

ИЗУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ

Научная статья

УДК 58.085:634.75:579.64

DOI: 10.30901/2227-8834-2025-3-80-91



Влияние инокуляции штаммами ризобактерий микрорастений земляники *in vitro* на их стрессовый ответ при культивировании *ex vitro* в условиях гидропоники

А. А. Куликов¹, О. В. Ткаченко¹, Н. В. Евсеева², К. Ю. Каргаполова¹, А. Ю. Денисова¹, Н. Н. Позднякова²,
Г. Л. Бурыгин^{1,2}, А. А. Широков²

¹ Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова, Саратов, Россия

² Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук», Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, Саратов, Россия

Автор, ответственный за переписку: Оксана Викторовна Ткаченко, oktkachenko@yandex.ru

Актуальность. Предварительная инокуляция микрорастений *in vitro* рост-стимулирующими микроорганизмами может положительно влиять на их адаптацию к условиям *ex vitro*. Цель работы – изучение влияния бактериализации микрорастений земляники в культуре *in vitro* ризосферными штаммами *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Kocuria rosea* T1Ks19 на стрессовый ответ при культивировании *ex vitro* в условиях гидропоники.

Материалы и методы. В качестве макросимбионтов использовали микрорастения земляники сортов 'Asia' и 'Vima Kimberly', в качестве микросимбионтов – ризобактерии из коллекции ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов (г. Саратов). Ко-инокуляция бактериями проводилась в условиях *in vitro* (10⁶ КОЕ/мл), затем 45-суточные растения высаживали в гидропонную установку (*ex vitro*). В динамике анализировали морфометрические и биохимические показатели растений и количество бактерий на поверхности корней.

Результаты. Инокуляция микрорастений земляники в условиях *in vitro* штаммами ризобактерий не приводила к контаминации питательной среды. Оба штамма обнаруживались на корнях в течение всего периода адаптации. Бактеризация микрорастений приводила после 20 суток адаптации к снижению длины корней у обоих сортов и количества листьев у растений сорта 'Vima Kimberly', но без изменения биомассы побегов. В процессе адаптации у бактериализованных растений в отличие от контрольных лучше поддерживался стабильный уровень фотосинтетических пигментов. У бактериализованных растений к 20-м суткам количество пигментов значительно превышало таковое в контрольных вариантах. Отмечена сортоспецифическая реакция изменения активности антиоксидантных ферментов (пероксидаза, каталаза, аскорбат пероксидаза) и содержания малонового диальдегида.

Заключение. Установлено, что инокуляция *in vitro* микрорастений земляники ризобактериями приводила к снижению стрессового ответа у растений сортов 'Asia' и 'Vima Kimberly' на этапе культивирования *ex vitro*.

Ключевые слова: *Fragaria × ananassa* (Weston) Duchesne ex Rozier, ризосферные бактерии, гидропоника, клональное микроразмножение *in vitro*, адаптация *ex vitro*

Благодарности: работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-26-00087, <https://rscf.ru/en/project/22-26-00087>.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Куликов А.А., Ткаченко О.В., Евсеева Н.В., Каргаполова К.Ю., Денисова А.Ю., Позднякова Н.Н., Бурыгин Г.Л., Широков А.А. Влияние инокуляции штаммами ризобактерий микрорастений земляники *in vitro* на их стрессовый ответ при культивировании *ex vitro* в условиях гидропоники. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2025;186(3):80-91. DOI: 10.30901/2227-8834-2025-3-80-91

STUDYING AND UTILIZATION OF PLANT GENETIC RESOURCES

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2025-3-80-91

The effect of *in vitro* inoculation of strawberry microplants with rhizobacteria strains on their stress response during *ex vitro* cultivation under hydroponic conditions

Artem A. Kulikov¹, Oksana V. Tkachenko¹, Nina V. Evseeva², Kristina Yu. Kargapolova¹, Alena Yu. Denisova¹, Natalia N. Pozdnyakova², Gennady L. Burygin^{1,2}, Alexander A. Shirokov²

¹ *Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov, Saratov, Russia*

² *Saratov Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, Russia*

Corresponding author: Oksana V. Tkachenko, oktkachenko@yandex.ru

Background. Preliminary inoculation of microplants *in vitro* with growth-promoting rhizobacteria can positively affect their adaptation to *ex vitro* conditions. The aim of the work was to study the effect of inoculation of strawberry microclones in *in vitro* culture with *Azospirillum baldaniorum* Sp245 and *Kocuria rosea* T1Ks19 on the stress response during *ex vitro* cultivation under hydroponic conditions.

Materials and methods. Strawberry microplants of cvs. 'Asia' and 'Vima Kimberly' were used as macrosymbionts. The rhizobacteria from the collection of rhizosphere microorganisms of the Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms (Saratov) served as microsymbionts. Co-inoculation with bacteria was carried out *in vitro* (10⁶ CFU/mL), then 45-day-old plants were planted in a hydroponic setup (*ex vitro*). The morphometric and biochemical parameters of plants and the number of bacteria on the root surface were analyzed dynamically.

Results. *In vitro* inoculation of strawberry microplants with rhizobacteria strains did not lead to contamination of the nutrient medium. Both strains were detected on the roots throughout the adaptation period. Bacterization of microplants resulted in a decrease in the root length in both cultivars and the number of leaves in 'Vima Kimberly' after 20 days of adaptation, but without changing the shoot biomass. During the adaptation process, the bacterized plants, unlike the controls, maintained a stable level of photosynthetic pigments better. By the 20th day, the amount of pigments in bacterized plants was significantly higher than in the control variants. A cultivar-specific reaction of the activity of antioxidant enzymes (peroxidase, catalase, and ascorbate peroxidase) and malondialdehyde was noted.

Conclusion. It was found that *in vitro* inoculation of strawberry microplants with rhizobacteria resulted in a decrease in the stress response in plants of cvs. 'Asia' and 'Vima Kimberly' at the *ex vitro* cultivation stage.

Keywords: *Fragaria × ananassa* (Weston) Duchesne ex Rozier, rhizosphere bacteria, hydroponics, *in vitro* clonal micropropagation, *ex vitro* adaptation

Acknowledgements: the work was supported by the Russian Science Foundation, Grant No. 22-26-00087, <https://rscf.ru/en/project/22-26-00087>.

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Kulikov A.A., Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Kargapolova K.Yu., Denisova A.Yu., Pozdnyakova N.N., Burygin G.L., Shirokov A.A. The effect of *in vitro* inoculation of strawberry microplants with rhizobacteria strains on their stress response during *ex vitro* cultivation under hydroponic conditions. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2025;186(3): 80-91. (In Russ.). DOI: 10.30901/2227-8834-2025-3-80-91

Введение

Культивирование земляники садовой (*Fragaria × ananassa* (Weston) Duchesne ex Rozier) с применением инновационных агротехнологий происходит с высокой эффективностью. Однако для получения стабильных и высоких урожаев ягод необходимо использовать высококачественный посадочный материал (Naing et al., 2019). Оздоровление растений земляники от грибных, вирусных, бактериальных заболеваний и вредителей методом культивирования *in vitro* изолированных апикальных меристем с последующей пролиферацией почек позволяет повысить качество посадочного материала и быстро удовлетворить спрос на новые высокоурожайные сорта (Stepanov, Moskovenko, 2016). Успех метода клонального микроразмножения *in vitro* часто ограничивается эффективностью этапа адаптации растений, произведенных в культуре *in vitro*, к условиям *ex vitro* (Hazarika et al., 2006).

Гидропоника – бесубстратный способ выращивания растений, который в настоящее время успешно применяется при выращивании оздоровленных растений земляники в контролируемых условиях (Madhavi et al., 2023). Этот метод позволяет размещать большее количество растений на меньшей площади, чем в открытом грунте, при этом создавая им оптимальные условия для круглогодичного роста. С одной стороны, он позволяет получать продукцию и тиражировать здоровые растения в контролируемых условиях, но с другой – предъявляет высокие фитопатологические требования к исходному материалу.

В настоящее время широко изучается возможность применения микроорганизмов для повышения урожайности и качества сельскохозяйственных культур (Wang et al., 2017). Доказано, что стимулирующие рост растений микроорганизмы, в том числе ризосферные бактерии (PGPM и PGPR), влияют на рост и развитие, смягчают абиотический и биотический стрессы, а также стимулируют ростовые процессы как в условиях *in vitro*, так и *ex vitro* (Orlikowska et al., 2017; Kha et al., 2020; Soumare et al., 2021; Cantabella et al., 2022). В ряде работ показана эффективность приема бактериализации растений земляники в различных условиях выращивания, в том числе в культуре *in vitro* и в гидропонных установках. Установлено положительное влияние на рост растений бактерий рода *Bacillus* (Dias et al., 2009; Mynett et al., 2022; de Moura et al., 2022). Штамм *Bacillus methylotrophicus* M4-96 в условиях *in vitro* не только стимулировал рост растений земляники, но и усиливал биосинтез каллозы в листьях, что повышало устойчивость к патогену *Botrytis cinerea* (Vicente-Hernández et al., 2019). Положительное влияние штамма *Azospirillum argentinense* REC3 на рост растений земляники в условиях гидропоники отмечено на питательном растворе обедненного состава (Guerreiro-Molina et al., 2014).

В предварительных исследованиях нами показана положительная роль различных штаммов ризобактерий в повышении эффективности культивирования микроклонов картофеля *in vitro* (Burygin et al., 2019), адаптационной способности *ex vitro*, продуктивности растений картофеля в условиях защищенного грунта (Kargapolova et al., 2020) и аэропонной установки (Tkachenko et al., 2021), в том числе при ко-инокуляции штаммами *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Kocuria rosea* T1Ks19 (Tkachenko et al., 2023a). Штамм *A. baldaniorum* Sp245 широко используется для инокуляции многих видов растений

благодаря активному биосинтезу ауксинов и рост-стимулирующей способности (Soumare et al., 2021). Штамм *K. rosea* T1Ks19 выделен нами из корней картофеля и является аборигенным для Саратовской области. Ко-инокуляция одновременно штаммами разных таксономических групп считается более перспективной по сравнению с использованием отдельных штаммов за счет возможного синергетического эффекта (Sokolova et al., 2023).

Цель исследования – изучение влияния ризобактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *K. rosea* T1Ks19 на микроклоны земляники *in vitro* и последующую их адаптацию *ex vitro* в условиях гидропонной установки.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись микроклоны земляники садовой (*Fragaria × ananassa* (Weston) Duchesne ex Rozier) двух сортов ('Asia' и 'Vima Kimberly') из *in-vitro*-коллекции микрорастений Саратовского государственного университета генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова. Сорта 'Asia' (NewFruits, Италия) и 'Vima Kimberly' (Visser's Aardbeiplanten B.V., Нидерланды) являются среднеранними, неремонтантными и высокоурожайными (<https://gossortrf.ru/registry/>). *In-vitro*-коллекция создана путем культивирования апикальных меристем, культивируемых на питательной среде Мура-сиге – Скуга.

Для инокуляции растений земляники использовали штаммы PGPR *A. baldaniorum* Sp245 (IBPPM 219) и *K. rosea* T1Ks19 (IBPPM 604) из коллекции ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов (ИБФПМ) (Саратов) (<http://collection.ibppm.ru>).

Микропобеги земляники помещали на агаризованную питательную среду Мура-сиге – Скуга (с фитогормонами 6-бензиламинопурином – 0,5 мг/л и индолил-3-уксусной кислотой (ИУК) – 1 мг/л) и инокулировали суспензиями бактерий штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и *K. rosea* T1Ks19 из расчета 10^6 клеток каждого штамма на 1 мл питательной среды. В качестве контроля служили растения *in vitro*, культивируемые без добавления суспензии бактерий. Условия культивирования *in vitro*: температура – +24°C; влажность воздуха – 60%; освещение – 3 тыс. люкс; продолжительность светового дня – 16 часов.

После 45 суток культивирования хорошо развитые укорененные микрорастения вынимали из пробирок и переносили в гидропонную установку FORTOP (Китай). Питательный раствор для выращивания растений содержал соли макроэлементов (г/100 л): KNO_3 – 20; NH_4NO_3 – 10; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 25; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 3,24; KH_2PO_4 – 8,64; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,1; ЭДТА – 1,44 и соли микроэлементов (г/100 л): $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,22; H_3BO_3 – 0,30; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; KI – 0,01; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,02. Через 2 недели выращивания концентрацию основного питательного раствора увеличивали вдвое. Показатель pH поддерживали на уровне 5,7–6,0. Раствор циркулировал непрерывно, корневая система была наполовину погружена в раствор. Микрорастения выращивали при температуре 25°C днем и 20°C ночью, интенсивности освещения 3 тыс. люкс, фотопериоде 16 часов. Период культивирования в гидропонике длился 20 суток.

Морфометрическую оценку растений земляники проводили на 45-е сутки культивирования *in vitro* (0 суток

адаптации *ex vitro*), а также на 10-е и 20-е сутки адаптации в гидропонной установке. У 10 растений из каждого варианта опыта измеряли длину корня, количество листьев, а также сырую и сухую массы побегов и корней.

Для оценки биохимических показателей в каждой контрольной точке эксперимента отбирали по три растения из каждого варианта опыта. В листьях отобранных растений оценивали следующие показатели: содержание малонового диальдегида; активность антиоксидантных ферментов (пероксидазы, каталазы, аскорбатпероксидазы) по методике, описанной ранее (Tkachenko et al., 2023b). Содержание в листьях фотосинтетических пигментов проводили после экстракции диметилсульфоксида, как описано в источниках (Wellburn, 1994).

В процессе культивирования растений *in vitro* и *ex vitro* для контроля бактерий на поверхности корней определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) путем высева на агаризованную питательную среду LB 10-кратных разведений гомогената фрагментов корней (по 1 см) каждого варианта опыта. Определение принадлежности бактериальных колоний и клеток на корнях штаммам, использованным для инокуляции, проводили

ные о морфологических, физиологических и биохимических параметрах растений получили в двух независимых экспериментах.

Результаты и их обсуждение

Инокулирование микрорастений земляники сортов 'Asia' и 'Vima Kimberly' штаммами *A. baldaniorum* Sp245 и *K. rosea* T1Ks19 не оказывало существенного влияния на морфометрические параметры растений в условиях *in vitro*, контрольные и опытные растения обоих сортов достоверно не различались по анализируемым признакам.

Приживаемость растений в условиях гидропонной установки во всех вариантах опыта приближалась к 100% и достоверно не различалась.

На 20-е сутки культивирования в гидропонной установке наблюдали уменьшение длины корней у обоих сортов бактеризованных растений в среднем на 39% по сравнению с контрольным вариантом (таблица), что согласуется с нашими ранее опубликованными результатами (Tkachenko et al., 2023a).

Таблица. Морфометрические показатели микрорастений земляники сортов 'Asia' и 'Vima Kimberly' в контроле и при инокуляции бактериями *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Kocuria rosea* T1Ks19 на 20-е сутки адаптации *ex vitro*

Table. Morphometric parameters of strawberry microplants of cvs. 'Asia' and 'Vima Kimberly' in the control variant and under inoculation with *Azospirillum baldaniorum* Sp245 and *Kocuria rosea* T1Ks19 bacteria on the 20th day of *ex vitro* adaptation

Сорт	Вариант	Длина корня, см	Количество листьев, шт.	Сырая масса побега, г	Сухая масса побега, г	Сырая масса корней, г	Сухая масса корней, г
'Asia'	Контроль	19,12с	7,25b	1,14a	0,24	1,13	0,21
	Опыт	11,50ab	8,25b	1,46ab	0,44	1,14	0,25
'Vima Kimberly'	Контроль	14,00b	8,25b	1,81b	0,38	1,83	0,40
	Опыт	8,75a	5,75a	1,95b	0,41	1,55	0,34
F _{факт.}		16,67*	8,04*	3,09*	1,34	2,73	2,42
НСР _{0,05}		3,46	1,33	0,61	–	–	–

Примечание: варианты, достоверно различающиеся на основании теста Дункана на 95% уровне значимости ($P \leq 0,05$), обозначены различными буквами латинского алфавита; * – фактическое значение критерия Фишера превышает теоретическое

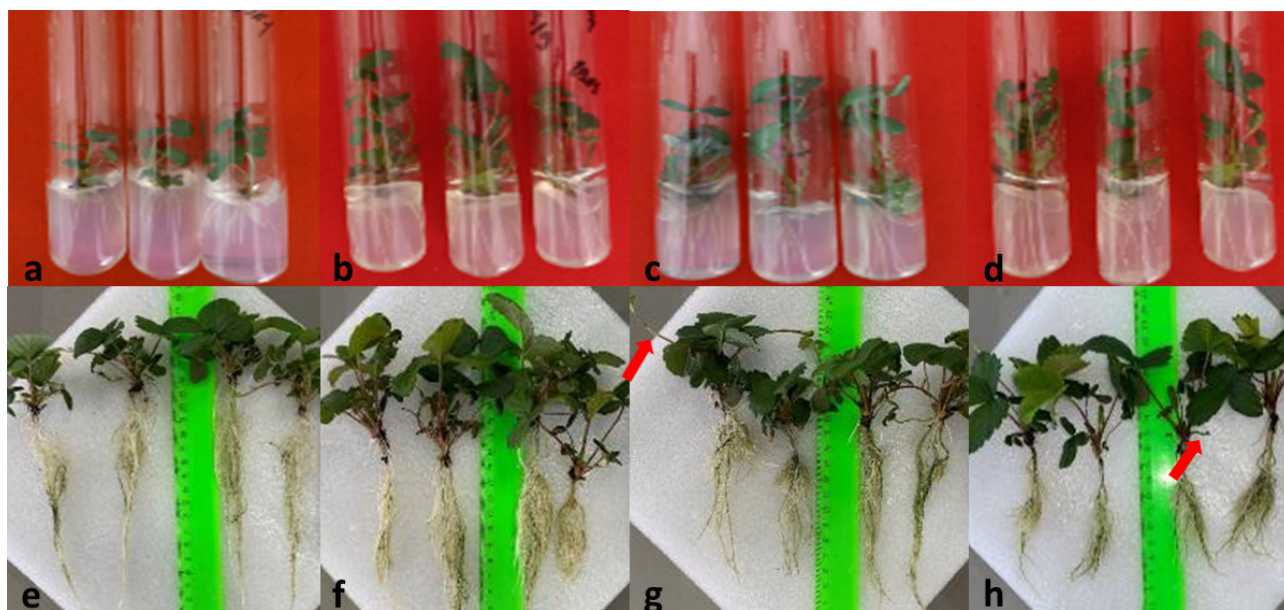
Note: the variants with statistically significant differences according to Duncan's test at 95% significance level ($P \leq 0.05$) are marked with different Latin letters; the asterisk (*) means that the actual value of the Fisher criterion exceeds the theoretical one

с помощью иммуноферментного анализа и иммунофлуоресцентной микроскопии корней на конфокальном микроскопе TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия). Первичными антителами служили штамм-специфичные кроличьи антитела против соматических антигенов *A. baldaniorum* Sp245 и *K. rosea* T1Ks19 (концентрация – 50 мкг/мл) (Matora et al., 1998), вторичными антителами – козы антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой (Jackson ImmunoResearch, США, концентрация – 0,8 мг/мл) и тетраметилродаминоизотиоцианатом (TRITC) (Abscam, США, концентрация – 5 мкг/мл).

Статистический анализ результатов проводили методом двухфакторного дисперсионного анализа со сравнением средних по наименьшей существенной разности (НСР) и по тесту Дункана при уровне значимости 95% ($P \leq 0,05$). В таблицах и диаграммах варианты, достоверно различающиеся на основании теста Дункана, обозначены различными буквами латинского алфавита. Дан-

По количеству листьев у растений сорта 'Asia' не обнаружено различий между контрольными и опытными вариантами (см. таблицу). У сорта 'Vima Kimberly' в опытном варианте количество листьев уменьшилось на 30%. Сырая и сухая масса побегов и корней у бактеризованных и контрольных растений не различались. Растения сорта 'Vima Kimberly' в целом были крупнее растений сорта 'Asia' (рис. 1), что подтверждается большей сырой массой побега (см. таблицу). Отмечено появление побегов размножения (столонов) у части бактеризованных растений обоих сортов к концу периода адаптации (см. рис. 1).

Во всех вариантах опыта у растений в культуре *in vitro* содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в листьях не различалось. В процессе адаптации наблюдалось общее снижение содержания фотосинтетических пигментов в листьях во всех вариантах. На 10-е сутки выращивания в гидропонной установке различия между варианта-



Верхний ряд – растения перед высадкой в гидропонику, нижний ряд – на 20-е сутки культивирования в гидропонике (стрелками указаны развивающиеся столоны)

The top row shows plants before planting in hydroponics, the bottom one shows them on the 20th day of cultivation in hydroponics (the arrows indicate the developing stolons)

Рис. 1. Растения земляники без инокуляции (контроль) (а, е – ‘Asia’; б, ф – ‘Vima Kimberly’) и с инокуляцией бактериями *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Kocuria rosea* T1Ks19 (с, г – ‘Asia’; д, х – ‘Vima Kimberly’)

Fig. 1. Strawberry plants without inoculation (control) (a, e – ‘Asia’; b, f – ‘Vima Kimberly’) and inoculated with *Azospirillum baldaniorum* Sp245 and *Kocuria rosea* T1Ks19 bacteria (c, g – ‘Asia’; d, h – ‘Vima Kimberly’)

ми не наблюдались, а на 20-е сутки у бактеризованных растений количество пигментов было значительно выше по сравнению с контрольными вариантами, в которых содержание пигментов существенно снижалось (рис. 2).

Активность антиоксидантных ферментов в опытном варианте сорта ‘Asia’ в целом была на том же уровне или ниже, чем в контрольных растениях (рис. 3, а, б, в), что может свидетельствовать о меньшем уровне стресса у растений. У сорта ‘Vima Kimberly’ в опытном варианте отмечено повышение активности пероксидазы *in vitro* в 3 раза по сравнению с контролем (рис. 3, б) и на 57% уровня активности каталазы на 10-е сутки адаптации (рис. 3, а), что указывает на активное регулирование бактериями окислительного стресса.

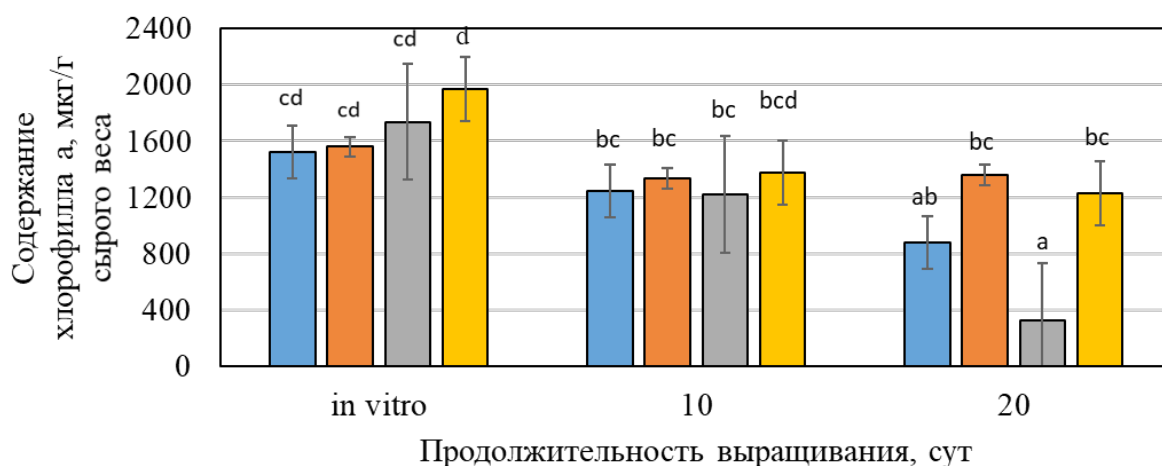
Низкий уровень стресса у опытных растений подтверждается тем, что содержание МДА существенно не отличалось в контрольных и опытных вариантах в условиях *in vitro* и на 10-е сутки адаптации. Но у сорта ‘Vima Kimberly’ на 20-е сутки выращивания в гидропонике содержание МДА повышалось в 2,2 раза (рис. 3, д), что может быть сигналом перехода опытных растений к следующему этапу физиологического развития (закладке столонов и почек вегетативного размножения, которые, как отмечалось выше, обнаруживались у некоторых опытных растений в этот период) (см. рис. 1).

На корнях бактеризованных растений земляники *in vitro*, а также на 10-е и 20-е сутки *ex vitro* определяли бактерии путем подсчета КОЕ штаммов, использованных для инокуляции (рис. 4), и иммунофлуоресцентной микроскопии (рис. 5, 6). Содержание ризобактерий *K. rosea* T1Ks19 на всех этапах было ниже, чем *A. baldaniorum* Sp245. Во всех вариантах опыта наблюдалось плавное снижение количества бактериальных клеток к 20-м суткам выращивания.

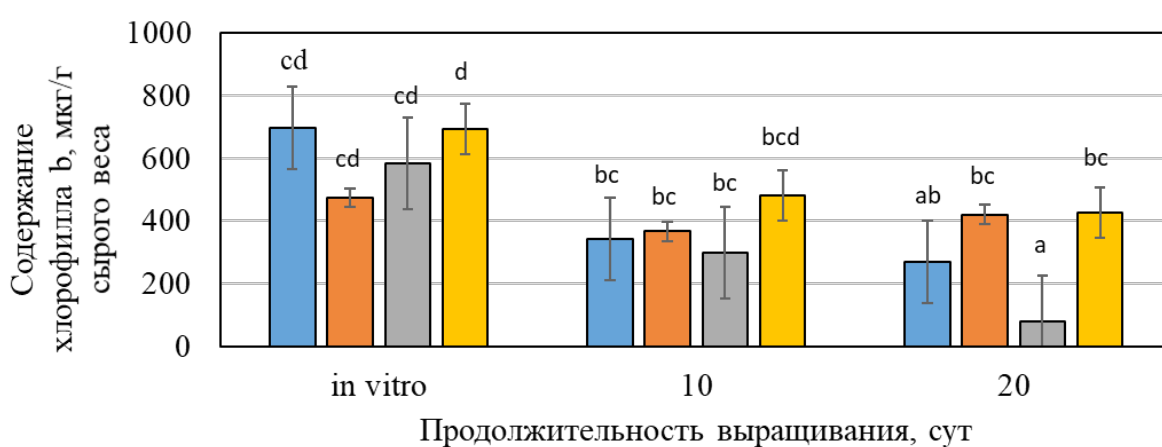
Методом иммунофлуоресцентной микроскопии с помощью флуоресцентно-меченых антител на микропрепаратах корней сортов ‘Asia’ и ‘Vima Kimberly’ подтвердилось присутствие обоих штаммов. Причем для штамма *A. baldaniorum* Sp245 можно отметить образование скоплений, тогда как *K. rosea* T1Ks19 обнаруживается в виде отдельных клеток или небольших скоплений.

Обнаруженный в данной работе эффект бактеризации микрорастений земляники на адаптационный потенциал согласуется с исследованиями других авторов, где рост-стимулирующее влияние зависело от штаммов бактерий и условий инокуляции. По опубликованным данным (Mynett et al., 2022), инокуляция микрорастений земляники бактериями *Bacillus velezensis* и *Bacillus amyloliquefaciens* стимулировала рост корневой системы, а именно площади, объема и диаметра корней. При этом, судя по приведенным в статье данным, длина корней снижалась под влиянием бактерий. Полученные в нашем исследовании результаты также показывают снижение длины корней без уменьшения их массы. Ранее на растениях картофеля установили, что бактерии, как правило, снижают рост корней в длину, но стимулируют их ветвление (Tkachenko et al., 2021, 2023a). Уменьшение длины и массы корней бактеризованных растений может быть связано с увеличением содержания цитокининов в корнях бактеризованных растений (Arkhipova et al., 2020). Известно, что цитокинины ингибируют рост корня растяжением (Liu et al., 2022).

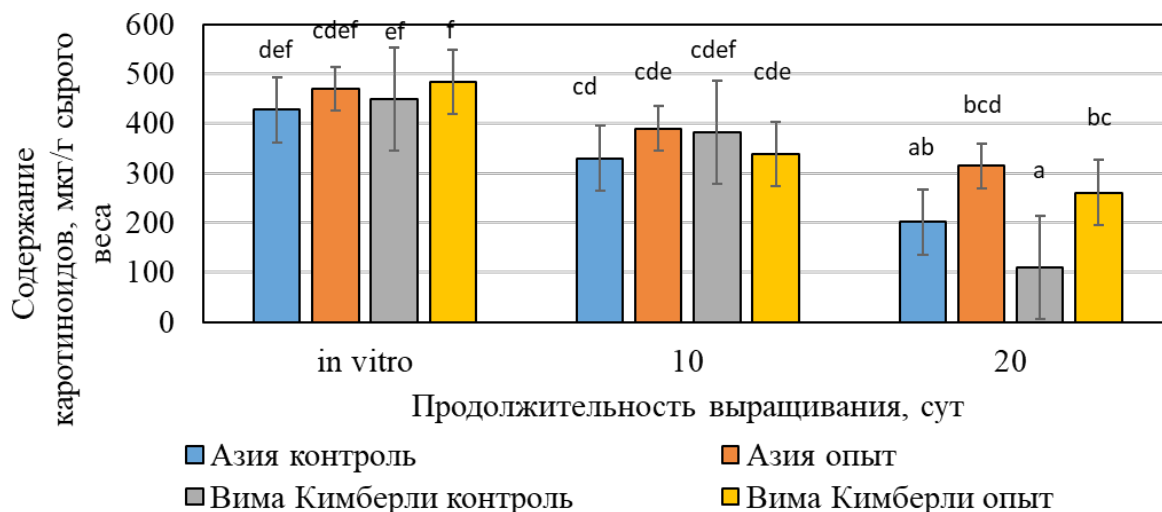
Содержание фотосинтетических пигментов увеличивается в условиях недостаточного освещения (Choi, 2021), что может объяснить повышенное содержание хлорофилла и каротиноидов на этапе культивирования растений *in vitro* и снижение после высадки в гидропонную установку. Повышенное содержание фотосинтетических пигментов в бактеризованных растениях по сравне-



a



b



c

Рис. 2. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях микрорастений земляники сортов 'Asia' и 'Vima Kimberly' в контроле и при инокуляции штаммами *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Kocuria rosea* T1Ks19 (опыт) на различных этапах культивирования: **a** – содержание хлорофилла *a*; **b** – содержание хлорофилла *b*; **c** – содержание каротиноидов

Fig. 2. The content of photosynthetic pigments in the leaves of strawberry microplants of cvs. 'Asia' and 'Vima Kimberly' in the control variants and under inoculation with *Azospirillum baldaniorum* Sp245 and *Kocuria rosea* T1Ks19 strains (experiment) at different stages of cultivation: **a** – chlorophyll *a* content; **b** – chlorophyll *b* content; **c** – carotenoid content

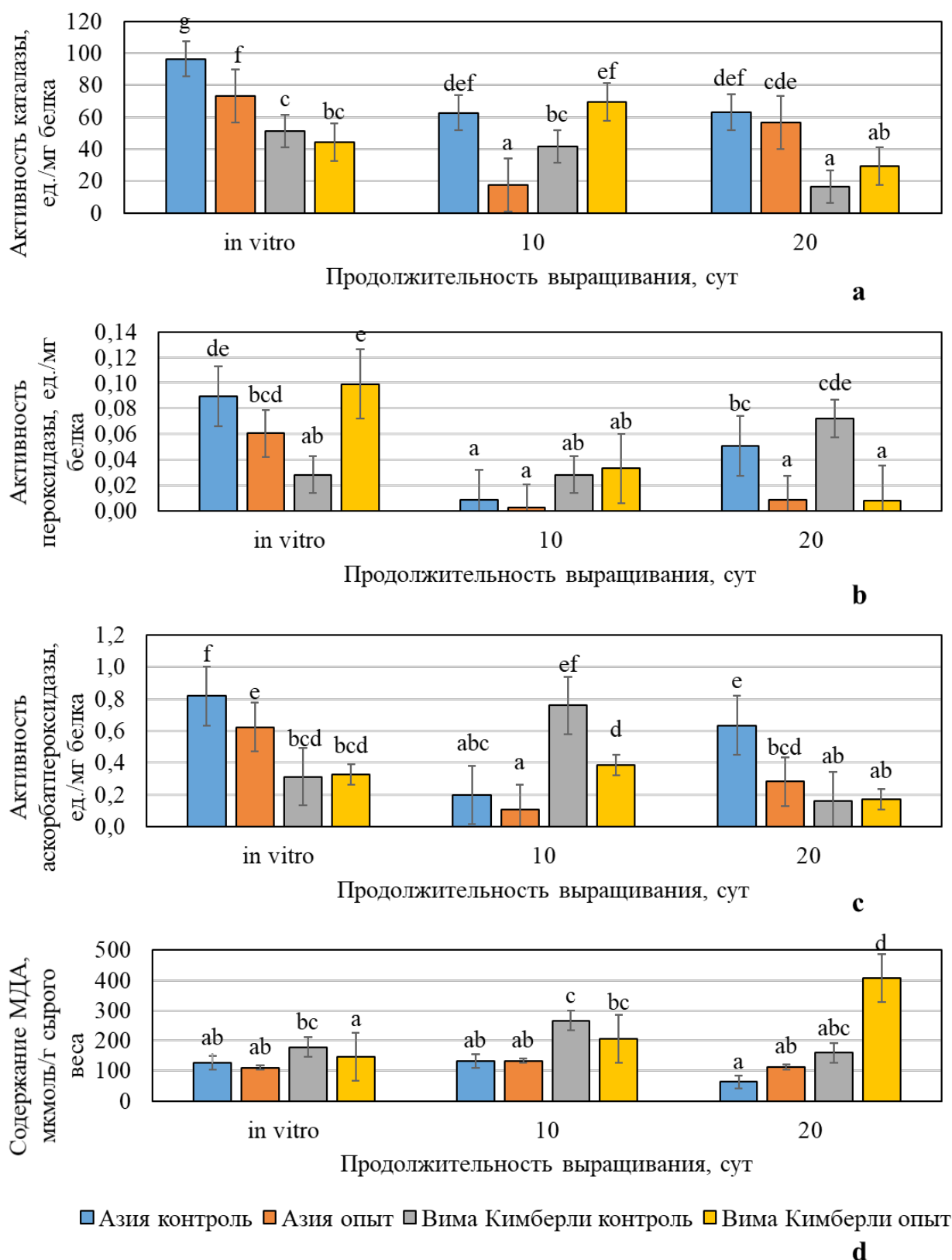


Рис. 3. Содержание антиоксидантных ферментов и малонового диальдегида (МДА) у микрорастений земляники сортов 'Asia' и 'Vima Kimberly' в контроле и при инокуляции бактериями *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Kocuria rosea* T1Ks19 на различных этапах культивирования: а – активность каталазы; б – активность пероксидазы; в – активность аскорбатпероксидазы; д – содержание МДА

Fig. 3. The content of antioxidant enzymes and malondialdehyde (MDA) in strawberry microplants of cvs. 'Asia' and 'Vima Kimberly' in the control variants and under inoculation with *Azospirillum baldaniorum* Sp245 and *Kocuria rosea* T1Ks19 strains (experiment) at different stages of cultivation: а – catalase activity; б – activity peroxidase; в – ascorbate peroxidase activity; д – MDA content

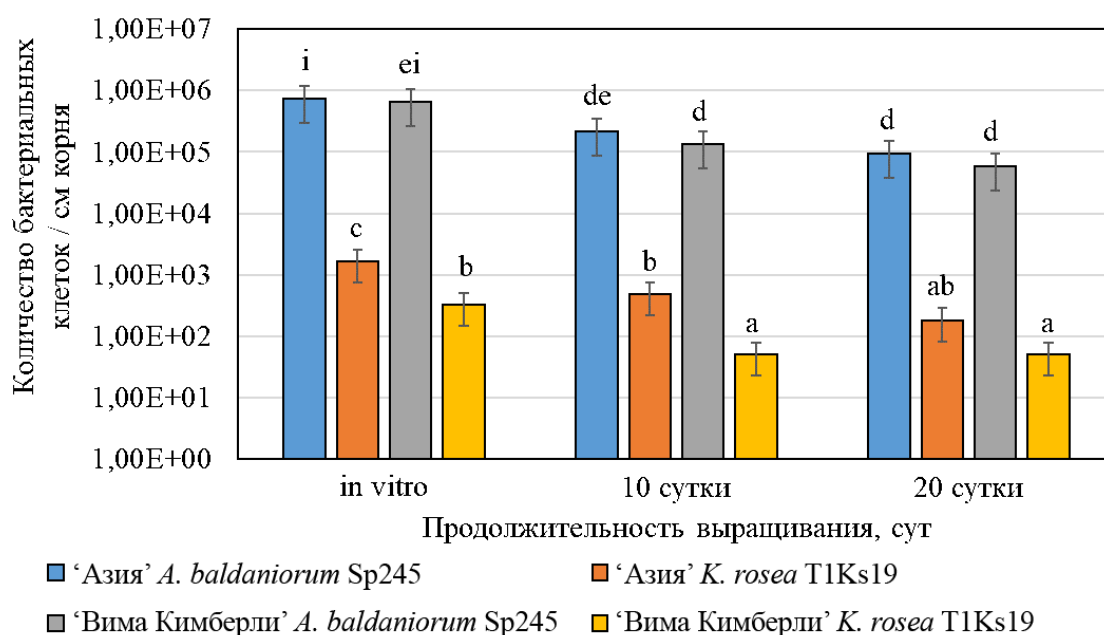


Рис. 4. Динамика содержания бактерий *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Kocuria rosea* T1Ks19 на корнях земляники сортов 'Asia' и 'Vima Kimberly' *in vitro*, на 10-е и 20-е сутки *ex vitro*

Fig. 4. Dynamics of the content of *Azospirillum baldaniorum* Sp245 and *Kocuria rosea* T1Ks19 bacteria on the roots of strawberry cvs. 'Asia' and 'Vima Kimberly' *in vitro*, and on the 10th and 20th days *ex vitro*

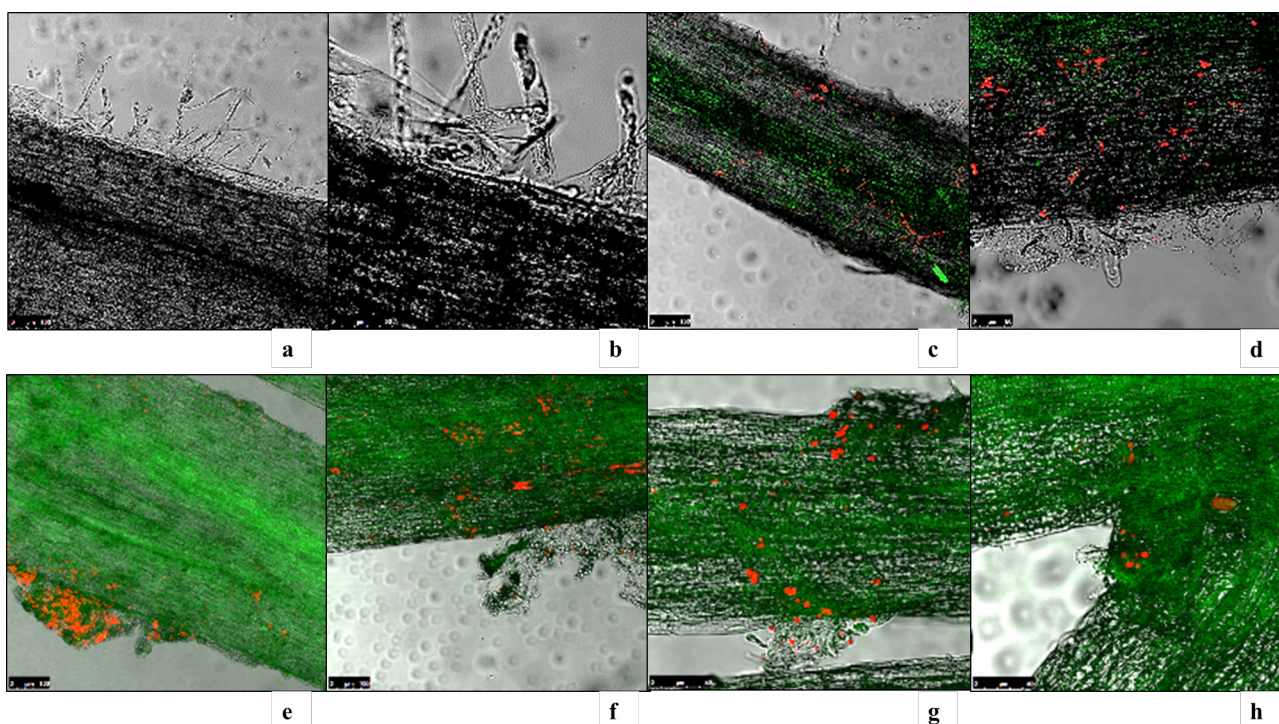


Рис. 5. Выявление бактерий на корнях микрорастений земляники сорта 'Asia' с использованием иммунофлуоресцентной микроскопии: а – контроль с антителами к *Azospirillum baldaniorum* Sp245; б – контроль с антителами к *Kocuria rosea* T1Ks19; в – опыт, нулевые сутки с антителами к *A. baldaniorum* Sp245; д – опыт, нулевые сутки с антителами к *K. rosea* T1Ks19; е – опыт, 10-е сутки с антителами к *A. baldaniorum* Sp245; ф – опыт, 10-е сутки с антителами к *K. rosea* T1Ks19; г – опыт, 20-е сутки с антителами к *A. baldaniorum* Sp245; х – опыт, 20-е сутки с антителами к *K. rosea* T1Ks19

Fig. 5. Detection of bacteria on the roots of strawberry microplants of cv. 'Asia' using immunofluorescence microscopy: а – control with antibodies to *Azospirillum baldaniorum* Sp245;

б – control with antibodies to *Kocuria rosea* T1Ks19; в – 0 days of the experiment with antibodies to *A. baldaniorum* Sp245; д – 0 days of the experiment with antibodies to *K. rosea* T1Ks19; е – 10th day of the experiment with antibodies to *A. baldaniorum* Sp245; ф – 10th day of the experiment with antibodies to *K. rosea* T1Ks19; г – 20th day of the experiment with antibodies to *A. baldaniorum* Sp245; х – 20th day of the experiment with antibodies to *K. rosea* T1Ks19

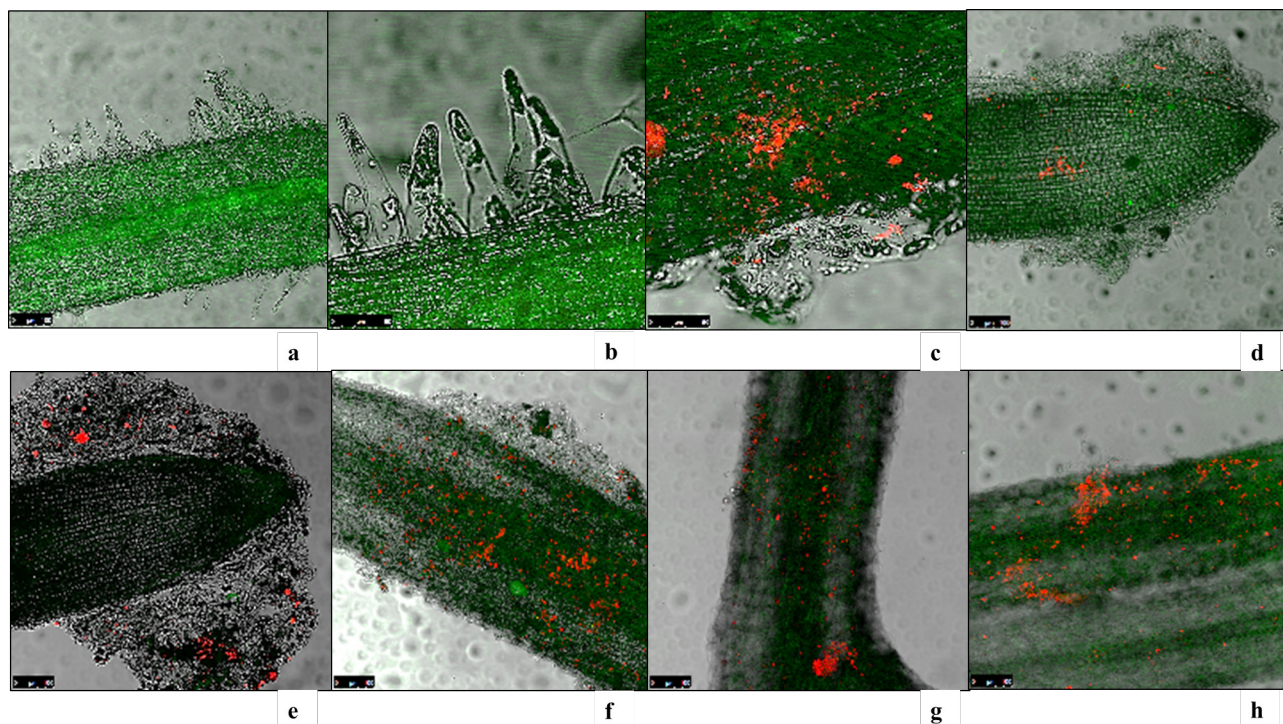


Рис. 6. Выявление бактерий на корнях микрорастений земляники сорта 'Vima Kimberly' с использованием иммунофлуоресцентной микроскопии: **a** – контроль с антителами к *Azospirillum baldaniorum* Sp245; **b** – контроль с антителами к *Kocuria rosea* T1Ks19; **c** – опыт, нулевые сутки с антителами к *A. baldaniorum* Sp245; **d** – опыт, нулевые сутки с антителами к *K. rosea* T1Ks19; **e** – опыт, 10-е сутки с антителами к *A. baldaniorum* Sp245; **f** – опыт, 10-е сутки с антителами к *K. rosea* T1Ks19; **g** – опыт, 20-е сутки с антителами к *A. baldaniorum* Sp245; **h** – опыт, 20-е сутки с антителами к *K. rosea* T1Ks19

Fig. 6. Detection of bacteria on the roots of strawberry microplants of cv. 'Vima Kimberly' using immunofluorescence microscopy: **a** – control with antibodies to *Azospirillum baldaniorum* Sp245; **b** – control with antibodies to *Kocuria rosea* T1Ks19; **c** – 0 days of the experiment with antibodies to *A. baldaniorum* Sp245; **d** – 0 days of the experiment with antibodies to *K. rosea* T1Ks19; **e** – 10th day of the experiment with antibodies to *A. baldaniorum* Sp245; **f** – 10th day of the experiment with antibodies to *K. rosea* T1Ks19; **g** – 20th day of the experiment with antibodies to *A. baldaniorum* Sp245; **h** – 20th day of the experiment with antibodies to *K. rosea* T1Ks19

нию с контрольными совпадает с данными других авторов (Paliwoda et al., 2022).

Установлено, что ризобактерии могут обладать свойствами, которые в стрессовых для растений условиях позволяют им эффективно колонизировать ризосферу растений, что обеспечивает обоим симбиотическим партнерам возможность поддерживать свой гомеостаз (Papadopoulou et al., 2022). По нашим данным, роль штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и *K. rosea* T1Ks19 заключалась не столько в стимулировании ростовых процессов, сколько в регулировании редокс-статуса растений и уменьшении окислительного стресса в растениях, а как следствие – лучшей адаптации их к изменяющимся условиям среды культивирования.

Заключение

Проведенные нами исследования показали, что инокуляция *in vitro* растений земляники комбинацией штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и *K. rosea* T1Ks19 не вызывает контаминацию среды культивирования. Более того, бактериализация повышает эффективность адаптации растений к условиям *ex vitro*, в том числе стабилизирует фотосинтетическую активность по сравнению с растениями, не инокулированными бактериями. Механизмом повышения адаптационной способности опытных микро-

растений в условиях *ex vitro* может быть снижение уровня накопления малонового диальдегида, а также регулирование активности антиоксидантных ферментов каталазы и пероксидазы в листьях растений, что способствует понижению уровня окислительного стресса.

Перспективным направлением повышения эффективности производства оздоровленного материала земляники является инокуляция микрорастений земляники *in vitro* штаммами *A. baldaniorum* Sp245 и *K. rosea* T1Ks19 для повышения адаптационной способности растений к условиям гидропонной установки, а также разработка биопрепаратов на основе ризобактерий.

References / Литература

- Arkhipova T.N., Evseeva N.V., Tkachenko O.V., Burygin G.L., Vysotskaya L.B., Akhtyamova Z.A. et al. Rhizobacteria inoculation effects on phytohormone status of potato microclones cultivated *in vitro* under osmotic stress. *Bio-molecules*. 2020;10(9):1231. DOI: 10.3390/biom10091231
- Burygin G.L., Kargapolova K.Yu., Kryuchkova Ye.V., Avdeeva E.S., Gogoleva N.E., Ponomaryova T.S. et al. *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 promotes growth of potato microplants and is resistant to abiotic stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019;35(4):55. DOI: 10.1007/s11274-019-2633-x

- Cantabella D, Dolcet-Sanjuan R, Teixidó N. Using plant growth-promoting microorganisms (PGPMs) to improve plant development under *in vitro* culture conditions. *Planta*. 2022;255(6):117. DOI: 10.1007/s00425-022-03897-0
- Choi H.G. Correlation among phenotypic parameters related to the growth and photosynthesis of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) grown under various light intensity conditions. *Frontiers in Plant Science*. 2021;12:647585. DOI: 10.3389/fpls.2021.647585
- De Moura G., de Barros A., Machado F., da Silva C., Glienke C., Petters-Vandresen D.A.L. et al. The friend within: endophytic bacteria as a tool for sustainability in strawberry crops. *Microorganisms*. 2022;10(12):2341. DOI: 10.3390/microorganisms10122341
- Dias A.C.F., Costa F.E.C., Andreote F.D., Lacava P.T., Teixeira M.A., Assumpção L.C., Araújo W.L., Azevedo J.L., Melo I.S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009;25(2):189-195. DOI: 10.1007/s11274-008-9878-0
- Guerrero-Molina M.F., Lovaisa N.C., Salazar S.M., Díaz-Ricci J.C., Pedraza R.O. Elemental composition of strawberry plants inoculated with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* REC3, assessed with scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray analysis. *Plant Biology (Stuttgart)*. 2014;16(4):726-731. DOI: 10.1111/plb.12114
- Hazarika B.N., Teixeira da Silva J.A., Talukdar A. Effective acclimatization of *in vitro* cultured plants: Methods, physiology and genetics. In: J.A. Teixeira da Silva (ed.). *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*. Vol. 2. Bexhill-On-Sea: Global Science Books; 2006. p.427-438.
- IBPPM RAS Collection of Rhizosphere Microorganisms: [website]. Available from: <http://collection.ibppm.ru> [accessed Aug. 17, 2024].
- Kargapolova K.Yu., Burygin G.L., Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Pukhalskiy Ya.V., Belimov A.A. Effectiveness of inoculation of *in vitro*-grown potato microplants with rhizosphere bacteria of the genus *Azospirillum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2020;141(2):351-359. DOI: 10.1007/s11240-020-01791-9
- Kha T.Z., Kanarskii A.V., Kanarskaia Z.A., Shcherbakov A.V., Shcherbakova E.N. The key plant growth stimulator – rhizobacteria. *Vestnik of Volga State University of Technology. Series: Forest. Ecology. Nature management*. 2020;3(47):58-73. [in Russian] [Ха Т.З., Канарский А.В., Канарская З.А., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н. Ключевой стимулятор роста растений – ризобактерии. *Вестник Поволжского государственного технологического университета*. Серия: Лес. Экология. Природопользование. 2020;3(47):58-73]. DOI: 10.25686/2306-2827.2020.3.58
- Liu S., Strauss S., Adibi M., Mosca G., Yoshida S., Dello Ioio R. et al. Cytokinin promotes growth cessation in the *Arabidopsis* root. *Current Biology*. 2022;32(9):1974-1985.e3. DOI: 10.1016/j.cub.2022.03.019
- Madhavi B.G.K., Kim N.E., Basak J., Choi G.M., Kim H.T. Comparative study of strawberry growth and fruit quality parameters in horizontal and vertical production systems. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 2023;64(2):409-419. DOI: 10.1007/s13580-022-00494-8
- Matora L.Yu., Shvartsburd B.I., Shchegolev S.Yu. Immunochemical analysis of O-specific polysaccharides from the soil nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *Microbiology (Moscow)*. 1998;67(6):677-681.
- Mynett K., Podwyszyńska M., Derkowska E., Górnik K., Sas-Paszt L., Wojtania A. Effect of biologically active TotalHumus® and Bacterbase on the growth *ex vitro* of strawberry, blueberry and hip rose microcuttings. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*. 2022;21(6):7-20. DOI: 10.24326/asphc.2022.6.1
- Naing A.H., Kim S.H., Chung M.Y., Park S.K., Kim C.K. *In vitro* propagation method for production of morphologically and genetically stable plants of different strawberry cultivars. *Plant Methods*. 2019;15:36. DOI: 10.1186/s13007-019-0421-0
- Orlikowska T., Nowak K., Reed B.M. Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2017;128(3):487-508. DOI: 10.1007/s11240-016-1144-9
- Paliwoda D., Mikiciuk G., Mikiciuk M., Kisiel A., Sas-Paszt L., Miller T. Effects of rhizosphere bacteria on strawberry plants (*Fragaria × ananassa* Duch.) under water deficit. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(18):10449. DOI: 10.3390/ijms231810449
- Papadopoulou A., Matsi T., Kamou N., Avdouli D., Mellidou I., Karamanoli K. Decoding the potential of a new *Pseudomonas putida* strain for inducing drought tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants through seed bio-priming. *Journal of Plant Physiology*. 2022;271:153658. DOI: 10.1016/j.jplph.2022.153658
- Sokolova E.A., Mishukova O.V., Hlistun I.V., Tromenschleger I.N., Tikunov A.Y., Manakhov A.D. et al. The effectiveness of co-inoculation by consortia of microorganisms depends on the type of plant and the soil microbiome. *Plants (Basel)*. 2023;13(1):116. DOI: 10.3390/plants13010116
- Soumare A., Diédhiou A.G., Arora N.K., Al-Ani L.K.T., Ngom M., Fall S. et al. Potential role and utilization of plant growth promoting microbes in plant tissue culture. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:649878. DOI: 10.3389/fmicb.2021.649878
- State Variety Commission. Catalogue of Breeding Achievements: [website]. [in Russian] (Госсорткомиссия. Каталог селекционных достижений: [сайт]). URL: <https://gossortrf.ru/registry/> [дата обращения: 10.02.2025].
- Stepanov V.V., Moskovenko N.V. Study of the indicators of the quality of the landscape of gardening drinked by microclon biotechnology. *Scientific Works of the Kuban State Technological University*. 2016;(14):621-628. [in Russian] (Степанов В.В., Московенко Н.В. Изучение показателей качества земляники садовой, выращенной путем биотехнологии микроклонирования. *Научные труды Кубанского государственного технологического университета*. 2016;(14):621-628). URL: <https://ntk.kubstu.ru/data/mc/0035/1487.pdf> [дата обращения: 03.02.2025]
- Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Kargapolova K.Yu., Denisova A. Yu., Burygin G.L., Pozdnyakova N.N. et al. Application of rhizobacteria *Azospirillum baldaniorum* Sp245 and *Kocuria rosea* T1Ks19 to increase the efficiency of potato cultivation in aeroponics. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2023a;70(8):190. DOI: 10.1134/S1021443723602276
- Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Kargapolova K.Yu., Denisova A. Yu., Pozdnyakova N.N., Kulikov A.A. et al. Increased activity of the pro/antioxidant system of potato microplants by rhizospheric bacteria in aeroponics conditions. *The Agrarian Scientific Journal*. 2023b;(3):65-72. [in Russian] (Ткаченко О.В., Евсеева Н.В., Каргаполова К.Ю. и др. Повышение активности про/антиоксидантной системы микро растений картофеля ризосферными бактериями в условиях аэропоники. *Аграрный научный журнал*. 2023b;(3):65-72). DOI: 10.28983/asj.y2023i3pp65-72
- Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Terentyeva E.V., Burygin G.L., Shirokov A., Burov A.M. et al. Improved pro-

duction of high-quality potato seeds in aeroponics with plant-growth-promoting rhizobacteria. *European Potato Journal*. 2021;64(1):55-66. DOI: 10.1007/s11540-020-09464-y

Vicente-Hernández A., Salgado-Garciglia R., Valencia-Cantero E., Ramírez-Ordorica A., Hernández-García A., García-Juárez P. et al. *Bacillus methylotrophicus* M4-96 stimulates the growth of strawberry (*Fragaria × ananassa* 'Aromas') plants *in vitro* and slows *Botrytis cinerea* infection by two different methods of interaction. *Journal of*

Plant Growth Regulation. 2019;38(3):765-777. DOI: 10.1007/s00344-018-9888-6

Wang K., He W., Ai Y., Hu J., Xie K., Tang M. et al. Optimizing seed potato production by aeroponics in China. *Philippine Journal of Crop Science*. 2017;42(1):69-74.

Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*. 1994;144(3):307-313. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2

Информация об авторах

Артем Алексеевич Куликов, аспирант, Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова, 410012 Россия, Саратов, пр. им. Петра Столыпина, 4, стр. 3, artyomka.net@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1728-8229>

Оксана Викторовна Ткаченко, кандидат сельскохозяйственных наук, заведующая кафедрой, Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова, 410012 Россия, Саратов, пр. им. Петра Столыпина, 4, стр. 3, oktkachenko@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8327-6763>

Нина Васильевна Евсеева, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук», Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», 410049 Россия, Саратов, пр. Энтузиастов, 13, evseeva_n@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3973-6766>

Кристина Юрьевна Каргаполова, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова, 410012 Россия, Саратов, пр. им. Петра Столыпина, 4, стр. 3, kinaschchri@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6040-9401>

Алена Юрьевна Денисова, ассистент, Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова, 410012 Россия, Саратов, пр. им. Петра Столыпина, 4, стр. 3, alena.denisova1408@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6789-7666>

Наталья Николаевна Позднякова, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук», Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», 410049 Россия, Саратов, пр. Энтузиастов, 13, Pozdnyakova_n@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0505-4628>

Геннадий Леонидович Бурьгин, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук», Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», 410049 Россия, Саратов, пр. Энтузиастов, 13, доцент, Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова, 410012 Россия, Саратов, пр. им. Петра Столыпина, 4, стр. 3, burygingl@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8031-9641>

Александр Александрович Широков, кандидат биологических наук, руководитель Центра коллективного пользования, Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук», Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», 410049 Россия, Саратов, пр. Энтузиастов, 13, shirokov_a@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4321-735X>

Information about the authors

Artem A. Kulikov, Postgraduate Student, Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov, 4, bldg 3, Petra Stolypina Ave., Saratov 410012, Russia, artyomka.net@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1728-8229>

Oksana V. Tkachenko, Cand. Sci. (Agriculture), Head of a Department, Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov, 4, bldg 3, Petra Stolypina Ave., Saratov 410012, Russia, oktkachenko@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8327-6763>

Nina V. Evseeva, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – a separate structural subdivision of Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, 13 Entuziastov Ave., Saratov 410049, Russia, evseeva_n@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3973-6766>

Kristina Yu. Kargapolova, Cand. Sci. (Agriculture), Associate Professor, Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov, 4, bldg 3, Petra Stolypina Ave., Saratov 410012, Russia, kinaschchri@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6040-9401>

Alena Yu. Denisova, Assistant Professor, Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov, 4, bldg 3, Petra Stolypina Ave., Saratov 410012, Russia, alena.denisova1408@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6789-7666>

Natalia N. Pozdnyakova, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher, Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – a separate structural subdivision of Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, 13 Entuziastov Ave., Saratov 410049, Russia, Pozdnyakova_n@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0505-4628>

Gennady L. Burygin, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – a separate structural subdivision of Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, 13 Entuziastov Ave., Saratov 410049, Russia, Associate Professor, Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov, 4, bldg 3, Petra Stolypina Ave., Saratov 410012, Russia, buryingl@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8031-9641>

Alexander A. Shirokov, Cand. Sci. (Biology), Head of the Center for Collective Use, Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – a separate structural subdivision of Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, 13 Entuziastov Ave., Saratov 410049, Russia, shirokov_a@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4321-735X>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 16.02.2025; одобрена после рецензирования 17.06.2025; принята к публикации 09.07.2025.
The article was submitted on 16.02.2025; approved after reviewing on 17.06.2025; accepted for publication on 09.07.2025.