5 бактерий изолята IPA7.2 было в 4раза больше, а в варианте 10^7 кл/мл – в 6 раз больше, чем в варианте 10^6 кл/мл.

2.2.6. Идентификация изолята IPA7.2

В 2017 году проведена идентификация изученного природного изолята IPA7.2. Для идентификации штамма и его свойств было использовано секвенирование гена 16S рНК и полифазного подхода (Бактериальный изолят из..., 2017).

Выявлено 8 групп с практически идентичными последовательностями 16S рНК (> 97 %, <http://www.ezbiocloud.net/identify>) и с числом видов от 2 до 28, объединяющих 64 бактериальных вида. Это более чем в 5 раз расширяет фактический список видов, которые близкородственны IPA7.2 и входят в филогенетические деревья (Рисунок 13).

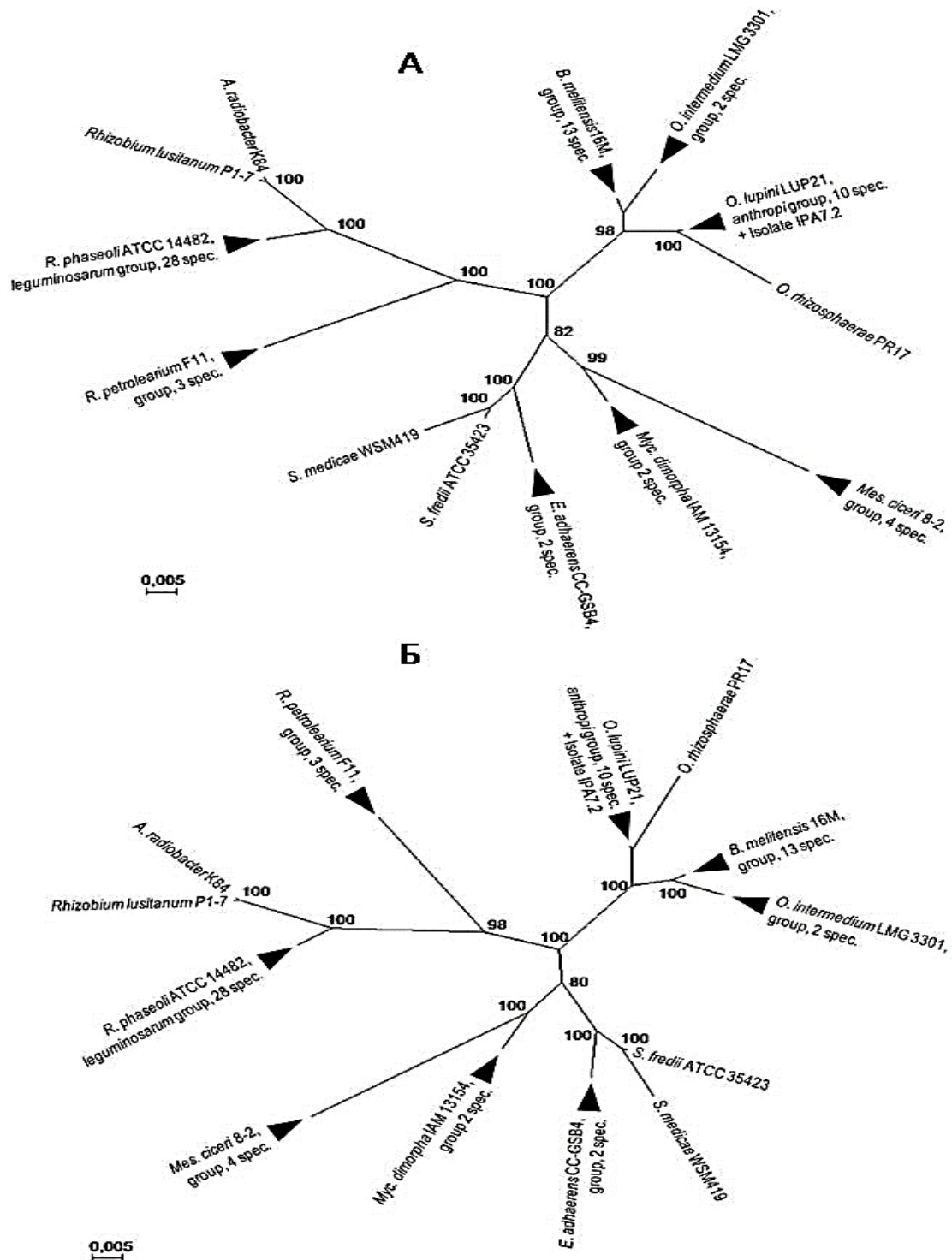


Рисунок 13 – Филограмма штаммов, близкородственных изоляту IPA7.2, построенная по методу MrBayes с множественным выравниванием последовательностей методом Clustal Omega (А) и по технологии SILVA (Б)

На рисунке указаны сокращенные родовые названия *Agrobacterium*, *Brucella*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Mycoplana*, *Ochroactrum*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*.

Черными треугольниками обозначено попадание организмов с выявленными последовательностями 16S рРНК в состав соответствующих таксономических групп (<http://www.ezbiocloud.net/identify>), число видов в которых варьирует от 2 до 28. Цифрами показана статистическая поддержка узлов (байесовская апостериорная вероятность, %).

В результате сравнения нуклеотидных последовательностей (Рисунок 14) показано, что таксономическое окружение изолята IPA7.2 составляют представители рода *Ochrobactrum*, относящиеся к семейству *Brucellaceae*, порядку *Rhizobiales* подкласса α -протеобактерий. Из четырех наиболее близких штаммов так называемой «таксономической группы» – *Ochrobactrum anthropi* group три относятся к категории почвенных бактерий, активно взаимодействующих с бобовыми растениями (*O. lupini* LUP21, *O. cytisi* ESC1) или живущих на корнях пшеницы (*O. tritici* SCII24), а один (*O. anthropi* ATCC 49188) выделен из взятых у человека клинических проб (в большинстве случаев из крови).

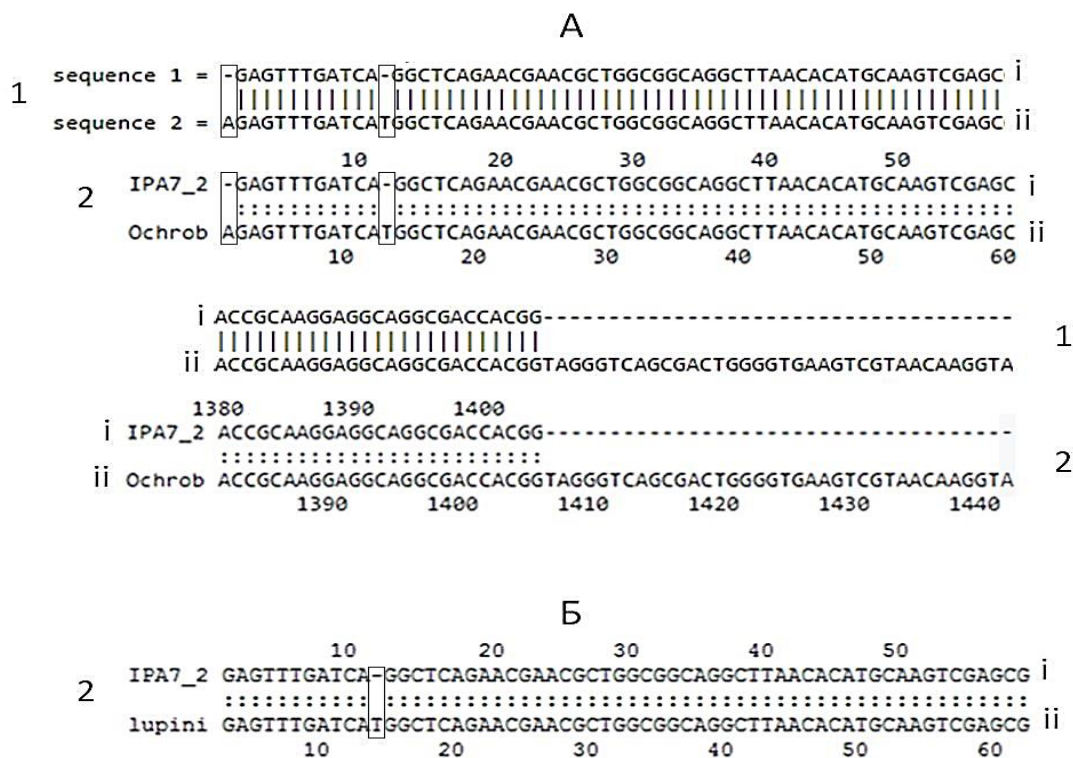


Рисунок 14 – Фрагменты глобального (А) и локального (Б) выравнивания последовательностей гена 16S рРНК идентифицируемого изолята IPA7.2 (i) и штамма *Ochrobactrum lupini* LUP21 (ii): 1 – метод O.S. Kim с соавт. (Kim, 2012), 2 – в программе LALIGN

Для обоснованного соотнесения штамма IPA7.2 с тем или иным видом внутри таксономической группы *Ochrobactrum anthropi* потребовались дополнительные физиолого-биохимические исследования, проведенные сотрудниками ФИЦ СЦ ИБФРМ РАН и позволившими отнести в итоге данный штамм IPA7.2 к виду *Ochrobactrum lupini* (Бактериальный изолят из..., 2017).

Для более точной видовой идентификация штамма был выполнен MLSA с использованием данных секвенирования полного генома штамма IPA7.2 (GenBank No. NZ_MOEC00000000.1). На данный момент MLSA оказался единственным возможным способом установления видовой принадлежности исследуемого нами штамма, в связи с тем, что в доступных базах данных отсутствуют сведения о геномах типовых штаммов *O. tritici* DSM13340 и *O. cytisi* LMG22713. Для анализа был выбран набор фрагментов шести консервативных генов, использованный ранее для типирования бактерий рода *Ochrobactrum* (Romano, 2009). Результаты выполненных филогенетических исследований (Рисунок 15) свидетельствуют о филогенетической близости выделенного нами штамма IPA7.2 с типовым штаммом *Ochrobactrum cytisi* LMG22713 и нахождении на разных монофилитических ветвях с типовыми штаммами *O. anthropi* ATCC49188, *O. lupini* LMG22727 и *O. tritici* DSM13340. Эти данные позволяют отнести исследуемый штамм к виду *Ochrobactrum cytisi* (*Ochrobactrum cytisi* IPA7.2..., 2019). Hördt с соавторами (2020) рекласифицировали род *Ochrobactrum*, объединив его с родом *Brucella*.

На основании биохимической оценки установлено, что клетки *O. cytisi* IPA7.2 при инкубации при 50°C оставались жизнеспособными как минимум в течение 7 дней, и при снижении температуры до 35°C бактериальная культура быстро переходила в фазу экспоненциального роста. После инкубации бактериальной суспензии при 60°C рост культуры не возобновлялся.

Показана галотолерантность исследуемого штамма в экспериментах по культивированию в средах с содержанием NaCl в концентрациях от 1% до 7,5%. Хлорид натрия до концентрации 2,5% в среде почти не оказывал влияния на ростовые характеристики *O. cytisi* IPA7.2. При концентрации 5% NaCl наблюдался незначительный рост культуры, отсутствовавший при большей концентрации соли.

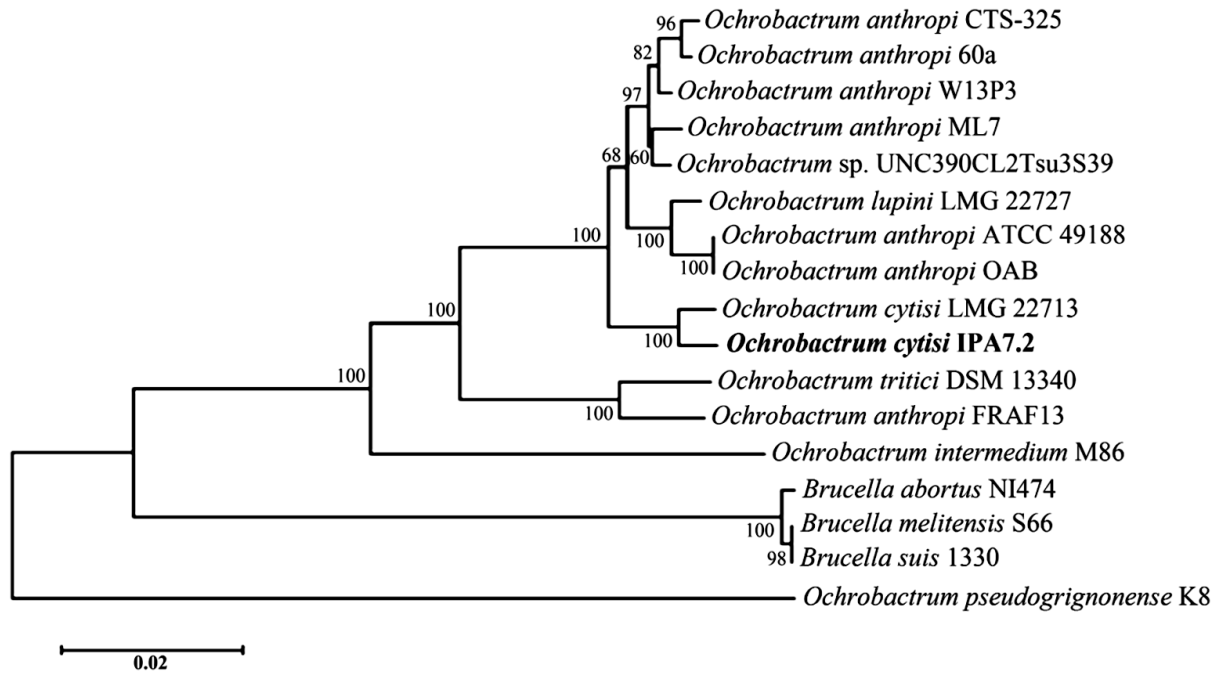


Рисунок 15 – Филогенетическое древо штаммов, близкородственных изоляту IPA7.2, полученное по последовательностям фрагментов 6 house-keeping genes (*gap*, *rpoB*, *dnaK*, *trpE*, *aroC*, and *recA*)

Также была исследована устойчивость штамма *O. cytisi* IPA7.2 к широко применяемому в агротехнологии гербициду глифосату. Установлено, что глифосат не токсичен в концентрациях менее 1 мМ для данных бактерий. Снижение ростовых характеристик культуры *O. cytisi* IPA7.2 наблюдалось при концентрациях гербицида от 1 мМ до 15 мМ. При более высоких концентрациях глифосата рост бактериальной культуры не был отмечен в течение 72 часов.

Биохимическим подтверждение способности данных бактерий к продукции ауксина стало выявление методом ВЭЖХ $8,1 \pm 0,5$ мкг мл⁻¹ индолил-3-уксусной кислоты в культуральной жидкости пятисуточной культуры *O. cytisi* IPA7.2, выращенной на малатно-солевой среде с добавлением L-триптофана. Обнаруженное нами количество ауксина в среде культивирования хорошо соотносится и лишь немногим превосходит описанные в литературе данные по синтезу ИУК штаммами рода *Ochrobactrum*: *Ochrobactrum* sp. Pv2Z2 – 2 мкг мл⁻¹ (*Ochrobactrum* sp. Pv2Z2..., 2014) и *Ochrobactrum intermedium* CP-2 – 6 мкг мл⁻¹ (*Improvement of growth...*, 2017). Поиск генов, предположительно ответственных за

биосинтез ауксина, в геноме штамма *O. cytisi* IPA7.2 показал наличие у этих бактерий генов *iaaH* (OIS93875), *nit1* (OIS90650), *nit2* (OIS90514), *iorAB* (OIS93980-OIS93981). Подтверждение участия этих генов в синтезе ауксина требует дальнейших молекулярно-генетических исследований. Для *O. cytisi* IPA7.2 проведено полногеномное секвенирование с депонированием данных в базе данных GenBank NCBI (MOEC01000000).

Изученный штамм депонирован в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) в 2017 году под регистрационным номером RCAM04481 и признан практически-ценным (приложение 5). Данный штамм обладает рост-стимулирующей активностью по отношению к проросткам пшеницы и микроклонам картофеля. Устойчив к гербициду глифосату. *O. cytisi* IPA7.2 также находится в коллекции ризосферных микроорганизмов ФИЦ СЦ ИБФРМ РАН как IBPPM544. Нуклеотидная последовательность гена 16S rRNA штамма внесена в базу данных NSBI под номером KU217325.1 (Рисунок 16).

The screenshot shows the NCBI GenBank entry for the 16S ribosomal RNA gene, partial sequence of *Ochrobactrum lupini* strain IPA7.2. The entry details include the accession number KU217325.1, the locus information (1403 bp DNA linear BCT 09-DEC-2016), and the definition: "Ochrobactrum lupini strain IPA7.2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence." The authors listed are Shchyogolev, S.Y., Burygin, G.L., Popova, I.A., and Nator, L.Y. The title of the reference is "Topical problems in the molecular genetic identification of prokaryotes (in ? (Ed.); PROCEEDINGS OF THE ALL-RUSSIA SCIENTIFIC CONFERENCE WITH INTERNATIONAL PARTICIPATION 'PROSPECTS FOR THE DEVELOPMENT OF CHEMICAL AND BIOLOGICAL TECHNOLOGIES IN THE 21ST CENTURY'; OOO Referent, Saransk, Russia (2015)".

Рисунок 16 – Регистрация нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA штамма IPA7.2 в базе данных NSBI

Таким образом, в проведенном исследовании было изучено 15 природных изолятов ризосферных бактерий из 171, выделенных из корней растений картофеля районированных сортов Невский и Кондор, выращенных в естественных условиях почве Саратовской области. Из 15 изолятов 4 изолята (Т1Nn01, К2Kn09, Т1Ks19 и IPA 7.2) можно рекомендовать для инокулировании микрорастений картофеля при микроклональном размножении для повышения темпов роста и адаптивной способности.

2.2.7. Изучение ответных реакций двух сортов растений картофеля на коинокуляцию двумя штаммами бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2

2.2.7.1. Влияние коинокуляции штаммами *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 на показатели микрорастений картофеля на этапе *in vitro*

Одним из направлений развития агробιοтехнологии является создание экологически безопасных биопрепаратов на основе симбиотических микроорганизмов, стимулирующих рост растений. Эффективность таких препаратов может быть повышена за счет комплексного использования одновременно нескольких видов микроорганизмов, различающихся устойчивостью к факторам окружающей среды, механизмами воздействия на растение или другими свойствами. Для исследования эффекта коинокуляции микрорастений картофеля одновременно двумя видами бактерий были отобраны штаммы *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2. Ранее было показано, что характер влияния штаммов различается: коллекционный штамм *A. baldaniorum* Sp245 преимущественно стимулирует рост микрорастений в культуре *in vitro*, тогда как выделенный из картофеля штамм *O. cytisi* IPA7.2 в большей степени улучшает рост растений на этапе адаптации к условиям выращивания в почве.

Опыт проводили в течение двух лет (2017-2018 гг.). Растения картофеля двух сортов Кондор и Невский инокулировали как отдельными штаммами, так и в комплексе по следующей схеме:

1. Контроль (без инокуляции бактериями);
2. Инокуляция штаммом *A. baldaniorum* Sp245 на этапе черенкования микрорастений картофеля (0 сутки);
3. Инокуляция штаммами *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки после черенкования);
4. Инокуляция штаммами *A. baldaniorum* Sp245 (15 сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 7.2 (15 сутки);
5. Инокуляция штаммом *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки).

На длину побега микрорастений картофеля сорта Невский все варианты инокуляции влияли положительно (Таблица 28). Микрорастения, инокулированные штаммом *A. baldaniorum* Sp245 при черенковании, были выше контроля на 18,9% и это максимальный показатель среди изучаемых вариантов. Для сорта Кондор все варианты инокуляции оказывали негативный эффект на длину побега, кроме варианта со штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки).

Вариант сорта Кондор со штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) был на уровне с контролем. В среднем по сортам (фактор В) все опытные варианты превосходили контроль за исключением варианта с инокуляцией штаммом *O. cytisi* IPA7.2, в котором наблюдалось снижение длины побегов на 3,4%.

По признаку «Количество узлов на побеге» для сорта Невский все варианты инокуляции положительно влияли, кроме инокуляции штаммом *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки), где длина растений не отличалась от контроля. Микрорастения, инокулированные штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки), имели больше узлов на 11,6%. Микрорастения, инокулированные ассоциацией *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки), имели больше узлов на 5%. Микрорастения, инокулированные ассоциацией *A. baldaniorum* Sp245 (15 сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки), имели больше узлов на 10,5%. Варианты инокуляции сорта Кондор одним штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) и совместно штаммами *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки) были на уровне с контролем. Остальные варианты инокуляции отрицательно влияли на количество узлов на микрорастениях сорта Кондор.

Таблица 28 – Влияние штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 на морфологические параметры микрорастений картофеля сортов Невский и Кондор в культуре *in vitro*, 2017-2018 гг.

Вариант	Длина побега, мм			Количество узлов на побеге, шт.			Средняя длина корня, мм			Количество корней на побеге, шт.		
	Невский	Кондор	В среднем (фактор В)	Невский	Кондор	В среднем по сортам (фактор В)	Невский	Кондор	В среднем по сортам (фактор В)	Невский	Кондор	В среднем по сортам (фактор В)
Контроль	74,20e	65,67d	69,93b	8,22c	8,20c	8,21b	53,67c	65,60h	59,63d	9,74cd	8,98a	9,36ab
Sp245 (0 сут.)	88,24i	64,67d	76,46e	9,18f	8,16bc	8,67d	56,00e	64,11g	60,06d	10,96g	10,11ef	10,53c
Sp245 (0 сут.) +7.2 (15 сут.)	86,38h	59,00c	72,69d	8,62d	8,25c	8,43c	51,33a	51,78a	51,56a	10,36f	11,38h	10,87d
Sp245 (15 сут.) +7.2 (15 сут.)	86,24gh	55,63a	70,94c	9,09ef	7,40a	8,25b	53,33bc	51,56a	52,44b	9,91de	9,14ab	9,52b
7.2 (15 сут.)	77,53f	57,50b	67,52a	8,27c	7,24a	7,76a	55,67de	60,89f	58,28c	9,20ab	9,33b	9,27a
В среднем (фактор А)	82,52b	60,49a		8,68b	7,85a		54,00a	58,79b		10,03b	9,79a	
Варианты	F _{факт.} =1151,392*, НСР _{0,05} =1,11			F _{факт.} =80,098*, НСР _{0,05} =0,20			F _{факт.} =189,323*, НСР _{0,05} =1,14			F _{факт.} =70,815*, НСР _{0,05} =0,28		
Фактор А	F _{факт.} =8683,185*, НСР _{0,05} =0,49			F _{факт.} =357,693*, НСР _{0,05} =0,09			F _{факт.} =386,784*, НСР _{0,05} =0,51			F _{факт.} =16,467*, НСР _{0,05} =0,12		
Фактор В	F _{факт.} =159,665*, НСР _{0,05} =0,78			F _{факт.} =47,317*, НСР _{0,05} =0,14			F _{факт.} =224,375*, НСР _{0,05} =0,80			F _{факт.} =119,081*, НСР _{0,05} =0,20		
Взаимодействие факторов	F _{факт.} =260,171*, НСР _{0,05} =1,11			F _{факт.} =43,482*, НСР _{0,05} =0,20			F _{факт.} =104,906*, НСР _{0,05} =1,14			F _{факт.} =36,137*, НСР _{0,05} =0,28		

Примечание – «*» – F_{факт.} ≥ F_{теор.}, Фактор А – эффект бактеризации; фактор В – эффект сорта.

В среднем по сортам (фактор В) количество узлов на побегах увеличивалось при инокуляции штаммом *A. baldaniorum* Sp245 отдельно или в сочетании с *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки) (Таблица 28).

По признаку «Средняя длина корня» только инокуляция чистыми штаммами положительно влияла на сорт Невский: штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) на 4% по сравнению с контролем, а штаммом *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки) – на 3,7%. Однако, инокуляция бактериальным комплексом *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки) негативно влияла на длину корней (ниже контроля на 4,3%). Для сорта Кондор все варианты инокуляции отрицательно влияли на длину корней. В среднем по генотипам (фактор В) все варианты инокуляции микрорастений бактериями отрицательно сказывались на длине корней, кроме варианта с инокуляцией штаммом *A. baldaniorum* Sp245, действие которого было нейтральным (см. Таблица 28).

По количеству корней для обоих сортов следует выделить варианты с инокуляцией отдельно штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) и совместно штаммами *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки). Варианты сорта Невский и сорта Кондор с инокуляцией штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) имели большее количество корней на 12,5%, чем контроль. Микрорастения сорта Невский, инокулированные ассоциацией *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки), были лучше контроля на 6,3%. Вариант сорта Кондор, инокулированный ассоциацией *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки), был лучше контроля на 26,7% (см. Таблица 28).

Иммунофлуоресцентный анализ корней картофеля сорта Невский с использованием конфокальной микроскопии показал, что оба штамма бактерий успешно вступают во взаимодействие с клетками растений (Рисунок 17). Бактерии обоих штаммов обнаруживались на корнях растений как при использовании для инокуляции чистых культур, так и при ко-инокуляции. Оба штамма бактерий сохранялись в вариантах ко-инокуляции растений, что говорит об отсутствии антагонистического влияния и преимущества какого-либо штамма при взаимодействии с клетками корней картофеля.

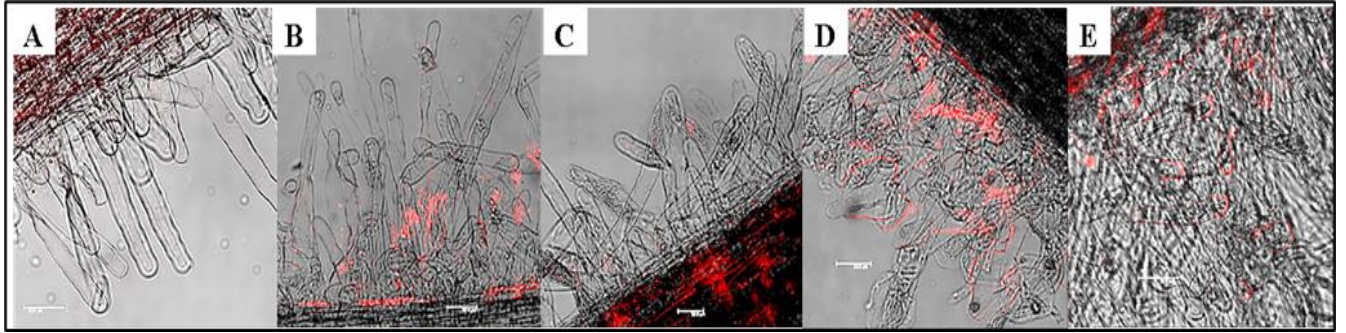


Рисунок 17 – Идентификация бактерий на корнях микрорастений картофеля с использованием иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии: А – контроль без инокуляции бактериями, антитела к *A. baldaniorum* Sp245 + антитела к *O. cytisi* IPA7.2; В – инокуляция штаммом *A. baldaniorum* Sp245, антитела к *A. baldaniorum* Sp245; С – ко-инокуляция штаммами *A. baldaniorum* Sp245 + *O. cytisi* IPA7.2, антитела к *A. baldaniorum* Sp245; D – ко-инокуляция штаммами *A. baldaniorum* Sp245 + *O. cytisi* IPA7.2, антитела к *O. cytisi* IPA7.2; Е – инокуляция штаммом *O. cytisi* IPA7.2, антитела к *O. cytisi* IPA7.2

Таким образом, инокуляция отдельно штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) отдельно или в комплексе *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки) положительно влияла на микрорастения сорта Невский и в среднем по сортам. Увеличивалась длина побега, количество узлов на побеге и количество корней при уменьшении их средней длины.

2.2.7.2. Влияние коинокуляции штаммами *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 на показатели микрорастений картофеля на этапе *ex vitro*

На 30 сутки культивирования в условиях *in vitro* микрорастения картофеля высаживали в сосуды с почвой и адаптировали 20 суток в контролируемых условиях помещения (этап *ex vitro*). Приживаемость в сосудах с почвой в условиях оранжереи была высокой (Рисунок 18). По сорту Невский нет достоверных различий, кроме варианта с инокуляцией штамма *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки). Данный вариант имел ниже приживаемость на 6%, чем контроль. По сорту Кондор два варианта имели ниже приживаемость в отличие от контрольных растений.

Вариант с комплексом штаммов *A. baldaniorum* Sp245 (15 суток) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) ниже контроля на 11%, а вариант со штаммом *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) ниже на 14%.

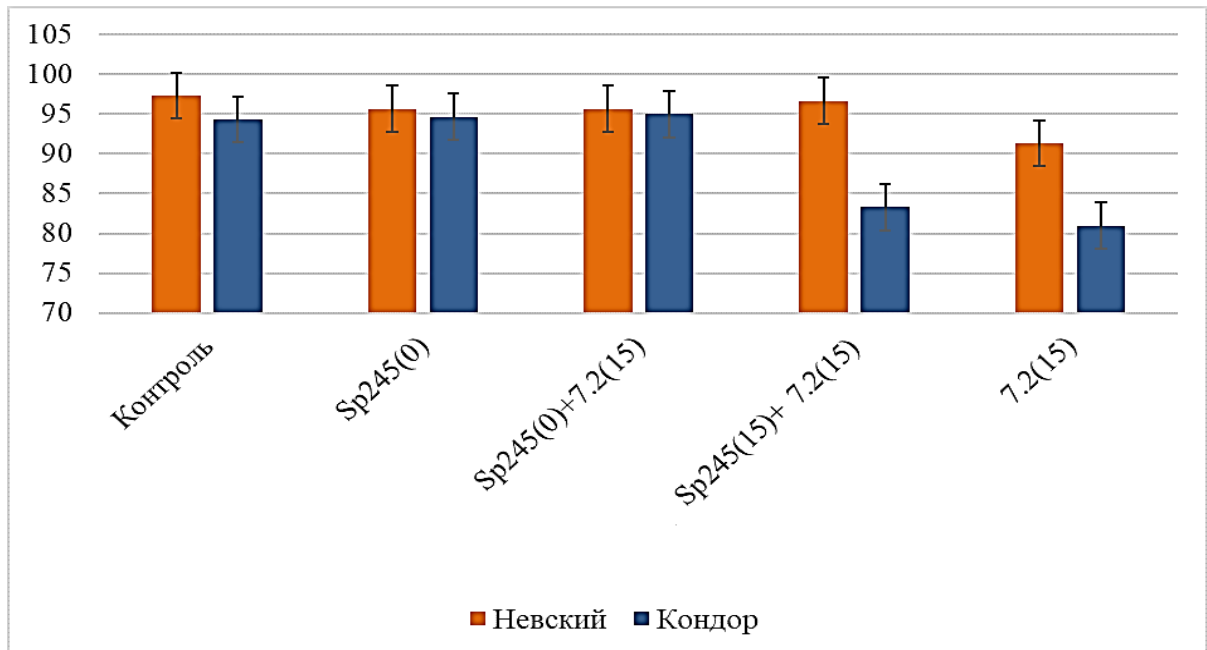


Рисунок 18 – Приживаемость микрорастений картофеля в условиях *ex vitro* за два года, %

По результатам анализа растений на 20 суток выращивания установлено влияние изучаемых штаммов на растения картофеля в культуре *ex vitro* (Таблица 29).

Как и в культуре *in vitro*, в условиях *ex vitro* обнаружено достоверное влияние генотипа на все изучаемые признаки (фактор А). Сорт Невский формировал более крупные побеги с большим числом крупных листьев (Рисунок 19, Рисунок 20).

Все варианты инокуляции положительно влияли на длину побега сорта Невский. Вариант сорта Невский с инокуляцией штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (0 суток) имел более высокие побеги на 14%, по сравнению с контролем. Вариант с комбинацией штаммов *A. baldaniorum* Sp245 (0 суток) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) был выше контроля по этому показателю на 5%. Побеги в варианте с комплексом штаммов *A. baldaniorum* Sp245 (15 суток) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) были выше контроля на 11,5%, а в варианте с инокуляцией одним штаммом *O. cytisi* (15 суток) – выше контроля на 8%.

Таблица 29 – Влияние штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 на морфологические параметры микрорастений картофеля сортов Невский и Кондор в условиях *ex vitro*, 2017-2018 гг.

Вариант	Длина побега, мм			Количество листьев на побеге, шт.			Площадь листовой поверхности, мм ²		
	Невский	Кондор	В среднем (фактор В)	Невский	Кондор	В среднем (фактор В)	Невский	Кондор	В среднем (фактор В)
Контроль	198,91e	185,33d	192,12c	9,13a	9,71bcde	9,42a	2818,22d	1981,07bc	2399,64a
Sp245 (0 сут.)	227,07i	177,67c	202,37d	9,42abc	9,87cde	9,64a	2502,72cd	2263,46bc	2383,09a
Sp245 (0 сут.) +7.2 (15 сут.)	209,45f	156,67a	183,06a	10,09e	10,05de	10,07bc	4514,51g	2122,27bc	3318,39c
Sp245 (15 сут.) +7.2 (15 сут.)	221,95h	155,00a	188,48b	10,84fg	9,31ab	10,08c	4462,48fg	1255,97a	2859,22b
7.2 (15 сут.)	215,78g	165,33b	190,56c	10,91g	9,36ab	10,13c	3365,61e	1889,29b	2627,45ab
В среднем (фактор А)	214,63b	168,00a		10,08b	9,66a		3532,71b	1902,41a	
Варианты	F _{факт.} = 890,316*, НСР _{0,05} = 2,70			F _{факт.} = 18,553*, НСР _{0,05} = 0,42			F _{факт.} = 40,770*, НСР _{0,05} = 506,80		
Фактор А	F _{факт.} = 6581,703*, НСР _{0,05} = 1,20			F _{факт.} = 21,383*, НСР _{0,05} = 0,19			F _{факт.} = 228,387*, НСР _{0,05} = 226,65		
Фактор В	F _{факт.} = 120,839*, НСР _{0,05} = 1,90			F _{факт.} = 9,725*, НСР _{0,05} = 0,30			F _{факт.} = 10,348*, НСР _{0,05} = 358,36		
Взаимодействие факторов	F _{факт.} = 236,947*, НСР _{0,05} = 2,70			F _{факт.} = 26,673*, НСР _{0,05} = 0,42			F _{факт.} = 24,287*, НСР _{0,05} = 506,80		

Примечание – «*» – F_{факт.} ≥ F_{теор.}, Фактор А – эффект бактеризации; фактор В – эффект сорта.



Рисунок 19 – Растения картофеля сорта Невский в условиях *ex vitro*. Слева на право варианты: Контроль; Sp245 (0 сут.); Sp245 (0 сут.) +7.2 (15 сут.); Sp245 (15 сут.) +7.2 (15 сут.); 7.2 (15 сут.)



Рисунок 20 – Растения картофеля сорта Кондор в условиях *ex vitro*. Слева на право варианты: Контроль; Sp245 (0 сут.); Sp245 (0 сут.) +7.2 (15 сут.); Sp245 (15 сут.) +7.2 (15 сут.); 7.2 (15 сут.)

Такая же ситуация, как и в культуре *in vitro* для сорта Кондор. Все варианты инокуляции отрицательно влияли на длину побега на величину от 4 до 16%. В среднем по сортам (фактор В) только инокуляция чистым штаммом *A. baldaniorum* Sp245 увеличивала длину микрорастений на этапе адаптации *ex vitro* на 5,2%. Ко-инокуляция двумя штаммами снижала высоту побегов на 1,9-4,7%. Штамм *O. cytisi*

в чистом виде не оказал влияния на длину побегов в среднем по двум генотипам за счет разнонаправленного влияния на каждый из сортов.

По признаку «Количество листьев на побеге» все варианты сорта Кондор не отличались от контрольных растений. На сорте Невский бактериализация во всех вариантах оказала положительное влияние на данный признак, кроме варианта с инокуляцией штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки), в котором не установлено достоверных отличий от контроля. Растения сорта Невский, инокулированные комплексом штаммов *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки), формировали больше листьев на 10,5%, чем контроль. Вариант с комплексом штаммов *A. baldaniorum* Sp245 (15 сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки) имел больше листьев на 18,7%, чем контроль. Растения сорта Невский, инокулированные штаммом *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки), имели больше листьев на 19,4%, чем контрольные. Аналогичное влияние зафиксировано в среднем по генотипам (фактор В). Количество листьев на побегах увеличилось во всех вариантах бактериализации в присутствии штамма *O. cytisi* IPA7.2 в комплексе или отдельно на 7,5-13,6%.

У сорта Кондор по признаку «Площадь листовой поверхности» все варианты с инокуляциями не отличались от контроля, кроме варианта с *A. baldaniorum* Sp245 (15 сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки), где установлен отрицательный эффект на 36,6%. На площадь листьев растений сорта Невский инокуляции отдельно штаммом *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки) и совместно штаммами *A. baldaniorum* Sp245 + *O. cytisi* IPA7.2 влияла положительно. Растения, инокулированные комплексом штаммов в обоих вариантах, имели выше показатели площади листьев на 60%, чем контрольные. Растения, инокулированные штаммом *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки), имели более высокий данный показатель на 19%, чем контрольные. В среднем по генотипам (фактор В) установлено положительное влияние коинокуляции двумя штаммами последовательно или одновременно соответственно на 38,3 и 19,2%.

Таким образом, эффект инокуляции микрорастений в условиях *in vitro* на этапе адаптации *ex vitro* существенно зависел от генотипа. На растения картофеля сорта Невский положительно влияла инокуляция штаммом *O. cytisi* IPA7.2 (15

сутки) отдельно или в комплексе *A. baldaniorum* Sp245 по всем показателям. Для сорта Кондор влияние было наоборот отрицательным, либо растения не отличались от контроля.

2.2.7.3. Влияние коинокуляции штаммами *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 на рост и продуктивность растений картофеля в условиях теплицы

Далее растения после этапа адаптации *ex vitro* высаживали в летнюю каркасную теплицу в мае. Приживаемость растений на данном этапе была существенно ниже, чем в сосудах в контролируемых условиях (Рисунок 21), так как факторы среды не контролировались и зависели от окружающей среды. В период адаптации по данным сайта <http://www.weatherarchive.ru> наблюдались значительные повышения температуры воздуха в дневные часы в 2017 году до 25 °С, в 2018 году до 32 °С. По данным сайта <http://www.weatherarchive.ru> влажность воздуха в отдельные дни снижалась в 2017 году ниже 35%, а в 2018 году ниже 30%.

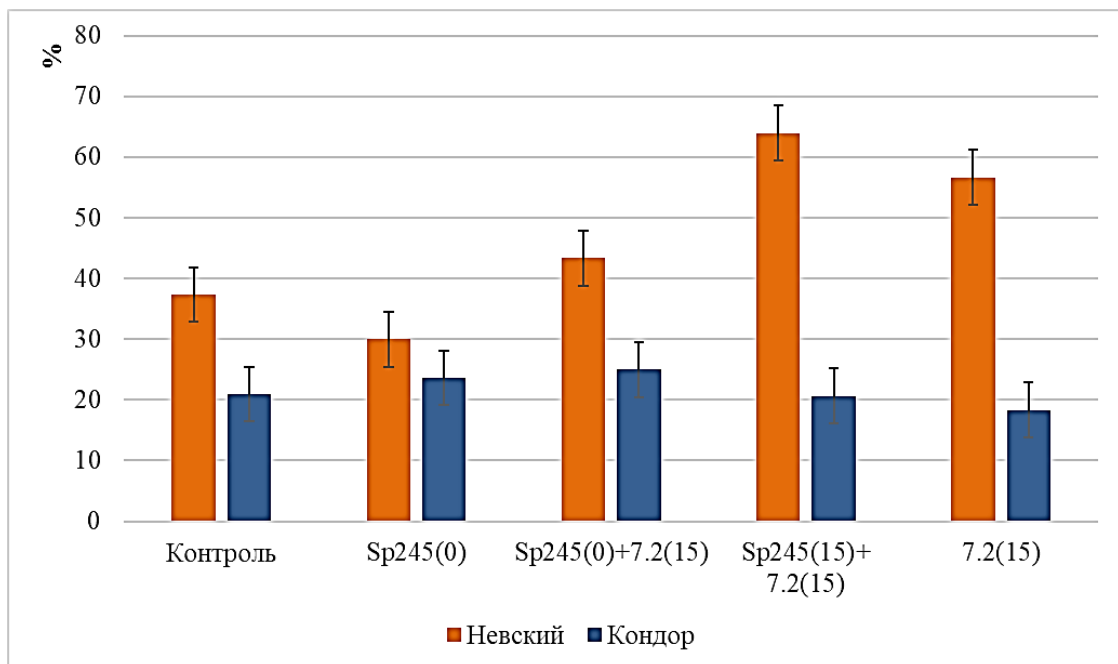


Рисунок 21 – Приживаемость растений картофеля в условиях теплицы за два года

В этих условиях приживаемость растений составила для сорта Невский от 30 до 64%, а для сорта Кондор еще ниже: от 18,33 до 25% (см. Рисунок 21). Установлен

достоверный положительный эффект бактеризации растений на приживаемость растений сорта Невский в вариантах с инокуляцией штаммом *O. cytisi* IPA7.2 отдельно и в комплексе с *A. baldaniorum* Sp245. Варианты сорта Кондор не отличались от контроля.

В фазу цветение-бутонизация измеряли морфометрические показатели: длина побега, количество листьев и площадь листовой поверхности. Результаты анализа представлены в таблице 30.

Как и на предыдущих этапах, растения сорта Кондор достоверно уступали по вегетативной массе сорту Невский. В условиях теплицы обнаружено влияние бактериальной инокуляции по всем сортам и признакам, причем существенно более выраженное, чем на предыдущих этапах культивирования. Практически по всем вариантам опыта и трем изучаемым признакам установлено положительное влияние бактеризации по сравнению с контролем. Только в одном варианте с инокуляцией растений сорта Кондор штаммом *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) был обнаружен негативный эффект на длину побега на 11%, что, вероятно, можно считать артефактом, полученным в результате усреднения данных двух лет исследований. В двух вариантах опыта не установлено достоверного эффекта по сравнению со стандартом: у растений сорта Кондор по длине побегов при инокулировании штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (0 суток) и по площади листьев при инокулировании комплексом штаммов *A. baldaniorum* Sp245 (0 суток) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток). В остальных вариантах в среднем по сортам и по каждому сорту отдельно эффект был положительный (Таблица 30).

По длине побегов в среднем по сортам (фактор В) и по каждому сорту (Невский, Кондор) в отдельности максимальный положительный эффект наблюдался в варианте с инокуляцией штаммами *A. baldaniorum* Sp245 (0 суток) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) соответственно на 43,1, 57,1 и 27,5%.

По количеству листьев аналогичный максимальный положительный эффект наблюдался в варианте с одновременной инокуляцией штаммами *A. baldaniorum* Sp245 (15 суток) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) соответственно на 67,0, 80,5 и 51,1%.

Таблица 30 – Влияние штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 на рост побегов картофеля сортов Невский и Кондор в условиях теплицы, 2017-2018 гг.

Вариант	Длина побега, см			Количество листьев на растении, шт.			Площадь листовой поверхности, см ²		
	Невский	Кондор	В среднем (фактор В)	Невский	Кондор	В среднем (фактор В)	Невский	Кондор	В среднем (фактор В)
Контроль	40,55cd	36,27b	38,41a	45,42c	38,50a	41,96a	24480,09e	6130,29a	15305,19a
Sp245 (0 сут.)	42,82e	37,38b	40,10b	55,25e	42,08b	48,67b	32190,22f	8291,61cd	20240,91b
Sp245 (0 сут.) +7.2 (15 сут.)	63,69gh	46,24f	54,97e	67,00h	55,17e	61,08d	37856,79h	6180,43a	22018,61c
Sp245 (15 сут.) +7.2 (15 сут.)	65,14h	41,29d	53,22d	82,00i	58,17f	70,08e	36608,54g	8052,29bc	22330,42c
7.2 (15 сут.)	64,72h	32,11a	48,42c	64,17g	51,25d	57,71c	41869,17i	8643,12d	25256,14d
В среднем (фактор А)	55,39b	38,66a		62,77b	49,03a		34600,96b	7459,55a	
Варианты	F _{факт.} = 651,184, НСР _{0,05} = 1,47			F _{факт.} = 560,753*, НСР _{0,05} = 1,62			F _{факт.} = 8063,920*, НСР _{0,05} = 496,09		
Фактор А	F _{факт.} = 2839,801*, НСР _{0,05} = 0,65			F _{факт.} = 1582,151*, НСР _{0,05} = 0,72			F _{факт.} = 66062,758*, НСР _{0,05} = 221,86		
Фактор В	F _{факт.} = 457,893*, НСР _{0,05} = 1,04			F _{факт.} = 801,953*, НСР _{0,05} = 1,14			F _{факт.} = 967,195*, НСР _{0,05} = 350,79		
Взаимодействие факторов	F _{факт.} = 297,322*, НСР _{0,05} = 1,47			F _{факт.} = 64,204*, НСР _{0,05} = 1,62			F _{факт.} = 660,938*, НСР _{0,05} = 496,09		

Примечание – «*» – F_{факт.} ≥ F_{теор.}, Фактор А – эффект бактеризации; фактор В – эффект сорта.

Максимальное увеличение площади листовой поверхности в среднем по сортам (Фактор В) и по каждому сорту (Невский, Кондор) наблюдалось при инокуляции штаммом *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) соответственно на 65,0, 71,0 и 41,0%.

Сбор урожая мини-клубней проводили в конце августа – начале сентября. У мини-клубней измеряли больший, меньший диаметр и массу каждого клубня. Результаты измерений представлены в таблице 31.

По средним данным по генотипам (фактор В) инокуляция растений штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (0 суток) приводила к уменьшению размера клубней, но остальные варианты инокуляции существенно увеличивали размер клубней по обоим диаметрам. В среднем по размеру клубней максимальный положительный эффект обнаружен в вариантах с инокуляцией растений штаммом *O. cytisi* IPA7.2 отдельно и в комплексе *A. baldaniorum* Sp245 (0 суток) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток). Больший диаметр мини-клубней увеличивался при инокуляции одним штаммом на 14,7%, а при инокуляции комплексом этих штаммов на 14,9%. У сорта Кондор больший диаметр также максимально увеличивался в варианте с инокуляцией штаммом *O. cytisi* IPA7.2 на 41,9%, а у сорта Невский – в варианте с инокуляцией штаммами *A. baldaniorum* Sp245 (15 суток) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) на 12,5%. Меньший диаметр клубней (Таблица 31) в среднем по генотипам (фактор В) максимально увеличивался в варианте с инокуляцией растений штаммом *O. cytisi* IPA7.2 на 13,6% и в комплексе *A. baldaniorum* Sp245 (0 суток) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) на 12,0%. У сорта Кондор максимальное увеличение меньшего диаметра клубней наблюдалось в варианте с инокуляцией штаммом *O. cytisi* IPA7.2 на 41,8%. У сорта Невский меньший размер клубней увеличивался по сравнению с контролем только в одном варианте инокуляции *A. baldaniorum* Sp245 (15 суток) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) на 8,8%. Следует отметить, что инокуляция растений сорта Невский каждым из двух штаммов по отдельности приводила к уменьшению размера мини-клубней по большему и меньшему диаметрам. Для сорта Кондор негативное влияние на размер клубней отмечено в одном варианте

Таблица 31 – Влияние штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 на морфологические параметры клубней картофеля сортов Невский и Кондор в условиях теплица, 2017-2018 гг.

Вариант	Больший диаметр клубня, мм			Меньший диаметр клубня, мм.			Масса клубня, гр		
	Невский	Кондор	В среднем (фактор В)	Невский	Кондор	В среднем (фактор В)	Невский	Кондор	В среднем (фактор В)
Контроль	51,25g	33,00a	42,12b	35,83gh	23,92b	29,87b	63,61fg	25,64ab	44,63bc
Sp245 (0 сут.)	35,17bc	35,92c	35,54a	26,50c	26,08c	26,29a	18,74a	18,35a	18,55a
Sp245 (0 сут.) +7.2 (15 сут.)	53,42h	43,25d	48,33d	36,00h	30,92d	33,46d	58,57ef	32,09bc	45,33c
Sp245 (15 сут.) +7.2 (15 сут.)	57,67i	31,83a	44,75c	39,00i	23,00a	31,00c	50,56de	26,93ab	38,75b
7.2 (15 сут.)	49,92f	46,83e	48,38d	33,92ef	33,92f	33,92d	69,99g	38,13c	54,06d
В среднем (фактор А)	49,48b	38,17a		34,25b	27,57a		52,30b	28,23a	
Варианты	F _{факт.} = 520,817*, НСР _{0,05} = 1,21			F _{факт.} = 359,862*, НСР _{0,05} = 0,88			F _{факт.} = 43,661*, НСР _{0,05} = 8,58		
Фактор А	F _{факт.} = 1914,938*, НСР _{0,05} = 0,54			F _{факт.} = 1256,261*, НСР _{0,05} = 0,39			F _{факт.} = 173,662*, НСР _{0,05} = 3,83		
Фактор В	F _{факт.} = 339,086*, НСР _{0,05} = 0,85			F _{факт.} = 213,413*, НСР _{0,05} = 0,62			F _{факт.} = 42,521*, НСР _{0,05} = 6,06		
Взаимодействие факторов	F _{факт.} = 354,017*, НСР _{0,05} = 1,21			F _{факт.} = 282,210*, НСР _{0,05} = 0,88			F _{факт.} = 12,301*, НСР _{0,05} = 8,58		

Примечание – «*» – F_{факт.} ≥ F_{теор.}, Фактор А – эффект бактеризации; фактор В – эффект сорта.

опыта при инокуляции комплексом штаммов *A. baldaniorum* Sp245 (15 суток) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) и только по меньшему диаметру (Таблица 31).

Масса мини-клубней в большинстве вариантов опыта не отличалась от контроля. Негативное влияние на массу клубней отмечено в среднем по генотипам (фактор В) при инокуляции штамм *A. baldaniorum* Sp245 на 58,4% и у сорта Невский в этом же варианте инокуляции на 70,5%, а также у это сорта при коинокуляции штаммами *A. baldaniorum* Sp245 (15 суток) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) на 20,5%. Увеличение массы клубней наблюдалось в среднем по генотипам (фактор В) и у сорта Кондор при инокуляции штаммом *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) соответственно на 21,2 и 48,7% (Таблица 31).

Штамм *O. cytisi* IPA7.2 положительно влиял на сорт Кондор по всем признакам размера и массы мини-клубней.

Урожай мини-клубней результирующий показатель, зависящий от массы причин: генетических особенностей сорта, выживаемости растений к уборке, фотосинтетической активности сформированной биомассы, а также стрессовых факторов среды, действовавших на протяжении всего периода вегетации растений.

По данным, проведенным экспериментов (Таблица 32) урожайность сорта Кондор, была ниже сорта Невский, что коррелирует с данными по признакам всех предыдущих этапов. При этом у более урожайного сорта Невский бактериализация в меньшей степени повышала урожайность мини-клубней, чем у менее урожайного сорта Кондор.

Для сорта Кондор положительный эффект бактериализации отмечается практически во всех вариантах бактериализации. Максимальный положительный эффект инокуляции микрорастений на этапе культуры *in vitro* удалось обнаружить в варианте применения комплекса штаммов *A. baldaniorum* Sp245 (0 суток) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток). В данном варианте сбор клубней с одного куста увеличился у сорта Невский на 22%, у сорта Кондор в 2,3 раза, а в среднем по генотипам (фактор В) в 2 раза. Урожайность мини-клубней с 1 м² в данном варианте инокуляции увеличилась у сорта Невский на 11,1%, у сорта Кондор в 6,8 раз, а в среднем по генотипам (фактор В) в 1,9 раза.

Таблица 32 – Влияние штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 на урожайность картофеля сортов Невский и Кондор, 2017-2018 гг.

Вариант	Урожай клубней с 1 куста, гр.			Урожай клубней с 1 м ² , гр.		
	Невский	Кондор	В среднем (фактор В)	Невский	Кондор	В среднем (фактор В)
Контроль	292,92gh	138,00a	165,46bc	1171,68h	151,84a	661,76c
Sp245 (0 сут.)	121,79c	64,36ab	93,07a	483,65d	266,18b	374,92a
Sp245 (0 сут.) +7.2 (15 сут.)	357,50i	320,83hi	339,17d	1418,68i	1034,92g	1226,80d
Sp245 (15 сут.) +7.2 (15 сут.)	208,68ef	154,51bc	151,60b	820,00ef	317,60b	568,80b
7.2 (15 сут.)	210,91f	171,12de	191,01c	843,44f	475,51cd	659,48c
В среднем (фактор А)	238,36b	137,77a		947,49b	449,21a	
Варианты	F _{факт.} =76,121*,HCP _{0,05} =17,57			F _{факт.} =172,300*,HCP _{0,05} =95,98		
Фактор А	F _{факт.} =158,226*,HCP _{0,05} =16,80			F _{факт.} =594,810*,HCP _{0,05} =42,92		
Фактор В	F _{факт.} =105,408*,HCP _{0,05} =26,56			F _{факт.} =193,333*,HCP _{0,05} =67,87		
Взаимодействие факторов	F _{факт.} =26,307*,HCP _{0,05} =37,57			F _{факт.} =45,639*,HCP _{0,05} =95,98		

Примечание – «*» – F_{факт.} ≥ F_{теор.}, Фактор А – эффект бактеризации; фактор В – эффект сорта.

При это, в системе семеноводства картофеля на этапе получения оригинального оздоровленного посадочного материала из микрорастений большее значение имеет не масса получаемых мини-клубней, а их количество с одного растения и с 1 м². Результаты экспериментов по этим параметрам представлены в таблице 33.

С одного растения в данных экспериментах было получено от 2,67 до 9,33 клубней на растение. По сортам количество клубней на растение достоверно не различалось. Эффект бактеризации обнаружен в среднем по генотипам (фактор В) и отдельно по сортам Невский и Кондор в варианте с инокуляцией комплексом штаммов *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки) соответственно 2,3, 3,5 и 1,5 раза. У сорта Невский обнаружен аналогичный эффект увеличения количества мини-клубней с 1 растения в варианте инокуляции отдельно штаммом *A. baldaniorum* Sp245. У сорта Кондор количество клубней на растении также увеличилось в варианте инокуляции отдельно штаммом *O. cytisi* IPA7.2 в 1,9 раза.

Таблица 33 – Влияние штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 на количество клубней сортов Невский и Кондор в культуре, 2017-2018 гг.

Вариант	Количество клубней с 1 м ² , шт.			Количество клубней с 1 куста, шт.		
	Невский	Кондор	В среднем (фактор В)	Невский	Кондор	В среднем (фактор В)
Контроль	48,00efg	9,33a	28,67b	4,33ab	2,67a	3,50a
Sp245 (0 сут.)	29,33c	18,33b	23,83a	6,67cd	3,00ab	4,83a
Sp245 (0 сут.) +7.2 (15 сут.)	53,67g	52,00fg	52,83d	6,67d	9,33e	8,00b
Sp245 (15 сут.) +7.2 (15 сут.)	84,67h	13,67ab	49,17cd	4,00ab	4,33ab	4,17a
7.2 (15 сут.)	39,67d	16,33b	28,00b	3,67ab	5,00bcd	4,33a
В среднем (фактор А)	51,07b	21,93a		5,07	4,87	
Варианты	F _{факт.} =155,435*, НСР _{0,05} =5,64			F _{факт.} = 9,130*, НСР _{0,05} =2,00		
Фактор А	F _{факт.} = 588,403*, НСР _{0,05} =2,52			F _{факт.} = 0,220, НСР _{0,05} =-		
Фактор В	F _{факт.} = 100,006*, НСР _{0,05} =3,99			F _{факт.} = 13,622*, НСР _{0,05} =1,41		
Взаимодействие факторов	F _{факт.} = 102,622*, НСР _{0,05} =5,64			F _{факт.} = 6,866*, НСР _{0,05} =2,00		

Примечание – «*» – F_{факт.} ≥ F_{теор.}, Фактор А – эффект бактеризации; фактор В – эффект сорта.

С 1 м² было получено клубней от 13,67 до 84,67 шт. По сортам получено достоверное различие, а именно сорт Невский превосходил сорт Кондор. У сорта Невский в варианте с инокуляцией комплексом *A. baldaniorum* Sp245 (15 суток) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) увеличилось количество клубней в 1,8 раз. Отдельно инокулированные растения штаммами *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 имели меньшее количество клубней на 1 м² – в 1,6 раз и в 1,2 раза. У сорта Кондор в варианте с инокуляцией комплексом *A. baldaniorum* Sp245 (0 суток) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) увеличилось количество клубней в 5,5 раз.

Таким образом, инокуляция микрорастений на этапе культивирования *in vitro* комплексом штаммов *A. baldaniorum* Sp245 (0 суток) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) существенно увеличивала массу и количество мини-клубней, являющихся оздоровленным оригинальным посадочным материалом. Инокуляция отдельным штаммом *A. baldaniorum* Sp245 и в комплексе *A. baldaniorum* Sp245 (0 суток) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 суток) может быть использована для стимулирования роста

микрорастений и повышения урожайности мини-клубней в системе семеноводств картофеля при получении оздоровленного посадочного материала (Коинокуляция микрорастений картофеля..., 2022).

Заключение

Большинство видов рода *Azospirillum* не могут утилизировать сахарозу, так как для данных микроорганизмов эта особенность является видовым биохимическим признаком (Bergey, 1994). Тем не менее, в изучаемых экспериментах установлено, что штаммы *A. brasilense* SR75, SR64 и *A. lipoferum* SR61 росли на среде MS с сахарозой. Инокуляцию проводили на стадии черенкования, так как ранее было показано, что инокуляция штаммом *A. baldaniorum* Sp245 на этой стадии микроклонов четырёх сортов картофеля оказывала стимулирующий эффект на рост микрорастений (Improved potato microclonal..., 2015).

Отмечено, что наибольший эффект бактеризации проявляется в стимулировании корнеобразования у микрочеренков картофеля в культуре *in vitro*. Наибольшее стимулирующее влияние бактеризации отмечено на количество корней. Инокуляция штаммами приводила к достоверному увеличению количества корней относительно стерильных микрорастений от 18 % (для *A. brasilense* Sp7^T) до 56% (*A. baldaniorum* Sp245). Длина побега микрорастений достоверно стимулировалась инокуляцией пятью штаммами от 14 % (для *A. lipoferum* SR42) до 34% (*A. baldaniorum* Sp245). Достоверного влияния инокуляции каким-либо штаммом на количество узлов микроклонов нами не выявлено. На длину корня выявлено как достоверно положительное влияние (5 штаммов), так и ингибирующее действие (3 штамма).

В культуре *in vitro* наибольший ростстимулирующий эффект на корневую систему микрорастений оказали штаммы *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* SR88, а на длину побега штаммы *A. baldaniorum* Sp245 и *A. brasilense* Sp7^T, S27, SR80.

В условия *ex vitro* по всем изучаемым признакам наблюдались достоверные различия. При культивировании в условиях *ex vitro* микрорастений, бактеризованных при черенковании *in vitro*, были выявлены различные эффекты инокуляции на физиолого-морфологические параметры растений. Так, длина побега микроклонов достоверно увеличивалась только в присутствии штамма *A.*

brasiliense SR80. Инокуляция остальными штаммами либо не влияла на длину побега, либо (в вариантах со штаммами *A. brasiliense* SR8, SR87 и *A. lipoferum* SR85) достоверно снижала её. Достоверных различий в количестве листьев между контрольными и инокулированными растениями выявлено не было (данные не приводятся). А развитие площади поверхности листьев стимулировалось инокуляцией штаммами *A. baldaniorum* Sp245 (на 29%), *A. brasiliense* SR80 (на 15%) и *A. halopraeferens* Au4^T (на 25 %) и ингибировалось штаммами *A. brasiliense* Sp7^T (на 51%) и S27 (на 32%). Наибольшее положительное влияние на сухую массу растений оказала инокуляция штаммом *A. halopraeferens* Au4^T, повысившая более чем в два раза массу побегов и корней. Также сухая масса побегов достоверно повышалась при бактеризации ещё четырьмя штаммами: *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasiliense* S27, *A. lipoferum* SR85 и *Azospirillum* sp. SR38. Ингибирующего действия на сухую массу растений инокуляцией каким-либо штаммом не выявлено. Сухая масса корней стимулировалась инокуляцией, кроме штамма Au4^T, ещё двумя штаммами: *A. baldaniorum* Sp245, *A. lipoferum* SR85 и ингибировалась штаммами *A. brasiliense* SR42 и SR87.

Стимулирующая способность микроорганизмов в культуре *in vitro* связана с продуцированием ИУК (Chou, 1998; Root-associated bacteria..., 2006; Ludwig-Müller, 2011). Биохимический анализ показал, что штаммы, которые оказывали наибольший положительный эффект способны продуцировать ИУК. Наибольшая активность в продукции ИУК была выявлена для штамма *A. baldaniorum* Sp245, в котором содержание ИУК было 87,3 мкг мл⁻¹. Повышение длины побега под воздействием бактериального ИУК связано с поглощением его растениями через корни и последующим транспортом в стебель по ксилеме, где происходит увеличение концентрации фитогормона (Архипова, 2009), приводящее к растяжению клеток побега.

Азотофиксация является важным свойством PGPR. Оценка активности нитрогеназы и роста бактериальной культуры на безазотистой среде Nfb показала, что азотфиксирующими являются 3 штамма: *A. brasiliense* Sp7, S27 и *A. baldaniorum* Sp245.

Влияние инокуляции различными штаммами на ростовые процессы микрорастений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro* сильно различались, что свидетельствует о специфичности взаимодействия микроорганизмов с растениями.

Изучено 15 природных изолятов ризосферных бактерий из 171, выделенных из корней растений картофеля районированных сортов Невский и Кондор, выращенных в естественных условиях почвы Саратовской области. Из 15 изолятов 4 изолята (Т1Nn01, К2Kn09, Т1Ks19 и IPA 7.2) можно рекомендовать для инокулирования микрорастений картофеля при микроклональном размножении для повышения темпов роста и адаптивной способности. Было определено таксономическое положение бактериальных штаммов Т1Kr02, К2Kn02, Т1Ks19, Т1Ks14. Изученные штаммы К2Kn02, Т1Kr02, Т1Ks14, Т1Ks19 и 7.2 депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) в 2017 году.

Исследуемый в данной работе изолят IPA 7.2 по данным MLSA был отнесён к виду *O. cytisi*. При этом, по биохимическим свойствам штамм IPA7.2 отличается от типового штамма *O. cytisi* LMG22713 уреазной активностью (*O. cytisi* sp..., 2007; *O. cytisi* IPA7.2..., 2017). Положительная уреазная активность штамма IPA7.2 подтверждена присутствием в геноме двух оперонов, содержащих гены уреазы (Urease subunit alpha (*ureC*): OIS93271 и OIS93456. Urease subunit beta (*ureB*): OIS93270 и OIS93457). Таким образом, изолят IPA7.2 может быть классифицирован как уреазоположительный представитель вида *O. cytisi* таксономической группы *O. anthropi*.

Физиологические свойства выделенного нами штамма *O. cytisi* IPA7.2 во многом определяются условиями места обитания. Так, способность к росту в широком диапазоне температур от 0°C до 42°C, и сохранением жизнеспособности (без роста культуры) при 50°C обусловлена адаптацией к условиям континентальным климата Саратовской области. Способность к продукции индолил-3-уксусной кислоты и проявление ауксин-подобной активности в отношении растений является одним из основных факторов проявления рост-стимулирующего эффекта. При этом в наших экспериментах показана способность

штамма *O. cytisi* IPA7.2 колонизировать корни как однодольных (пшеница), так и двудольных (картофель, люпин) растений, что свидетельствует об отсутствии специфичности выбора растения-хозяина и возможности взаимодействия с широким кругом растений-хозяев.

Выявленная нами устойчивость к глифосату может быть полезной при инокуляции растений, которые планируется выращивать на полях после интенсивного использования данного гербицида в прошлом и с высоким его остаточным содержанием. Такой подход совмещает рост-стимулирующие свойства бактерий с их устойчивостью гербициду и, возможно, деструктивной способностью (Isolation and characterization..., 2014).

Интересным представляется различие в действии бактериализации штаммом *O. cytisi* IPA7.2 на микрорастения, находящиеся на разном этапе органогенеза. При черенковании, когда только начинается регенерация органов (побегов из пазушных почек и адвентивных корней), внесение бактерий приводит к ингибированию темпов роста микрорастений. При этом не происходит существенного снижения концентрации сахарозы или изменения pH среды (данные не приводятся). И негативное действие бактерий может быть связано с активным увеличением числа микробных клеток и, тем самым, усилением фитоиммунных реакций растительных клеток, замедляющих рост. В то же время, инокуляция микрорастений, уже имеющих дифференцированные органы (корни, узлы и листья), достоверно стимулирует рост растений независимо от размножения бактерий в среде. Напротив, ранее нами было показано (Improved potato microclonal..., 2015), что инокуляция картофеля *in vitro* на стадии черенкования бактериями *A. baldaniorum* Sp245 приводит к рост-стимулирующим эффектам. Однако отмечено, что численность клеток азоспирилл не ассоциированных с корнями растения в среде Мурасиге-Скуга при культивировании значительно снижается (Use of *Azospirillum brasilense*..., 2017), и предположительно, снижается интенсивность фитоиммунных реакций растений на присутствие в среде микробных клеток. Это наблюдение может быть полезным при выборе оптимальных сроков инокуляции микрорастений на этапе культивирования *in vitro*.

Использованная нами в этой работе инокуляция микрорастений картофеля в середине процесса культивирования *in vitro* позволила проявиться достоверному положительному влиянию бактерий штамма *O. cytisi* IPA7.2 на длину побега, количеству узлов и количеству корней. Такое влияние на микрорастения повышает коэффициент размножения и сказывается на экономической эффективности клонального микроразмножения. При пересадке инокулированных растений в условия *ex vitro* наблюдалось лучшая приживаемость микрорастений, что также является важным аспектом успешности процесса клонального микроразмножения.

В течение двух лет изучали ответные реакции растений на инокуляцию микроорганизмами в комплексе и по отдельности. Проводили изучение микрорастений двух сортов Невский и Кондор районированных в Саратовский области. Сорт Невский имел лучше показатели по всем критериям на всех этапах эксперимента. Все варианты инокуляции положительно влияли на длину побегов растений сорта Невский в культуре *in vitro*, в условиях *ex vitro* и теплице. Инокуляция штаммом *A. baldaniorum* Sp245 имела положительный результат на все части органов растений сорта Невский от черенкования до сбора урожая. Для сорта Кондор инокуляции давали положительный эффект на морфометрические признаки только в условиях теплицы, а на остальных этапах было ингибирование или не было достоверных различий от контроля. На протяжении всего опыта были установлены достоверные различия по генотипам (фактор В). Вариант с инокуляцией штаммом *A. baldaniorum* Sp245 был лучше контроля в культуре *in vitro* по морфометрическим показателям (длина побега, количество узлов, количество корней) и в условиях теплице аналогично, на средняя длина корня не отличалась от контроля. В условиях *ex vitro* инокулированные растения по признаку «Длина побега» были лучше контроля, но по признакам «Количество листьев» и «Площадь листовой поверхности» не отличалась от контроля. Инокуляция комплексом бактерий *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки) была положительной по всем показателям в культуре *in vitro*, кроме показателя «Средняя длина корня» и в теплице. В условиях *ex vitro* данная

инокуляция положительно влияла на количество листьев и на площадь листовой поверхности, но на длину побега влияла отрицательно.

Инокуляция микрорастений на этапе культивирования *in vitro* комплексом штаммов *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки) существенно увеличивала массу и количество мини-клубней.

Инокуляция отдельным штаммом *A. baldaniorum* Sp245 и в комплексе *A. baldaniorum* Sp245 (0 сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15 сутки) может быть использована для стимулирования роста микрорастений и повышения урожайности мини-клубней в системе семеноводств картофеля при получении оздоровленного посадочного материала.

Выводы

1. При скрининге коллекционных штаммов ризосферных бактерий рода *Azospirillum* (из коллекции ФИЦ СНЦ ИБФРМ РАН) установлено, что наибольший рост-стимулирующий эффект на корневую систему микрорастений оказали штаммы *A. baldaniorum*Sp245, *A. brasilense* SR88, а на длину побега штаммы *A. baldaniorum*Sp245 и *A. brasilense*Sp7^T, S27, SR80.

2. Выделено 5 изолятов из 171 природных микроорганизмов, полученных из ризосферы картофеля, обладающих рост-стимулирующей активностью в отношении микроклонов картофеля в культуре *in vitro*.

3. Показано, что штамм *O. cytisi* IPA7.2 при инокуляции микрорастений картофеля на 14 сутки после черенкования положительно влияет рост побега и корней, повышает приживаемость микрорастений при адаптации в условиях *ex vitro*.

4. Установлено синергетическое влияние штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и культуре *in vitro* максимальный положительный эффект бактеризации отмечен на увеличение количества адвентивных корней, на этапе адаптации *ex vitro* – на количество и площадь листьев, при выращивании растений в почве в условиях теплицы – на все показатели вегетативной части побегов, а также на массу мини-клубней.

5. Методом иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии показано, что между *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 не наблюдалось антагонистического влияния. Отмечена существенная зависимость рост-стимулирующего эффекта бактерий от генотипа картофеля. Максимальный положительный эффект при взаимодействии двух штаммов отмечен на этапе выращивания инокулированных растений в открытом грунте.

6. Совместное использование двух штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 для инокуляции микрорастений картофеля в культуре *in vitro* стабилизирует методику бактеризации по сравнению с применением чистых монокультур и может

быть рекомендовано для практического применения при микроклональном размножении картофеля в системе производства оздоровленного посадочного материала.

Практические предложения

Рекомендуется для получения высокого качества семенного материала картофеля использовать растительно-микробные ассоциации в культуре *in vitro* и *ex vitro*. В культуре *in vitro* проводить инокуляцию *O. cytisi* IPA7.2 на 15 суток после черенкования микроклонов в концентрации 10^6 клеток в мл. Методика создания растительно-микробных ассоциаций в условиях культуры *in vitro* должна учитывать особенности штаммов ризосферных бактерий (их способность утилизировать сахарозу).

Перспективы дальнейшей разработки темы

Проведенные исследования позволили установить, что при микроклональном размножении оздоровленного посадочного материала картофеля в условиях культуры *in vitro* происходит создание и активное функционирование растительно-микробных ассоциаций с ризосферными рост-стимулирующими бактериями. Результатом штамм-специфической ассоциации являются: стимулирование роста *in vitro* и адаптационного потенциала микрорастений картофеля *ex vitro*, а также получения мини-клубней в условиях грунтовой теплицы. Полученные результаты могут быть использованы для развития экологически чистых агrobiотехнологий в семеноводстве картофеля.

Список сокращений и условных обозначений

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИУК – индолил-3-уксусная кислота

ИФА – иммунно-ферментный анализ

МС – питательная среда Мурасиге Скуга

РНК – рибонуклеиновая кислота

ЭПС – экзополисахариды

PGPR – (plant growth-promoting rhizobacteria) стимулирующие рост растений ризосферные бактерии

Список литературы

1. Анализ генома ризосферного штамма *Ochrobactrum sp.* IPA7.2 / Г.Л. Бурыгин, Е.О. Дубгорина, Н.Е. Гоголева [и др.] // Вавиловские чтения: Материалы межд. науч.-практ. конф. – Саратов, 2016. – С. 95.
2. Архив погоды: сайт: [<http://www.weatherarchive.ru>].
3. Архипова, Т.Н. Влияние инокуляции растений пшеницы цитокинин продуцирующими микроорганизмами на рост растений при повышении уровня минерального питания / Т.Н. Архипова, Н.Л. Анохина // Физиология растений. – 2009. – Т.56, № 6. – С.899-906.
4. Бактериальный изолят из ризосферы картофеля (*Solanum tuberosum L.*), идентифицированный как *Ochrobactrum lupini* IPA7.2 / Г.Л. Бурыгин, И.А. Попова, К.Ю. Каргаполова [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т. 52. – С. 105-115.
5. Банадысев, С.А. Система семеноводства картофеля в Беларуси / С.А. Банадысев // Материалы юбилейной науч.-практ. конф. Мн., 2003. – ч. II. – С. 11.
6. Бойкова, Н.В. Биотехнологические приемы в семеноводстве картофеля / Н.В. Бойкова, О.В. Ткаченко // Вавиловские чтения: Материалы межд. науч.-практ. конф., посвящённой 125-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова. – Саратов, 2012. – С. 46-47.
7. Видовая идентификация ростстимулирующих бактерий, выделенных с корней картофеля в Саратовской области / П.А. Потанина, В.И. Сафронова, А.А. Белимов [и др.] // Вавиловские чтения: Материалы межд. науч.-практ. конф. – Саратов, 2017. – С. 149-154.
8. Влияние ассоциативных псевдомонад и метиловобактерий на рост и устойчивость растений к фитопатогенам и ксенобиотикам / Н.С. Захарченко, С.В. Пиголева, В.В. Кочетков [и др.] // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, №. 1. – С. 89-89.
9. Влияние штамма IPA7.2 на растения картофеля *in vitro* и *ex vitro* при микроклональном размножении / К.Ю. Каргаполова, Н.В. Бойкова, О.В. Ткаченко,

Г.Л. Бурьгин // Вавиловские чтения: Сборник статей межд. науч.-практ. конф. – Саратов, 2016. – С. 108-110.

10. Волкогон, В.А. Биологический азот / В.А. Волкогон, С.Я. Коць, В.П. Патица // Світ. – 2003. – С. 424.

11. Гавриленко, Т.А. Создание новых форм культурных растений на основе соматической гибридизации / Т.А. Гавриленко // Идентифицированный генофонд растений и селекция. – 2005. – С. 628-644.

12. Гончаров, Н.Д. Рекомендации по выращиванию безвирусного семенного картофеля / Н.Д. Гончаров, О.П. Пузанков, А.И. Гришанович. – М.: Колос, 1981. – С. 26-40.

13. Добровольская, Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв / Т.Г. Добровольская // М.: ИКЦ «Академкнига». – 2002. – С. 282.

14. Дубинин, С.В. Как получить высокий урожай картофеля / С.В. Дубинин // Картофель и овощи. – 2013. – №2. – С. 21-22.

15. Каменева, С.В. Генетический контроль процессов взаимодействия бактерий с растениями в ассоциациях / С.В. Каменева, Е.М. Муронец // Генетика. – 1999. – Т. 35, №. 11. – С. 1480-1494.

16. Коинокуляция микрорастений картофеля PGPR *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 для повышения эффективности микрклонального размножения картофеля / К.Ю.Каргаполова, О.В. Ткаченко, Н.В. Евсеева, Г.Л. Бурьгин // Вавиловские чтения: Сборник статей межд. науч.-практ. конф., посвященной 135-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова. – Саратов, 2022. – С. 126-129.

17. Коллекция микроорганизмов ризосферы института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Саратовский научный центр Российской академии наук (ФИЦ СЦ ИБФРМ РАН): сайт. – Саратов. – <http://collection.ibppm.ru>.

18. Лутова, Л.А. Биотехнология высших растений / Л.А. Лутова. – Санкт-Петербург: Изд-во. С.-Петерб. ун-та, 2010. – С. 228.
19. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение / Е.А. Цавлекова, С.Ю. Климова, Т.А. Чердынцев, А.И. Нетрусов // Микробиология. – 2006. – №2. – С. 133-143.
20. Пакет программ статистического и биометрико-генетического анализа в растениеводстве и селекции Agros, версия 2.10. – Тверь, 1994-2000.
21. Паламарчук, И.А. Учебное пособие по ботанической гистохимии / И.А. Паламарчук, Т.Д. Веселова. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1965. – С. 93.
22. 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. Бурьгин, Н.В. Евсеева, А.А. Широков, Л.Ю. Матора, С.Ю. Щёголев // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – Т. 26, №5. – 422-430.
23. Посыпанов, Г.С. Биологический азот и его эколого – экономическое значение в растениеводстве/ Г.С. Посыпанов, А.В. Дозоров, Т.А. Дозорова // Зерновые культуры. – 2000. – №2. – С. 26.
24. Размножение перспективных гибридов и новых сортов в системе оригинального семеноводства картофеля / Е.А. Симаков, Б.В. Анисимов, А.И. Усков [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2009. – №7 – С. 35-37.
25. Свист, В.Н. Агротехнические приемы выращивания оздоровленного семенного картофеля: автореф. дис. канд. с.х.: 06.01.05 / Свист Виталий Николаевич; М.: Изд. Москва. – Брянск, 2004. – С. 24.
26. Создание ассоциации *in vitro* картофеля с бактериями рода *Azospirillum* / Н.В. Бойкова, О.В. Ткаченко, Н.В. Евсеева [и др.] // Аграрный журнал. – 2015. – №7. – С. 3.
27. Таксономическое положение бактериального изолята T1KR02, выделенного с корней картофеля сорта кондор / Г.Л. Бурьгин, П.А. Потанина, К.Ю. Каргаполова [и др.] // Вавиловские чтения: Материалы межд. науч.-практ. конф. – Саратов, 2017. – С. 115-119.

28. Тихонович, И.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего / И.А. Тихонович, Н.А. Проворов // СПб.: изд-во СПбУ СПб. – 2009. – С. 93-94.
29. ФГБУ «Госсорткомиссия» - Государственный реестр селекционных достижений: сайт. – <https://reestr.gossortrf.ru/sorts/7805632/>.
30. ФГБУ «Госсорткомиссия» - Государственный реестр селекционных достижений: сайт. – <https://reestr.gossortrf.ru/sorts/8752990/>.
31. Федорова, Ю.Н. Выращивание исходного семенного материала картофеля с использованием модифицированных питательных сред / Ю.Н. Федорова, О.М. Малютина, Л.Н. Игнатъева // Селекция и семеноводство сельскохозяйственных культур: Сборник материалов X Всеросс. науч.–практ. конф. – Пенза, 2006. – С.121-124.
32. Частная селекция полевых культур: учебное пособие / В.В. Пыльнев, Ю.Б. Коновалов, О.А. Буко [и др.] – Москва: изд-во КолосС, 2005. – С. 430.
33. Яковлева, Г.А. Биотехнологические приемы в повышении устойчивости картофеля к болезням и вредителям / Г.А. Яковлева // Актуальные проблемы защиты картофеля: Материалы межд. науч.-практ. конф. – Минск, 2005. – С. 248.
34. A comparison between a new serological method, thin layer immunoassay (TIA), and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies in schistosomiasis / M. Ismail, C. Draper, Ö. Ouchterlony, L.-A. Nilsson, R. Terry // *Parasite Immunology*. – 1979. – Vol. 1, N. 3. – P. 251-258.
35. Advances in plantgrowth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013) / Y. Bashan, L.E. de - Bashan, S.R. Prabhu, J.-P. Hernandez // *Plant Soil*. – 2014. – N. 378. – P. 1-33.
36. Alawiye, T.T. Bacterial diversity and community structure in typical plant rhizosphere / T.T. Alawiye, O.O. Babalola // *Diversity*. – 2019. – Vol. 11, № 10 – P. 179.
37. Ali, S. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase / S. Ali, T.C. Charles, B.R. Glick // *Plant Physiol Biochem Plant Physiology and Biochemistry*. – 2014. – Vol. 80. – P. 160-167.

38. Alori, E.T. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture / E.T. Alori, B.R. Glick, O.O. Babalola // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 971.

39. Analysis of potato quality: *In vitro* versus clonal propagation / Y. Fedoruk, M. Grabovskiy, L. Pravdyva [et al.] // *Ukrainian Journal of Ecology*. – 2020. – Vol. 10, N. 1. – P. 106-113.

40. Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improve taxonomic classification of *Alphaproteobacteria* / A. Hördt, M.G López, J.P. Meier-Kolthoff, M. Schleuning, L-M. Weinhold, B.J. Tindall, S. Gronow, N.C. Kyrpides, T. Woyke, M. Göker // *Frontiers in microbiology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 468.

41. Andrews, M. Specificity in Legume-Rhizobia symbioses / M. Andrews, M.E. Andrews // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18, N. 4 – P. 705.

42. Application of tissue culture techniques in potato / T.P. Morais, S.A. Asmar, H.F.J. Silva [et al.] // *Biosci. J.* – 2018. – Vol. 34, N. 4. – P. 952-969.

43. Anjum, M.A. Effect of culture medium on direct organogenesis from different explants of various potato genotypes / M.A. Anjum, H. Ali // *Biotechnology*. – 2004. – Vol. 3. – P. 187-193.

44. Artemisinin accumulation and enhanced net photosynthetic rate in Qinghao (*Artemisia annua L.*) hardened *in vitro* in enriched-CO₂ photoautotrophic conditions / K. Supaibulwattana, W. Kuntawunginn, S. Chaum, C. Kirdmanee // *Plant Omics*. – 2011. – Vol. 4, N. 2. – P. 75-81.

45. Assessing the efficacy of coinoculation of wheat seed-lings with the associative bacteria *Paenibacillus polymyxa* 1465 and *Azospirillum brasilense* Sp245 / I.V. Yegorenkova, K.V. Tregubova, G.L. Burygin, L.Yu. Matora, V.V. Ignatov // *Can. J. Microbiol.* – 2016. – Vol. 62, N. 3. – 279-285.

46. Awan, A.R. *In vitro* elimination of potato leaf roll polerovirus from potato varieties / A.R. Awan // *European Journal of Scientific Research*. – 2007. – Vol. 18, N. 1. – P. 155-164.

47. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth

in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.) / F. Cassan, D. Perrig, V. Sgroy [et al.] // European Journal of soil biology. – 2009. – Vol. 45, N. 1. – P. 28-35.

48. Badr, A. Comprehensive analysis of *in vitro* to *ex vitro* transition of tissue cultured potato plantlets grown with or without sucrose using metabolic profiling technique / A. Badr, P. Angers, Y. Desjardins // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2015. – Vol. 122. – P. 491-508.

49. Belimov A.A., Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria / A.A. Belimov, A.P. Kozhemyakov, G.V. Chuvarliyeva // Plant Soil. – 1995. – Vol. 173. – P. 29-37.

50. Benefits associated with the interaction of endophytic bacteria and plants / M.L. Santos, D.L. Berlitz, S.L.F. Wiest [et al.] // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2018. – Vol. 61 – P. e18160431.

51. Bensalim, S. A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato / S. Bensalim, J. Nowak, S.K. Asiedu // Am. J. Potato Res. – 1998. – Vol. 75, №3. – P. 145-152.

52. Berg, G. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere / G. Berg, K. Smalla // FEMS Microbiology Ecology. – 2009. – Vol. 68, N. 1. – P. 1-13.

53. Bergey, D.H. Bergey's manual of determinative biology / D.H. Bergey, J. G.H. // Chapter. – 1994. – Vol. 4. – P. 181-186.

54. Bhattacharyya, P.N. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture / P.N. Bhattacharyya, D.K. Jha // World J Microbiol Biotechnol. – 2012. – Vol. 28. – P. 1327–1350.

55. Bhuiyan, F.R. *In Vitro* Meristem Culture and Regeneration of Three Potato Varieties of Bangladesh / Bhuiyan F.R. // Research in Biotechnology. – 2013. – Vol. 4, N. 3. – P. 29-37.

56. Bio-preparates support the productivity of potato plants grown under desert farming conditions of north Sinai: five years of field trials / T. A. Mohammed, A. H. Mervat, H. Y. Hanan [et al.] // Journal of Advanced Research. – 2014. – Vol. 5, N. 1. – P. 41-48.

57. Bioprospecting in potato fields in the central andean highlands: screening of rhizobacteria for plant growth-promoting properties / J. Ghyselinck, S.L. Velivelli, K. Heylen [et al.] // Syst. Appl. Microbiol. – 2013. – Vol. 36, N. 2. – P. 116-127.
58. Bloemberg, G.V. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria / G.V. Bloemberg, B.J.J. Lugtenberg // Cur. Opin. Plant Biol. – 2001. – Vol. 4, N. 4. – P. 343-350.
59. Brown, P. Biostimulants in agriculture / P. Brown, S. Saa // Frontiers in Plant Science. – 2015. – Vol. 6 – P. 671.
60. Chang, W-T. Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes / W-T. Chang, Y-C. Chen, C-L. Jao // Bioresour Technol. – 2007. – Vol. 98, N. 6. – P. 1224–1230.
61. Chaparro, J.M. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development / J.M. Chaparro, D.V. Badri, J.M. Vivanco // The ISME journal. – 2014. – Vol. 8. – P. 790-803.
62. Chou, J.C. The gene for indole-3-acetyl-L-aspartic acid hydrolase from *Enterobacter agglomerans*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli*/ J.C. Chou, W.W. Mulbry, J.D. Cohen // Molecular and General Genetics MGG. – 1998. – Vol. 259, N. 2. – P. 172-178.
63. Cocking, E.C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria / E.C. Cocking. // Plant and Soil. – 2003. – Vol. 252. – P. 169-175.
64. Collagen-like proteins (ClpA, ClpB, ClpC, and ClpD) are required for biofilm formation and adhesion to plant roots by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 / X. Zhao, Y. Wang, Q. Shang, Y. Li [et al.] // PloS one. – 2015. – Vol. 10, N. 2. – P. e0117414.
65. Compant, S. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects / S. Compant, B. Duffy, J. Nowak // Appl. and Environ. Microbiol. – 2005. – Vol.71, N. 9. – P. 4951-4959.
66. Comparison of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) diversity and dynamics during growth of cilembu sweet potato (*Ipomoea batatas* L var. Rancing) in Cilembu and Jatinangor Site, Indonesia / R.A. Nasution, A.M. Tangapo, I. Taufik, P.

Aditiawati // Journal of pure and applied microbiology. – 2017. – Vol. 11, N. 2. – P. 837-845.

67. Competitiveness of Early potato production in two-crop culture / A. Levshin, O. Ivashova, I. Gasparyan [et al.] // Proceedings of the International Conference on Policies and Economics Measures for Agricultural Development (AgroDevEco 2020). – Voronezh, 2020. – Vol. 147. – P. 208.

68. Core features of the hormonal status in grown potato plants / O.O. Kolachevskaya, L.I. Sergeeva, I.A. Getman [et al.] // Plant Signaling and Behavior. – Vol. 13, N. 5 – P. e1467697.

69. Deciphering the Symbiotic Plant Microbiome: Translating the Most Recent Discoveries on Rhizobia for the Improvement of Agricultural Practices in Metal-Contaminated and High Saline Lands / A. Bellabarba, C. Fagorzi, G.C. DiCenzo [et al.] // Agronomy. – 2019. – Vol. 9, N. 9. – P. 529.

70. Dedysh, S.N. Acidophilic methanotrophic communities from sphagnum peat bogs / S.N. Dedysh, N.S. Panikov, J.M. Tiedje // Appl. Environ. Microb. – 1998. – Vol. 64, N. 3. – P. 922-929.

71. Delfin, E.F. Biomass partitioning, yield, nitrogen and phosphorus uptake of PGPR inoculated tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) under field condition / E.F. Delfin, F.M. Rodriguez, E.S. Paterno // Philippine Journal of Crop Science (PJCS). – 2015. – Vol. 40, N. 2. – P. 59-65.

72. Determining Effective Methods of Obtaining Virus-Free Potato for Cultivation in Kazakhstan / D. Daurov, A. Daurova, A. Karimov [et al.] // American Journal of Potato Research. – 2020. – Vol. 97. – P. 367-375.

73. Differential response of potato toward inoculation with taxonomically diverse plant growth promoting rhizobacteria / T. Naqqash, S. Hameed, A. Imran [et al.] // Front. Plant Sci. – 2016. – Vol. 7. – P. 144.

74. Döbereiner J., Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites / J. Döbereiner, J.M. Day // Proceedings of the 1st international symposium on nitrogen fixation. – Pullman. – Washington State, 1976. – Vol. 2. – P. 518-538.

75. Efficiency of regenerating potato varieties by the apical meristem method / R.R. Galeev, S.K. Vyshegurov, V.S. Demshina [et al.] // Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2018. – Vol.10, N. 1. – P. 124-128.
76. Efficient Protocol for Mini-tuber Production in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivar *Kufri Frysona* / P.P. Mohapatra, M. Poonia, V.K. Batra, S. Kajla // Vegetos, An International Journal of Plant Research & Biotechnology. – 2018. – Vol. 31, N. 2. – P. 114-12.
77. Effects of growth regulators, media and explant types on microtuberization of potato / A. K. Yagiz, C. Yavuz, C. Tarim [et al.] // American Journal of Potato Research. – 2020. – Vol. 97, N. 5. – P. 523-530.
78. Effects of high temperature on *in vitro* tuberization and accumulation of stress-responsive proteins in potato / D. Pantelic, I.C. Dragicevic, J. Rudic [et al.] // Horticulture, Environment, and Biotechnology. – 2018. – Vol. 59, N. 3. – P. 315-324.
79. Effect of sunlight and artificial light on micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets / S. Rehana, F. Ahmed, N. Zeba [et al.] // Archives of Agriculture and Environmental Science. – 2018. – Vol. 3, N. 2. – P. 151-156.
80. Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on *in vitro* Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Growth Parameters and Biological Control Mechanisms / B. Laid, K. Kamel, G. Mouloud [et al.] // Advances in Microbiology. – 2016. – Vol. 6. – P. 677-690.
81. Ekin, Z. Integrated use of humic acid and plant growth promoting rhizobacteria to ensure higher potato productivity in sustainable agriculture / Z. Ekin // Sustainability. – 2019. – Vol. 11, N. 12. – P. 3417.
82. Emami, D. Application of electrotherapy for the elimination of potato potyvirus / D. Emami, J. Meybodi, N. Mozafari // Journal of Agricultural Science and Technology. – 2011. – Vol. 13, N. 6. – P. 921-927.
83. Emami, S. Effect of rhizospheric and endophytic bacteria with multiple plant growth promoting traits on wheat growth / S. Emami, H.A. Alikhani, A.A. Pourbabaei // Environ Sci Pollut Res. – 2019. – Vol. 26. – P. 19804-19813.

84. EMBL-EBI – the European Bioinformatics Institute: сайт. – <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>.
85. EzBioCloud - публичный портал данных и аналитики ChunLab: сайт. – <http://www.ezbiocloud.net/taxonomy>.
86. Endophytic bacteria and their potential application in agriculture / M. Naveed, N. A. Lathif, R. Mona, N. Muhamad // Indian Journal of Agricultural Research. – 2019. – Vol. 53, N. 1. – P. 1-7.
87. Endophytic bacteria in microbial preparations that improve plant development / V.K. Chebotar, N.V. Malfanova, A.V. Shcherbakov [et al.] // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2015. – Vol. 51. – P. 271-277.
88. Endophytic colonization of potato (*Solanum tuberosum* L.) by a novel competent bacterial endophyte, *Pseudomonas putida* strain P9, and its effect on associated bacterial communities / F.D. Andreote, W.L. De Araújo, J.L. De Azevedo [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 75, N. 11. – P. 3396-3406.
89. Espinosa-Leal, C.A. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds / C.A. Espinosa-Leal, C.A. Puente-Garza, S. García-Lara // Planta. – 2018. – Vol. 248. – P. 1-18.
90. Evaluation of native plant growth-promoting rhizobacteria in *Handroanthus impetiginosus* micropropagation / M.E. Yarte, M.P. Santos, M.I. Gismondi [et al.] // Trees. – 2022. – P. 1-12.
91. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*) / Lavakush, J. Yadav, J. P. Verma [et al.] // Ecological Engineering. – 2014. – Vol. 62. – P. 123-128.
92. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance / H. Naseem, M. Ahsan, M.A. Shahid, N. Khan // Journal of basic Microbiology. – 2018. – Vol. 58, N. 12. – P. 1009-1022.
93. Gamalero, E. Bacterial modulation of plant ethylene levels / E. Gamalero, B.R. Glick // Plant Physiol. – 2015. – Vol.169, N. 1. – P. 13-22.
94. GenBank: сайт. – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

95. Getting the hologenome concept right: An eco—Evolutionary framework for hosts and their microbiomes / K.R. Theis, N.M. Dheilly, J.L. Klassen [et al.] // *Msystems*. – 2016. – Vol. 1, N. 2. – P. e00028-16.
96. Glick, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria / Glick B.R. // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1995. – Vol. 41, N. 2. – P. 109–117.
97. Gray, E.J. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes / E.J. Gray, D.L. Smith // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2005. – Vol. 37, N. 3. – P. 395-412.
98. Grosbeak, A. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth / A. Grosbeak, A. Napora, M. Kacprzak // *Ecol Eng*. – 2015. – Vol. 84. – P. 22–28.
99. Growth and yield of potato (*Solanum tuberosum* L.) as influenced by dates of planting and genotypes / K.S. Athira, K.U. Kumari, M.P. Rao [et al.] // *The Pharma Innovation Journal*. – 2021. – Vol. 10, N. 7. – P. 1409-1412.
100. Haas, D. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease / D. Haas, C. Keel // *Annu Rev Phytopathol*. – 2003. – Vol. 41. – P. 117-153.
101. Haque, M.S. Detection of viruses of Bangladeshi and Japanese garlic and their elimination through root meristem culture / M.S. Haque, K. Hattori // *Progressive Agriculture*. – 2017. - Vol 28, N. 2. – P. 55-63.
102. Hernandez-Soberano, C. Endophytic bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 and *Bacillus methylotrophicus* M4-96 stimulate achene germination, *in vitro* growth, and greenhouse yield of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) / C. Hernandez-Soberano, L.F. Ruiz-Herrera, E. Valencia-Cantero // *Scientia Horticulturae*. –2020. – Vol. 261. – P. 109005.
103. Historical Perspective and Basic Principles of Plant Tissue Culture / A. Shahzad, S. Sharma, S. Parveen [et al.] // *Plant biotechnology: principles and applications*. – 2017. – P. 1-36.

104. Igiehon, N.O. Below-ground-above-ground Plant-microbial Interactions: Focusing on Soybean, *Rhizobacteria* and *Mycorrhizal Fungi* / N.O. Igiehon, O.O. Babalola // *The Open Microbiology Journal*. – 2018. – Vol. 12, N. 1. – P. 261-279.

105. Improvement of growth, yield, and pigmentation of mung bean plants using *Ochrobactrum intermedium* CP-2 as bioinoculant / A. Saini, L. Nain, V. Garg, J. Saxena // *Clean-Soil, Air, Water*. – 2017. – Vol. 45, N. 6. – P. 1500670.

106. Improved potato microclonal reproduction with the plant growth-promoting rhizobacteria *Azospirillum* / O.V. Tkachenko, N.V. Evseeva, N.V. Boikova [et al.] // *Agronomy for Sustainable Development*. – 2015. – V. 35. – P. 1167-1174.

107. Improved Production of high-quality potato seeds in aeroponics with plant-growth-promoting rhizobacteria / O.V. Tkachenko, N.V. Evseeva, E.V. Terentyeva [et al.] // *Potato Research*. – 2021. – Vol. 64, N. 1. – P. 55-66.

108. Influence of associative bacterial strains on the structure of the microbiocenosis of the rhizosphere of *Triticum aestivum* L / T.N. Melnichuk, A.Yu. Egovtseva, S.F. Abdurashytov [et al.] // *E3S Web of Conferences 224, Topical Problems of Agriculture, Civil and Environmental Engineering (TPACEE 2020) – Moscow, 2020*. – Vol. 224. – P. 12.

109. Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species / O.S. Kim, Y.J. Cho, K. Lee [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Micr.* – 2012 – Vol. 62, N. 3. – P. 716.

110. *In vitro* micropropagation and ex vitro rooting of some potato varieties / D.A. Durnikin, N.A. Kolpakov, K.Y. Guseva, A.V. Matsyura // *Ukrainian Journal of Ecology*. – 2019. – Vol. 9, N. 4. – P. 679-689.

111. *In vitro* propagation and disease testing as a means of producing healthy planting materials to support root and tuber crops production in South Africa / S.M. Laurie, P.N. Myeza, M.J. Mulabisana [et al.] // *XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): International Symposium on Micropropagation and In Vitro Techniques*. – 2014. – P. 225-232.

112. *In vitro* regeneration of potato (*Kufri Pukhraj*) / K.R. Pawar, S.G. Wagh, A.A. Daspute, G.B. Avhad // Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. – 2019. – Vol. 8, N. 5. – P. 515-518.

113. Isolation and characterization of a β -propeller gene containing phosphobacterium *Bacillus subtilis* strain KPS-11 for growth promotion of potato (*Solanum tuberosum* L.) / M.K. Hanif, S. Hameed, A. Imran [et al.] // Front. Microbiol. – 2015. – Vol.6. – P.583.

114. Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7 / Y.V. Kryuchkova, G.L. Burygin, N.E. Gogoleva, Y.V. [et al.] //Microbiological research. – 2014. – Vol. 169, N. 1. – P. 99-105.

115. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion / A. Majeed, M.K. Abbasi, S. Hameed [et al.] //Frontiers in microbiology. – 2015. – Vol. 6. – P. 198.

116. Isolation and identification by 16s rRNA sequence analysis of *Achromobacter*, *Azospirillum* and *Rhodococcus* strains from the rhizosphere of maize and screening for the beneficial effect on plant growth / M.M. Qaisrani, M.S. Mirza, A. Zaheer, K.A Malik //Pakistan Journal of Agricultural Sciences. – 2014. – Vol. 51, N. 1. – P. 91-99.

117. Isolation and identification by 16S rRNA sequence analysis of plant growth-promoting azospirilla from the rhizosphere of wheat / K. Ayyaz, A. Zaheer, G. Rasul, M.S Mirzam //brazilian journal of microbiology. – 2016. – V. 47. – P. 542-550.

118. Isolation and physiological characterization of PGPR from potato plant rhizosphere in medium land of Buru Island / H. Kesaulya, Baharuddin, Zakaria B., S.A. Syaifull // Procedia Food Science. – 2015. – Vol. 3. – P. 190-199.

119. Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*) / V. Kumar, P. Singh, M.A. Jorquera, P. Sangwan // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2013. – Vol. 29. – P. 1361-1369.

120. Kane, M.E. Micropropagation of potato by node culture and microtuber production / M.E. Kane // Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. – 2018. – P. 103-110.

121. Karagöz, F.P. Assessment of the effects of some bacterial isolates and hormones on corm formation and some plant properties in saffron (*Crocus sativus* L.) / F.P. Karagöz, A. Dursun, R. Kotan // Journal of Agricultural Sciences. – 2016. – Vol. 22. – P. 500-5011.

122. Kavino, M. *In vitro* bacterization of banana (*Musa* spp.) with native endophytic and rhizospheric bacterial isolates: Novel ways to combat *Fusarium* wilt / M. Kavino, S.K. Manoranjitham // Eur J Plant Pathol. – 2018. – Vol. 151. – P. 371-387.

123. Khammas, K.M. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil / K.M. Khammas, E. Ageron, P.A.D. Grimont // Research in Microbiology. – 1989. – Vol. 140, N. 9. – P. 679-693.

124. Khan, A.A.H. Plant-bacterial association and their role as growth promoters and biocontrol agents. In: Sayyed R. (eds) / A.A.H. Khan // Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management, Microorganisms for Sustainability. – 2019. – Vol. 13. – P. 389-419.

125. Kivi, M.P. Nitrogen and phosphorus use efficiency of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) / M.P. Kivi, S. Hokmalipour, M.H. Darbandi // International journal of Advanced Biological and Biomedical Research. – 2014. – Vol. 2. – P. 1038-1050.

126. Koleva, G.L. Micropropagation of Potato *Solanum tuberosum* L / G.L. Koleva, S. Mitrev, F. Trajkova, M. Ilievski // Electronic Journal of Biology. – 2012. – Vol. 8, N. 3. – P. 45-49.

127. Kolodziejczyk, M. Effectiveness of nitrogen fertilization and application of microbial preparations in potato cultivation / M. Kolodziejczyk // Turk J Agric For. – 2014. – Vol. 38, N. 3. – P. 299-310.

128. Kumar, R. Sustaining Productivity Through Integrated Use of Microbes in Agriculture / R. Kumar, G. Seneviratne, J.S. Zavahir // Role of Microbial Communities

for Sustainability, Microorganisms for Sustainability, Springer, Singapore, 2021. – Vol. 29. – P. 109-145.

129. Lalign server: сайт. – http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html.

130. Larkin, R.P. Impacts of biocontrol products on *Rhizoctonia* disease of potato and soil microbial communities, and their persistence in soil / R.P. Larkin // Crop Protection. – 2016. – Vol. 90. – P. 96-105.

131. Lindström, K. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia / K. Lindström, S.A. Mousavi // Microbial Biotechnology. – 2019. – Vol. 13, N. 5. – P. 1314-1335.

132. Ludwig-Müller, J. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants / J. Ludwig-Müller // Journal of experimental botany. – 2011. – Vol. 62, N. 6. – P. 1757-1773.

133. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process / Y. Pii, T. Mimmo, N. Tomasi [et al.] // Biology and Fertility of Soils. – 2015. – Vol. 51, N. 4. – P. 403-415.

134. Mohammadi, K. Bacterial biofertilizers for sustainable crop production: a review / K. Mohammadi, S. Yousef // ARPN J Agric Biol Sci. – 2012. – Vol. 7, N. 5. – P. 307-316.

135. Mohapatra, P.P. Tissue Culture of Potato (*Solanum tuberosum* L.): A Review. / P.P. Mohapatra, V.K. Batra // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2017. – Vol. 6, N. 4. – P. 489-495.

136. Molecular Evolutionary Genetics Analysis: сайт. – <http://www.megasoftware.net/mega.php>.

137. Monosaccharide constituents of potato root exudate influence hatching of the white potato cyst nematode / C.A. Bell, W. Mobayed, C.J. Lilley, P. Urwin // The American Phytopathological Society (APS) Publication. – 2021. – P. 1-26.

138. Morphological and Metabolite Responses of Potatoes under Various Phosphorus Levels and Their Amelioration by Plant Growth-Promoting *Rhizobacteria* / L. Chea, B. Pfeiffer, D. Schneider [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22, N. 10 – P. 5162.

139. Morozov, V.V. Factors of increasing the productivity of potatoes *in vitro* / V.V. Morozov, Y.N. Fedorova, M.B. Telpuk, L.N. Fedorova // International Conference on Smart Solutions for Agriculture (Agro-SMART 2018), Advances in Engineering Research. – Tyumen, 2018. – Vol. 151. – P. 712-716.

140. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / Murashige T., Skog G. // *Physiolplantarum*, 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.

141. Narayani, M. Elicitation: a stimulation of stress *in vitro* plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production / M. Narayani, S. Srivastava // *Phytochemistry Reviews*. – 2017. – Vol. 16, N. 6. – P. 1227-1252.

142. Naseem, H. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize / H. Naseem, A. Bano // *Journal of Plant Interactions*. – 2014. – Vol. 9. – P. 689-701.

143. *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 promotes growth of potato microplants and is resistant to abiotic stress / Burygin, G.L., Kargapolova, K.Y., Kryuchkova, Y.V. [et al.] // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2019. – Vol. 35. – P. 1-12.

144. *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain / J.L. Zurdo-Pineiro, R. Rivas, M.E. Trujillo [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2007. – Vol. 57, N. 4. – P. 784-788.

145. *Ochrobactrum* sp. Pv2Z2 exhibits multiple traits of plant growth promotion, biodegradation and N-acyl-homoserine-lac-tone quorum sensing / A. Imran, M.J.A. Saadalla, S.U. Khan [et al.] // *Annals of Microbiology*. – 2014. – Vol.64, N. 4. – P.1797-1806.

146. Olanrewaju, O.S. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria / O.S. Olanrewaju, B.R. Glick, O.O. Babalola // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2017. – Vol. 33. – P. 1-16.

147. Orlikowska, T. Bacteria in the plant tissue culture environment / T. Orlikowska, K. Nowak, B. Reed // *Plant Cell Tiss Organ Cult*. – 2017. – Vol. 128, N. 3. – P. 487-508.

148. Optimization of light conditions for growing well-improved potatoes in the laboratory / M. Romanova, E. Khaksar, O. Novikov, N. Leonova // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing. – Rostov-on-Don, 2019. – Vol. 403, N. 1 – P. 012025.

149. Osipov, V. Efficiency of potato production: analysis of variation and differentiation of regions of the Russian Federation / V. Osipov, S. Zhevora, N. Yanushkina // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. – 2019. – Vol. 274, N. 1. – P. 012060.

150. Palsaha, S. Induction of mutation in *Azotobacter chroococcum* MAL-201 for improvement of P (3HB) production / S. Palsaha, A.K. Paul // Roumanian Archives of Microbiology and Immunology. – 2003. – Vol. 62, N. 3-4. – P. 203-215.

151. Perez-Montano, F. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production / F. Perez-Montano, C. Alias-Villegas, R.A. Bellogin // Microbiological Research. – 2014. – Vol. 169, N. 5-6. – P. 325-336.

152. Phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition / M. Satyaprakash, T. Nikitha, E.U.B. Reddi [et al.] // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2017. – Vol. 6, N. 4. – P. 2133-2144.

153. Phylogeny.fr: Mr. Bayers: сайт. – http://www.phylogeny.fr/one_task.cgi?task_type=mrbayes.

154. Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops / S. Habibi, S. Djedidi, K. Prongjunthuek, M.F. Mortuza // Plant and Soil. – 2014. – Vol. 379. – P. 51–66.

155. Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants / I. Afzal, Z.K. Shinwari, S. Sikandar, S. Shahzad // Microbiological Research. – 2009. – V. 221. – P. 36-49.

156. Plant-growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides / M.R. Banerjee, L. Yesmin, J.K. Vessey, M. Rai // Handbook of microbial biofertilizers. Food Products Press. – 2006. – P. 137-181.

157. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) as biofertilizers and biopesticides / U. Riaz, G. Murtaza, W. Anum [et al.] //Microbiota and biofertilizers: a sustainable continuum for plant and soil health. – 2021. – P. 181-196.

158. Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Plant Health: A Perspective Study of the Underground Interaction / M.A. Bhat, A.K. Mishra, S. Jan [et al.] //Plants. – 2023. –Vol. 12, N. 3. – P. 629.

159. Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) with Biofilm-Forming Ability: A Multifaceted Agent for Sustainable Agriculture / N. Ajijah, A. Fiodor, A.K. Pandey [et al.] // Diversity. – 2023. – Vol. 15, N. 1. – P. 112.

160. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects / A. Basu, P. Prasad, S.N. Das [et al.] // Sustainability. – 2021. – Vol. 13, N. 3. – P. 1140.

161. Plant growth promoting bacteria: biodiversity and multifunctional attributes for sustainable agriculture / A.N. Yadav, P. Verma, B. Singh [et al.] // Adv Biotech & Micro. – 2017. – Vol. 5, N. 5. – P. 6-10.

162. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture / G. Gupta, S.S. Parihar, N.K. Ahirwar [et al.] // J Microb Biochem Technol. – 2015. – Vol. 7. – P. 001-006.

163. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Modern Prospects for a Sustainable Agriculture / B. Kumari, M.A. Mallick, M.K. Solanki [et al.] // In: R. Ansari, I. Mahmood (eds) Plant Health Under Biotic Stress. Springer, Singapore. –2019 – Vol. 2. – P.109-127.

164. Potato biology and biotechnology: advances and perspectives / D. Vreugdenhil, J. Bradshaw, C. Gebhardt, F. Govers [et al.] // Elsevier. – 2007. – P. 669.

165. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. In: New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research / B.R. Glick, Z. Cheng, J. Czarny, J. Duan // New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research. – 2007. – P. 329–339.

166. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review / D. Goswami, J.N. Thakker, P.C. Dhandhukia, M.M. Tejada // *Cogent Food Agric.* – 2016. – Vol. 2. – P. 1127500.

167. Production of potato (*Solanum tuberosum L.*) seed tuber under artificial LED light irradiation in plant factory / M.H. Rahman, M.O.K. Azad, M.J. Islam [et al.] // *Plants* 2021. – 2021. – Vol. 10, N. 2. – P. 297.

168. Pruesse, E. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes / E. Pruesse, J. Peplies, F.O. Glöckner // *Bioinformatics.* – 2012. – Vol. 28, N. 14. – P. 1823-1829.

169. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens / O. Couillerot, C. Prigent-Combaret, J. Caballero-Mellado, Y. Moënnelocoz // *Lett Appl Microbiol.* – 2009. – Vol. 48, N. 5. – P. 505–512.

170. Raaijmakers, J.M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria / J.M. Raaijmakers, M. Mazzola // *Annu Rev Phytopathol.* – 2012. – Vol. 50. – P. 403-424.

171. Rapid multiplication techniques (RMTs): A tool for the production of quality seed potato (*Solanum tuberosum L.*) in Ethiopia / A. Chindi, G.W. Giorgis, A. Solomon, L. Tessama // *Asian J. Crop.* – 2014. – Vol.6, N. 3. – P. 176-185.

172. Reetha, S. Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allium cepa L.*) / S. Reetha, G. Bhuvaneswari, P. Thamizhiniyan // *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* – 2014. – Vol. 3, N. 2. – P. 568-574.

173. Regulation of antioxidant production, ion uptake and productivity in potato (*Solanum tuberosum L.*) plant inoculated with growth promoting salt tolerant *Bacillus* strains / M. Tahir, I. Ahmad, M. Shahid [et al.] // *Ecotoxicology and environmental safety.* – 2019. – Vol. 178. – P. 33-42.

174. Response of sweet potato to application of PGPR and N fertilizer / F. Yasmin, R. Othman, H. Vijayan, M.H.M. Nazmul // *Annals of the Romanian Society for Cell Biology.* – 2021. – P. 10799-10812.

175. Richardson, A.E. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture / A.E. Richardson // *Plant and Soil*. – 2011. – Vol. 349. – P. 121–156.

176. Romano S, Aujoulat F, Jumas-Bilak E, Masnou A, Jeannot JL, Falsen E, Marchandin H, Teyssier C (2009) Multilocus sequence typing supports the hypothesis that *Ochrobactrum anthropi* displays a human-associated subpopulation. *BMC Microbiol.* – Vol. 9, N. 1. – P. 267.

177. Root-associated bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase improve growth and nutrient uptake by pea genotypes cultivated in cadmium supplemented soil / V.I. Safronova, V.V. Stepanok, G.L. Engqvist [et al.] // *Biology and Fertility of Soils*. – 2006. – Vol. 42, N. 3. – P. 267-272.

178. Root colonization and growth promotion of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by phosphate solubilizing *Enterobacter* sp. Fs-11 / M. Shahid, S. Hameed, A. Imran [et al.] // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2012. – Vol. 28, N. 8. – P. 2749-2758.

179. Saharan, B.S. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review / B.S. Saharan, V. Nehra // *Life Sci Med Res*. – 2011. – Vol. 21. – N. – P. 30.

180. Salem, J. *In vitro* propagation, microtuberization, and molecular characterization of three potato cultivars / J. Salem, A.M. Hassanein // *Biol Plant*. – 2017. – Vol. 61. – P. 427-437.

181. Sathish, S.S. *In vitro* propagation of *Aristolochia bracteata* Retz. - a medicinally important plant / S.S. Sathish, N. Janakiraman, M. Johnson // *Research in Biotechnology*. – 2011. – Vol. 2, N. 6. – P. 44-52.

182. Screening of PGPR Isolates for Plant Growth Promotion of *Rosa damascena* / U. Tariq, A. Riaz, M.J. Jaskani, A. Zahir // *International Journal of Agriculture and Biology*. – 2016. – Vol. 18, N. 5. – P. 2005-2009.

183. Secondary metabolite genes encoded by potato rhizosphere microbiomes in the Andean highlands are diverse and vary with sampling site and vegetation stage / G. Aleti, B. Nikolic, G. Brader [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – P. 2330.

184. Shoot proliferation from potato (*Solanum tuberosum* cv. Agria) under different concentration of MS include vitamins and BAP medium / S. Kazemiani, A.R. Motallebi-Azar, J. Panahandeh [et al.] // Progress in Nutrition. – 2018. – Vol. 20, N. 1. – P. 160-166.

185. Singh, J.S. Plant Growth Promoting Rhizobacteria / J.S. Singh // Resonance. – 2013. – Vol. 18, N. 3. – P. 275-281.

186. Sivasakthi, S. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review / S. Sivasakthi, G. Usharani, P. Saranraj // African Journal of Agricultural. – 2014. – Vol. 9, N. 16. – P. 1265-1277.

187. Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape / T.M. Bowles, V. Acosta-Martínez, F. Calderón, L.E. Jackson // Soil Biology and Biochemistry. – 2014. – Vol. 68. – P. 252-262.

188. Study of the effect of associative rhizobacterial strains on the formation of spring durum wheat productivity / A.A. Belyaeva, O.V. Tkachenko, G.L. Burygin, A.G. Sundetova // II International Scientific Conference “Plants. – Saratov, 2020 – Vol. 23. – P. 03012.

189. Struik, P.C. Responses of the potato plant to temperature / P.C. Struik // Elsevier Science BV. – 2007. – P. 367-393.

190. Sturz, A.V. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops / A.V. Sturz, J. Nowak // Applied soil ecology. – 2000. – Vol. 15, N. 2. – P. 183-190.

191. Symbiotic efficiency and genotypic characterization of variants of *Bradyrhizobium* spp. in commercial inoculants for soybeans / L.P. Barbosa, P.F. Costa, P.R.A. Ribeiro [et al.] // Rev Bras Cienc. – 2017. – P. 41.

192. Tabatabaei, S. Indole-3-acetic acid (IAA) producing *Pseudomonas* isolates inhibit seed germination and α -amylase activity in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) / S. Tabatabaei, P. Ehsanzadeh, H. Etesami // Spanish Journal of Agricultural Research. – 2016. – Vol. 14, N. 1. – P. 0802.

193. The growth and the production of potato plant supplemented by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) / S. Purwantisari, S. Parman, Karnoto, K. Budihardjo // Journal of Physics: Conference Series. – Central Java, 2019. – Vol. 1217, N. 1. – P. 012144.

194. The SILVA rRNA database project: сайт. – Германия. – <https://www.arb-silva.de/>.

195. The SILVA rRNA database project: сайт. – Германия. – <https://www.arb-silva.de/aligner>.

196. Tilman, D. Agricultural sustainability and intensive production practices / D. Tilman, K. Cassman, P. Matson // Nature. – 2002. – Vol. 418. – P. 671-677.

197. Trivedi, P. Carrier-based preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions / P. Trivedi, A. Pandey, L.M.S. Palni. // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2005. – Vol. 21, N. 6. – P. 941-945.

198. Tsukanova, K.A. Effect of plant growth-promoting Rhizobacteria on plant hormone homeostasis / K.A. Tsukanova, V.K. Chebotar, J.J.M. Meyer // South African journal of botany. – 2017. – Vol. 113. – P. 91-102.

199. Use of *Azospirillum brasilense* Sp245 to Increase the Efficacy of Clonal Micropropagation of Cretaceous Catchfly (*Silene cretacea* Fisch. ex Spreng.) / T.A. Kritskaya, N.V. Evseeva, G.L. Burygin [et al.] // Biotechnology in Russia. – 2017. – Vol. 33. – P. 72-79.

200. Use of two PGPR strains in the integrated management of blast disease in rice (*Oryza sativa*) in Southern Spain / J.A. Lucas, B.R. Solano, F. Montes, [et al.] // Field Crops Research. – 2009. – Vol. 114, N. 3. – P. 404-410.

201. U.S. National Library of Medicine: сайт. – США. – https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=TargetLociBlast.

202. Vessey, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers / J.K. Vessey // Plant and soil. – 2003. – Vol. 255, N. 2. – P. 571-586.

203. Wheat root colonization by *Azospirillum brasilense* strains with different motility / A.V. Shelud'ko, A.A. Shirokov, M.K. Sokolova [et al.] // *Microbiology*. – 2010. – Vol. 79, N. 5. – P. 688–695.

204. Wheatley, R.M. Mechanisms of bacterial attachment to roots / R.M. Wheatley, P.S. Poole // *FEMS microbiology reviews*. – 2018. – Vol. 42, N. 4. – P. 448–461.

205. Xhulaj, D. *In vitro* micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L) cultivars / D. Xhulaj, B. Gixhari // *Poljoprivreda i Sumarstvo*. – 2018. – Vol. 64, N. 4. – P. 105.

206. Yarte, M.E. Native putatively endophytic bacteria from *Handroanthus impetiginosus* improve its *in vitro* rooting / M.E. Yarte, B.E. Llorente, E.E. Larraburu // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. – 2022. – Vol. 151, N. 2. – P. 265–274.

207. Zakharova E.A., Effect of water-soluble vitamins on the production of indole-3-acetic acid by *Azospirillum brasilense* / E.A. Zakharova, A.D. Iosipenko, V.V. Ignatov // *Microbiol Res*. – 2000. – Vol. 155 – P. 209–214.

208. Zelicourt, A. Rhizosphere Microbes as Essential Partners for Plant Stress Tolerance / A. Zelicourt, M. Al-Yousif, H. Hirt // *Molecular plant*. – 2013. – Vol. 6, N. 2. – P. 242–245.

209. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation / D. Barnawal, N. Bharti, D. Maji [et al.] // *Plant Physiol Biochem*. – 2012. – Vol. 58. – P. 227–235.

ПРИЛОЖЕНИЯ



Russian Collection of Agricultural Microorganisms

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»
(ФГБНУ ВНИИСХМ)

196608 Санкт-Петербург, Пушкин,
 шоссе Подбельского, 3
 Телефон 8-812-470-51-00

Выдано в ФГБОУ ВО Саратовский
 ГАУ

Факс 470-43-62
 № 309/08

СПРАВКА

**о депонировании культуры микроорганизмов в Ведомственной коллекции
 полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения
 (RCAM)**

1.Депозиторы: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН), 410049, г. Саратов, проспект Энтузиастов, д. 13; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова (ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ), 410000, г. Саратов, ул. Соколова, д. 335.

2.Авторы: Бурьгин Г.Л., Каргаполова К.Ю., Ткаченко О.В.

3.Штамм *Ensifer adhaerens* T1Ks14 обладает рост-стимулирующей активностью по отношению к проросткам пшеницы и микроклонам картофеля в культуре *in vitro*, увеличивая количество и длину корней. Продуцирует фитогормон индолилуксусную кислоту (ИУК) на среде с триптофаном. Депонирован как практически-ценный.

4. Штамм *Ensifer adhaerens* T1Ks14 депонирован 10 июля 2017 г. под регистрационным номером **RCAM04487**.

5.Адрес коллекции: 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3, ФГБНУ ВНИИСХМ; тел. (812)470-51-00, факс(812)470-43-62, e-mail: v.safronova@rambler.ru, сайт: <http://www.arriam.ru>

Вр.и.о. директора ФГБНУ ВНИИСХМ



Н.А. Проворов

Заведующая RCAM, к.б.н.

В.И.Сафронова



Russian Collection of Agricultural Microorganisms

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»
(ФГБНУ ВНИИСХМ)

196608 Санкт-Петербург, Пушкин,
 шоссе Подбельского, 3
 Телефон 8-812-470-51-00

Выдано в ФГБОУ ВО Саратовский
 ГАУ

Факс 470-43-62

29.08.2017 № 310/28

СПРАВКА

о депонировании культуры микроорганизмов в Ведомственной коллекции
полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения
(RCAM)

1.Депозиторы: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН), 410049, г. Саратов, проспект Энтузиастов, д. 13; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова (ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ), 410000, г. Саратов, ул. Соколова, д. 335.

2.Авторы: Бурьгин Г.Л., Каргаполова К.Ю., Ткаченко О.В.

3.Штамм *Kocuria rosea* T1Ks19 обладает рост-стимулирующей активностью по отношению к микроклонам картофеля в культуре *in vitro*, увеличивая длину побега. Продуцирует фитогормон индолилуксусную кислоту (ИУК) на среде с триптофаном. Депонирован как практически-ценный.

4. Штамм *Kocuria rosea* T1Ks19 депонирован 10 июля 2017 г. под регистрационным номером **RCAM04488**.

5.Адрес коллекции: 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3, ФГБНУ ВНИИСХМ; тел. (812)470-51-00, факс(812)470-43-62, e-mail: v.safronova@rambler.ru, сайт: <http://www.arriam.ru>

Вр.и.о. директора ФГБНУ ВНИИСХМ

Н.А. Проворов

Н.А. Проворов

Заведующая RCAM, к.б.н.



В.И.Сафронова



Russian Collection of Agricultural Microorganisms

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»
(ФГБНУ ВНИИСХМ)

196608 Санкт-Петербург, Пушкин,
 шоссе Подбельского, 3
 Телефон 8-812-470-51-00
 Факс 470-43-62

Выдано в ФГБОУ ВО Саратовский
 ГАУ

29.08.2017 № 308/08

СПРАВКА

о депонировании культуры микроорганизмов в Ведомственной коллекции
полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения
(RCAM)

1.Депозиторы: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН), 410049, г. Саратов, проспект Энтузиастов, д. 13; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова (ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ), 410000, г. Саратов, ул. Соколова, д. 335.

2.Авторы: Бурьгин Г.Л., Каргаполова К.Ю., Ткаченко О.В.

3.Штамм *Acinetobacter guillouiae* K2Kn02 обладает рост-стимулирующей активностью по отношению к проросткам пшеницы и микроклонам картофеля в культуре *in vitro*. Продуцирует фитогормон индолилуксусную кислоту (ИУК) на среде с триптофаном. Депонирован как практически-ценный.

4. Штамм *Acinetobacter guillouiae* K2Kn02 депонирован 10 июля 2017 г. под регистрационным номером **RCAM04485**.

5.Адрес коллекции: 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3, ФГБНУ ВНИИСХМ; тел. (812)470-51-00, факс(812)470-43-62, e-mail: v.safronova@rambler.ru, сайт: <http://www.arriam.ru>

Вр.и.о. директора ФГБНУ ВНИИСХМ

Н.А. Проворов

Н.А. Проворов

Заведующая RCAM, к.б.н.

В.И. Сафронова

В.И. Сафронова





Russian Collection of Agricultural Microorganisms

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»
(ФГБНУ ВНИИСХМ)

196608 Санкт-Петербург, Пушкин,
 шоссе Подбельского, 3
 Телефон 8-812-470-51-00

Выдано в ФГБОУ ВО Саратовский
 ГАУ

Факс 470-43-62

29.08.2017 № 29/17

СПРАВКА

о депонировании культуры микроорганизмов в Ведомственной коллекции
полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения
(RCAM)

1. Депозиторы: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН), 410049, г. Саратов, проспект Энтузиастов, д. 13; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова (ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ), 410000, г. Саратов, ул. Соколова, д. 335.

2. Авторы: Бурьгин Г.Л., Каргаполова К.Ю., Ткаченко О.В.

3. Штамм *Ochrobactrum* sp. T1Kr02 обладает рост-стимулирующей активностью по отношению к проросткам пшеницы и микроклонам картофеля в культуре *in vitro*. Продуцирует фитогормон индолилуксусную кислоту (ИУК) на среде с триптофаном. Депонирован как практически-ценный.

4. Штамм *Ochrobactrum* sp. T1Kr02 депонирован 10 июля 2017 г. под регистрационным номером **RCAM04486**.

5. Адрес коллекции: 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3, ФГБНУ ВНИИСХМ; тел. (812)470-51-00, факс(812)470-43-62, e-mail: v.safronova@rambler.ru, сайт: <http://www.arriam.ru>

Вр.и.о. директора ФГБНУ ВНИИСХМ *Н. Проворов* Н.А. Проворов

Заведующая RCAM, к.б.н.

В.И.Сафронова В.И.Сафронова





Russian Collection of Agricultural Microorganisms

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»
(ФГБНУ ВНИИСХМ)

196608 Санкт-Петербург, Пушкин,
 шоссе Подбельского, 3
 Телефон 8-812-470-51-00

Выдано в ФГБОУ ВО Саратовский
 ГАУ

Факс 470-43-62
 28.04.2017 № 767/04

СПРАВКА

о депонировании культуры микроорганизмов в Ведомственной коллекции
полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения
(RCAM)

1.Депозиторы: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН), 410049, г. Саратов, проспект Энтузиастов, д. 13; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова (ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ), 410000, г. Саратов, ул. Соколова, д. 335.

2.Авторы: Бурьгин Г.Л., Каргаполова К.Ю., Ткаченко О.В.

3.Штамм *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 обладает рост-стимулирующей активностью по отношению к проросткам пшеницы и микроклонам картофеля в культуре *in vitro* и в условиях *ex vitro*. Устойчив к гербициду глифосату. Депонирован как практически-ценный.

4. Штамм *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 депонирован 27 апреля 2017 г. под регистрационным номером **RCAM04481**.

5.Адрес коллекции: 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3, ФГБНУ ВНИИСХМ; тел. (812)470-51-00, факс(812)470-43-62, e-mail: v.safronova@rambler.ru, сайт: <http://www.arnam.ru>

Вр.и.о. директора ФГБНУ ВНИИСХМ

Н.А. Проворов

Заведующая RCAM, к.б.н.

В.И.Сафронова



АКТ
о внедрении результатов НИОКР

Мы, нижеподписавшиеся, представитель Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН), руководитель ИБФРМ РАН – Матора Лариса Юрьевна, с одной стороны и представитель Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» (ФГБОУ ВО Вавиловский университет), исполняющий обязанности проректора по научной и инновационной работе – Воротников Игорь Леонидович, с другой стороны, составили настоящий акт о том, что в результате проведения совместных исследований в рамках договоров о творческом сотрудничестве из корней картофеля выделены штаммы ризосферных бактерий *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2, *Ochrobactrum* sp. T1Kr02, *Kocuria rosea* T1Ks19, *Ensifer adhaerens* T1Ks14, обладающие рост-стимулирующей активностью по отношению к растениям. Штаммы внесены в коллекцию ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru/>) и используются для решения научных и производственных задач различного уровня.

Представитель ИБФРМ РАН
Руководитель ИБФРМ РАН



Л.Ю. Матора
2023 г.

Представитель ФГБОУ ВО
Вавиловский университет
И.о. проректора по НИР

И.Л. Воротников
2023 г.

