

**ABSTRACT BOOK**  
**Second International Scientific Conference PLAMIC2020**  
**«Plants and Microbes: the Future of Biotechnology»**  
**Russia, Saratov, 5-9 October 2020**



**СБОРНИК ТЕЗИСОВ**  
**Вторая Международная научная конференция PLAMIC2020**  
**«Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего»**  
**Саратов, 5-9 октября 2020 г.**

УДК 573.4  
ББК 28.07

### **Организаторы:**

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»  
ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН  
ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной  
микробиологии  
Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН  
Уфимский институт биологии УФИЦ РАН  
Институт микробиологии НАН Беларуси

### **Ассоциация «Аграрное образование и наука»**

#### **Под редакцией:**

Тихонович И.А., Коломиец Э.И., Матора Л.Ю., Соловьёв Д.А., Проворов Н.А., Жулин И.Б.,  
Андронов Е.Е., Баймиев А.Х., Башкатов С.А., Белимов А.А., Веселов Д.С., Гоголев Ю.В.,  
Голденкова-Павлова И.В., Дейнеко Е.В., Демченко К.Н., Жуков В.А., Ившина И.Б., Камнев А.А.,  
Комахин Р.А., Коннова С.А., Константинов Ю.М., Кудоярова Г.Р., Лобакова Е.С., Логинов О.Н.,  
Лутова Л.А., Максимов И.В., Маркова Ю.А., Мартыненко В.Б., Матвеева Т.В., Николайчик Е.А.,  
Соколов О.И., Степанова А.Ю., Турковская О.В., Хуснутдинова Э.К., Цыганов В.Е.,  
Цыганова А.В., Чемерис А.В., Чумаков М.И., Шакирова Ф.М., Широких И.Г.,  
Щеголев С.Ю., Эльконин Л.А.

#### **Оргкомитет:**

Председатель – Бурьгин Г.Л.  
Заместители председателя – Вершинина З.Р. и Ткаченко О.В.

Гулий О.И., Гусев Ю.С., Евсеева Н.В., Караваева О.А., Костина Е.Е., Красова Ю.В., Крючкова  
Е.В., Кулуев Б.Р., Курасова Л.Г., Михайлова Е.В., Нейфельд В.В., Рязанцев Н.В., Селиванова О.Г.,  
Тычинин Д.Н., Широков А.А., Шмидт И.В., Шьюрова Н.А.  
plamic2020@mail.ru; plamic2020@gmail.com

Материалы 2-ой Международной научной конференции PLAMIC2020 «Растения и  
микроорганизмы: биотехнология будущего» 5-9 октября 2020 г., Саратов / отв. ред.  
И.А. Тихонович – 2020. – 312 с. – ISBN 978-5-7011-0816-3

В сборнике представлены материалы международной научной конференции PLAMIC2020  
«Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего». Авторы несут ответственность за  
содержание представленных ими материалов.

© Ассоциация «Аграрное образование и наука», 2020

Электронное издание. Постоянный адрес размещения <http://plamic.ru/sbornik/>

ISBN 978-5-7011-0816-3

## **Organizers:**

N.I. Vavilov Saratov State Agrarian University  
Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences  
All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology  
Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences  
Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences  
Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus

## **Association “Agrarian Education and Science”**

## **Editors:**

Tikhonovich I.A., Kalamiyets E.I., Matora L.Yu., Solov'yov D.A., Provorov N.A., Zhulin I.,  
Andronov E.E., Baymiev A.Kh., Bashkatov S.A., Belimov A.A., Veselov D.S., Gogolev Yu.V.,  
Goldenkova-Pavlova I.V., Deineko E.V., Demchenko K.N., Zhukov V.A., Ivshina I.B., Kamnev A.A.,  
Komakhin R.A., Konnova S.A., Konstantinov Yu.M., Kudoyarova G.R., Lobakova E.S., Loginov O.N.,  
Lutova L.A., Maksimov I.V., Markova Yu.A., Martynenko V.B., Matveeva T.V., Nikolaichik Ye.A.,  
Sokolov O.I., Stepanova A.Yu., Turkovskaya O.V., Khusnutdinova E.K., Tsyganov V.E., Tsyganov A.V.,  
Chemeris A.V., Chumakov M.I., Shakirova F.M., Shirokikh I.G., Shchegolev S.Yu., Elkonin L.A.

## **Organizing Committee:**

Chair – Burygin G.L.  
Co-chairs – Tkachenko O.V. and Vershinina Z.R.

Guliy O.I., Gusev Yu.S., Evseeva N.V., Karavaeva O.A., Kostina E.E., Krasova Yu. V.,  
Kryuchkova E.V., Kuluev B.R., Kurasova L.G., Mikhaylova E.V., Neyfeld V.V., Ryazanzev N.V.,  
Selivanova O.G., Tychinin D.N., Shirokov A.A., Schmidt I.V., Shyurova N.A.  
plamic2020@mail.ru; plamic2020@gmail.com

Abstract book of the 2<sup>nd</sup> International Scientific Conference "Plants and Microbes: the Future of Biotechnology" PLAMIC2020, October 5-9, 2020, Saratov, Russia / Ed. I.A. Tikhonovich – 2020.  
– 312 p. – ISBN 978-5-7011-0816-3

Abstracts submitted for presentation at PLAMIC2020 Conference in Saratov, Russia, October 5-9, 2020. They were not reviewed by the PLAMIC2020 Editorial Board and were not edited by the Organizing Committee staff.

e-Link: <http://plamic.ru/sbornik/>

© 2020 Association “Agrarian Education and Science”

**ISBN 978-5-7011-0816-3**

**Supported by / При поддержке**



*ММО «Вавиловское общество генетиков и селекционеров»*



*Белорусское общественное объединение микробиологов*



*Общество физиологов растений России*



*МОО «Микробиологическое общество»*



*Российский фонд фундаментальных исследований*



*Federation of European Microbiological Societies*

**Associative growth-stimulating strains of bacteria and their whole genome sequencing**Abdurashytov S.F.<sup>1</sup>, Melnichuk T.N.<sup>1</sup>, Chirak E.R.<sup>2</sup>, Egovtseva A.Y.<sup>1</sup>, Abdurashytova E.R.<sup>1</sup>, Andronov E.E.<sup>2</sup><sup>1</sup>FSBSI “Research Institute of Agriculture of Crimea”, Simferopol; <sup>2</sup>FSBSI “All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology”, St. Petersburg, Russia

E-mail: asuleyman83@rambler.ru

**Key message.** Strains *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* L1, *P. nitroguajacolicus* M3, *Bacillus* sp. B5 and *Agrobacterium tumefaciens* R1 are growth-promoting agents for winter wheat. The effectiveness of their interaction with plants is probably provided by 4-9 groups of genes responsible for the synthesis of auxins, according to the recognized RAST subsystems.

**Keywords:** associative bacteria, isolated root method, whole genome sequencing, RAST subsystems

Molecular-genetic and ecological-biochemical aspects of the interactions of associative and symbiotic microorganisms with plants are the subject of study by many researchers. Using the whole genomes sequences data of both microorganisms and plants, it is possible to determine the spectrum of genes that ensure effective interaction of symbiotic partners. Therefore, the aim of our research was to identify genes that promote plant growth stimulation in new strains of associative bacteria to *Triticum aestivum* L. Strains *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* L1, *P. nitroguajacolicus* M3, *Bacillus* sp. B5 and *Agrobacterium tumefaciens* R1 were isolated in 2018 from the rhizosphere of winter wheat. The rhizosphere was selected from soils: L1 and R1 – ordinary chernozem, and M3 and B5 – southern chernozem. Isolation was carried out by the method for obtaining roots isolated from the external environment in a Leonard vessel (Sherstoboev, Melnichuk, 2005). DNA was isolated from pure cultures of bacterial strains. Libraries based on the DNA obtained were created using standard kits and sequenced on the MiSeq (Illumina) on the basis of the Centre of Collective Usage “Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology”, ARRIAM. Bacterial genomes were assembled via the CLC Genomic Workbench program.

The RAST (Rapid Annotation using Subsystems Technology) resource was used to annotate whole genomes. The largest percentage (42%) of the identified subsystems was in the strain of *Bacillus* sp. B5, the smallest (27%) was detected in two strains of *P. nitroguajacolicus* L1 and M3. This is due to the small number of available complete genomes of the species *P. nitroguajacolicus* (8 annotated genomes). The sequences number of the species *Bacillus thuringiensis* (the closest homolog to the studied strain B5) was 1082 units.

New strains showed growth-stimulating activity to winter wheat during pre-sowing seed inoculation, increasing the crop yield by 3.2-12.8%. According to the recognized RAST subsystems, the interaction efficiency of the *Bacillus* sp. B5 and *A. tumefaciens* R1 with a macrosymbiont were provided by 4 groups of genes responsible for the synthesis of plant hormones auxins, in *P. nitroguajacolicus* L1 and M3 – 9 and 7, respectively.

At the moment, we have to recognize most of the genes of the studied bacterial strains, which can reveal their new features, including the interaction with the partner plant.

This work is supported by the Russian Foundation of Basic Research (Grant No A\_18-016-00197) and within the Framework of the State Assignment of Fundamental Research (No 0834-2015-0005).

**Ассоциативные штаммы бактерий-ростстимуляторов и их полногеномное секвенирование**Абдурашитов С.Ф.<sup>1</sup>, Мельничук Т.Н.<sup>1</sup>, Чирак Е.Р.<sup>2</sup>, Еговцева А.Ю.<sup>1</sup>, Абдурашитова Э.Р.<sup>1</sup>, Андронов Е.Е.<sup>2</sup><sup>1</sup> ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», Симферополь; <sup>2</sup> ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Штаммы *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* L1, *P. nitroguajacolicus* M3, *Bacillus* sp. B5 и *Agrobacterium tumefaciens* R1 являются ростстимуляторами к пшенице озимой. Эффективность их взаимодействия с растениями, возможно, обеспечивается 4-9 группами генов, отвечающих за синтез ауксинов, согласно распознанным подсистемам RAST.

**Ключевые слова:** полногеномное секвенирование, ассоциативные бактерии, подсистемы RAST, метод изолированных корней

Молекулярно-генетические и эколого-биохимические аспекты взаимодействия ассоциативных и симбиотических микроорганизмов с растениями являются предметом изучения многих исследователей. С помощью данных о полном геноме как микроорганизмов, так и растений, возможно определить спектр генов, обеспечивающих эффективное взаимодействие партнеров. Поэтому целью наших исследований было определить гены, способствующие стимуляции роста растений, у новых штаммов ассоциативных бактерий к *Triticum aestivum* L. Штаммы *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* L1, *P. nitroguajacolicus* M3, *Bacillus* sp. B5 и *Agrobacterium tumefaciens* R1 выделены в 2018 году из ризосферы *Triticum aestivum* L. различных сортов. Ризосфера была отобрана из почв: L1 и R1 – чернозем обыкновенный, а M3 и B5 – чернозем южный. Выделение проводили методом для получения изолированных от внешней среды корней в сосуде Леонарда (Шерстобоев, Мельничук, 2005). ДНК выделяли из чистых культур штаммов бактерий. Библиотеки на основе полученной ДНК создавали с помощью стандартных наборов и секвенировали на платформе MiSeq (Illumina) на базе ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. Сборка бактериальных геномов выполнена с помощью программы CLC Genomic Workbench.

Ресурс RAST (Rapid Annotation using Subsystems Technology) использовали для аннотации полных геномов. Наибольшая доля (42 %) идентифицированных подсистем была у штамма *Bacillus* sp. B5, наименьшая (27 %) выявлена у двух штаммов *P. nitroguajacolicus* L1 и M3. Это связано с небольшим числом доступных полных геномов вида *P. nitroguajacolicus* (8 аннотированных геномов). Количество же сиквенсов вида *Bacillus thuringiensis* (ближайший гомолог к исследуемому штамму B5) составляло 1082 единицы.

Новые штаммы проявляли ростстимулирующую активность к пшенице озимой при предпосевной инокуляции семян, увеличивая урожайность культуры на 3,2-12,8%. Согласно распознанным подсистемам, эффективность взаимодействия штаммов *Bacillus* sp. B5 и *A. tumefaciens* R1 с макросимбиотом обеспечивалась 4 группами генов, отвечающих за синтез растительных гормонов ауксинов, у *P. nitroguajacolicus* L1 и M3 – по 9 и 7, соответственно.

На данный момент нам предстоит распознать большую часть генов изучаемых штаммов бактерий, что может выявить новые их особенности, в том числе, по взаимодействию с растением-партнером.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ А\_18-016-00197 и государственного задания фундаментальных исследований № 0834-2015-0005.

Шерстобоев Н.К., Мельничук Т.Н. Методологический подход к изучению ассоциативных микроорганизмов // Вестник Одесского национального университета. — 2005.Т. 10. Вып. 7. С. 311-315.

### **Influence of biopreparations on the content of proline and chlorophyll *Sorghum bicolor* L. in Steppe conditions**

*Abdurashytova E.R., Abdurashytov S.F., Turin E.E.*

Research Institute of agriculture of Crimea, Simferopol, Crimea

*E-mail: elvi-jadore@mail.ru*

**Key message.** *The use of biopreparations on sorghum contributed to a 38.2% increase in proline and 1.4 times more yields in a dry year, and in a favorable year, seed pre-sowing inoculation reduced the concentration of proline (by 49.8%) and chlorophyll (by 6.5%).*

**Keywords:** *drought, proline, chlorophylls, complex of microbial preparations, sorghum*

Plant drought stress is associated with the accumulation of low-molecular weight substances such as proline. Proline, which can perform an antioxidant and membrane-stabilizing function and may affect on the photosynthetic apparatus indirectly through an osmotic effect [1].

The aim of the work was to study the effect of the complex of microbial preparations (CMP) on the content of proline and chlorophylls in *Sorghum bicolor* L. grown by no-till technology in the Crimean Steppe.

*Sorghum* (Krymbel variety) was grown in 2018-2019 in a stationary field experiment with five-field crop rotation on southern chernozem. CMP based on strains of associative bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) were used for presowing treatment of seeds. In the control version, biological treatment was not performed. To assess the changes in physiological and biochemical processes in plants during the sweeping phase, the content of proline [2] and chlorophyll [3] was determined, and sorghum grain productivity was also taken into account.

The initial period of vegetation of sorghum in 2018 was characterized by atmospheric drought and less rainfall compared to the long-term average. According to the data obtained, the use of biological products contributed to increasing the resistance of plants to drought by increasing the proline content in the leaves by 38.2% compared with the control (38.3 µg/g of plant). The chlorophylls content in the studied variants remained unchanged at 14.8 mg/g of the plant. The productivity in the control was 1.52 t/ha, the use of CMP with AMF increased it by 1.4 times.

Against the backdrop of favorable weather conditions in 2019, the proline content in the control was lower than 42.5%, and chlorophylls were higher by 14.7% than in 2018. When using the ILC, the concentration of proline and chlorophylls decreased by 49.8% and 6.5%, respectively, compared with the control without treatment. These data testified to insignificance of stresses when using biological products in 2019. There are no changes in yield in the conditions of this year were observed.

Thus, it was noted that the use of biopreparation with *S. bicolor* contributed to an increase the proline content by 38.2% and a 1.4-fold increase in sorghum yield in a dry year relative to the untreated control. And in a favorable year, pre-sowing inoculation of sorghum seeds reduced the concentration of proline (by 49.8%) and chlorophylls (by 6.5%).

### **Влияние биопрепаратов на содержание пролина и хлорофилла в *Sorghum bicolor* L., выращенного по технологии прямого посева**

*Абдурашитова Э.Р., Абдурашитов С.Ф., Турин Е.Е.*

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», Симферополь, Республика Крым

**Аннотация.** *Применение биопрепаратов на сорго способствовало повышению содержания пролина на 38,2 % и урожайности в 1,4 раза в засушливый год, а в благоприятный год предпосевная инокуляция семян снижала концентрацию пролина (на 49,8 %) и хлорофиллов (на 6,5 %).*

**Ключевые слова:** *засуха, пролин, хлорофиллы, комплекс микробных препаратов, сорго зерновое*

Вызываемый засухой стресс растений связан с накоплением низкомолекулярных веществ, таких как пролин, который может выполнять антиоксидантную и мембраностабилизирующую функцию и воздействовать на фотосинтетический аппарат опосредованно, через осмотическое действие [1].

Целью работы являлось изучение влияния комплекса микробных препаратов (КМП) на содержание пролина и хлорофилла в растениях *Sorghum bicolor* L., выращенного по технологии прямого посева (ПП) в Степи Крыма.

Сорго зерновое сорта Крымбел выращивали в 2018-2019 гг. в пятипольном севообороте в условиях стационарного полевого опыта по изучению ПП на черноземе южном. КМП на основе штаммов ассоциативных бактерий и арбускулярно-микоризных грибов (AMГ) применяли для предпосевной обработки семян. В контрольном варианте обработку биопрепаратами не проводили. Для оценки изменения физиолого-биохимических процессов в растениях в фазу выметывания определяли содержание пролина [2] и хлорофиллов [3], а также проводили учет зерновой продуктивности сорго.

Начальный период вегетации сорго в 2018 г. характеризовался атмосферной засухой и меньшим количеством осадков по сравнению со средней многолетней. Согласно полученных данных применение биопрепаратов способствовало увеличению устойчивости растений к засухе повышением содержания пролина в листьях на 38,2 % по сравнению с контролем (38,3 мг/г растения). Содержание хлорофиллов в исследуемых вариантах осталось неизменным 14,8 мг/г растения. Урожайность в контроле составила 1,52 т / га, применение КМП с АМГ повысило ее в 1,4 раза.

На фоне благоприятных погодных условий 2019 г. содержание пролина в контроле было меньшим 42,5 %, а хлорофиллов – выше на 14,7 %, чем в 2018 г. При использовании КМП концентрация пролина и хлорофиллов уменьшилась на 49,8 % и 6,5 % соответственно по сравнению с контролем без обработки. Эти данные свидетельствовали об незначительности стрессов при использовании биопрепаратов в 2019 г. Изменения урожайности в условиях этого года не наблюдали.

Таким образом, отмечено, что применение биопрепаратов с *S. bicolor* способствовало повышению содержания пролина на 38,2 % и урожайности сорго в 1,4 раза в засушливый год по отношению необработанному контролю. А в благоприятный год предпосевная инокуляция семян сорго снижала концентрацию пролина (на 49,8 %) и хлорофиллов (на 6,5 %).

1. Rapacz M., Wójcik-Jaęła M., Fiust A., Kalaji H. M., Kościelniak J. Genome-wide associations of chlorophyll fluorescence OJIP transient parameters connected with soil drought response in barley / *Plant Sci.*, 2019.
2. Шихалева, Г. Н. Модифікована методика визначення проліну в рослинних об'єктах / Г.Н. Шихалева, А.К. Будняк, І.І. Шихалеев, О.Л. Иващенко // *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: Біологія.* 2014. – Вип. 21. №1112. – С. 168–172.
3. Специальный практикум по биохимии и физиологии растений / М.М. Окунцов, К.Г. Врублевская, В.М. Гольд [и др.]. – Томск: Изд-во Томского университета, 1966 г. – 103 с.

## The seed proteome of pea (*Pisum sativum* L.) lines different in their response to beneficial microorganisms highlights the different strategies for seed production in plants

Afonin A.M.<sup>1</sup>, Mamontova T.<sup>3</sup>, Soboleva A.<sup>2</sup>, Lukasheva E.<sup>2</sup>, Sulima A.S.<sup>1</sup>, Shtark O.Y.<sup>1</sup>, Kulaeva O.<sup>1</sup>, Gribchenko E.<sup>1</sup>, Romanyuk D.<sup>1</sup>, Akhtemova G.A.<sup>1</sup>, Povydysh M.N.<sup>4</sup>, Sinz A.<sup>3</sup>, Frolov A.<sup>2</sup>, Zhukov V.A.<sup>1</sup>, Tikhonovich I.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>FSBSI ARRIAM, St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup>St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia; <sup>3</sup>Department of Bioorganic Chemistry, Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle, Germany; <sup>4</sup>R&D Department, Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia  
E-mail: afoninalexey@gmail.com

**Key message.** The analysis of the seed proteome of pea lines contrasting in their responsiveness to inoculation with soil microorganisms revealed the mechanisms underlying the extension of the seed filling phase in highly responsive line K-8274.

**Keywords:** *Pisum sativum* L., legume-rhizobial symbiosis, arbuscular mycorrhiza, proteomics

Plants of the Fabaceae family possess the ability to form beneficial symbioses with rhizobial bacteria (Rh) and arbuscular mycorrhizal fungi (AM). Different pea (*Pisum sativum* L.) lines were observed to differ in their response to the microsymbionts, some increasing their productivity more than others. Two pea lines were chosen for this study, as contrasting in their efficiency of interaction with soil microorganisms (EIBSM), high for K-8274 and low for K-3358. Analyzing the pea seed proteomes of the lines both with and without combined microbial inoculation we were able to identify 111 differentially expressed proteins in the two lines (previously published in: Mamontova et al., 2019). The effect of plant genotype on seed proteome signatures turned out to be more pronounced, than that of inoculation with BSM, with proteins important for seed maturation being more abundant in the seed of K-8274.

The high-EIBSM line K-8274 responded to inoculation by up-regulation of proteins involved in cellular respiration, protein biosynthesis, and down-regulation of late-embryogenesis abundant proteins. In contrast, the low-EIBSM line demonstrated lower levels of cell metabolism proteins. The line K-8274 demonstrating prolonged seed filling under optimal conditions, and the line K-3358, that completes the seed development as fast as possible are reminiscent of the K- and R-strategies characteristic for various organisms.

Taking into consideration the findings about the retardation of pea plant senescence caused by inoculation with AM (previously published in: Shtark et al., 2019), it is reasonable to assume that the AM component of the inoculant plays an important role in the extension of the vegetation period in the lines with high EIBSM, and shortening it in those with low EIBSM. This finding might be useful in the selection of pea varieties with specific traits, including the high responsiveness to inoculation.

This work is supported by the RSF grants (17-76-30016, 16-16-00118).

## Протеом семян линий гороха (*Pisum sativum* L.), отличающихся по своей реакции на полезные микроорганизмы, указывает на различные стратегии формирования семян у растений

Афонин А.<sup>1</sup>, Мамонтова Т.<sup>3</sup>, Соболева А.<sup>2</sup>, Лукашева Е.<sup>2</sup>, Сулима А.С.<sup>1</sup>, Штарк О.Ю.<sup>1</sup>, Кулаева О.<sup>1</sup>, Грибченко Э.<sup>1</sup>, Романюк Д.<sup>1</sup>, Ахтемова Г.А.<sup>1</sup>, Повидыш М.Н.<sup>4</sup>, Синц А.<sup>3</sup>, Фролов А.<sup>2</sup>, Жуков В.А.<sup>1</sup>, Тихонович И.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>ФГБУО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; <sup>3</sup>Факультет биоорганической химии, Институт биохимии растений Ассоциации Лейбница, Галле, Германия; <sup>4</sup>Факультет фармакогнозии, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Анализ протеома семян линий гороха, контрастных по отзывчивости на инокуляцию почвенными микроорганизмами, позволил раскрыть механизмы, лежащие в основе продления фазы налива семян у высоко-отзывчивой линии K-8274.

**Ключевые слова:** горох посевной, бобово-ризобияльный симбиоз, арбускулярная микориза, протеомика, эффективность симбиоза

Растения семейства Fabaceae обладают способностью образовывать полезные симбиозы с ризобияльными бактериями (Rh) и грибами арбускулярной микоризы (AM). Ранее было показано, что разные линии гороха (*Pisum sativum* L.) различаются по своей реакции на микросимбионты, причем некоторые из них повышают свою продуктивность в условиях симбиоза в большей степени, чем другие.

В настоящей работе исследованы две линии гороха, которые отличаются по признаку эффективности взаимодействия с почвенными микроорганизмами (ЭВПМ): K-8274 (высокоэффективная) и K-3358 (низкая). При анализе протеомов семян линий гороха без инокуляции и с различными вариантами инокуляции микроорганизмами, нам удалось идентифицировать 111 дифференциально представленных белков у двух линий (ранее опубликовано в: Mamontova et al., 2019). Влияние генотипа растения на протеом семян оказалось более выраженным, чем при инокуляции полезными почвенными микроорганизмами, при этом в семенах линии K-8274 было обнаружено больше белков, участвующих в созревании семян, чем у K-3358.

Линия с высокой ЭВПМ (K-8274) реагировала на инокуляцию повышенным уровнем белков, участвующих в клеточном дыхании, биосинтезе белка и подавлении избыточных белков позднего эмбриогенеза. Напротив, линия с низкой ЭВПМ продемонстрировала сниженные уровни белков клеточного метаболизма. Фенотипы линий K-8274, демонстрирующей длительное созревание семян при оптимальных условиях, и линии K-3358, которая максимально быстро завершает развитие семян, подобны K- и R-стратегиям, характерным для различных организмов

Принимая во внимание выводы о замедлении старения растений гороха, вызванном инокуляцией AM грибами (ранее опубликовано в: Shtark et al., 2019), разумно предположить, что AM-компонент инокулянта играет важную роль в продлении вегетационного периода в линиях с высокой ЭВПМ и сокращении его в линиях с низкой ЭВПМ. Это наблюдение может быть полезно при селекции новых сортов гороха с определенными признаками, в том числе высокой отзывчивостью на инокуляцию.

Работа поддержана грантами РФ (17-76-30016, 16-16-00118).

**Evaluation of the effectiveness of integrated biofertilizer in the cultivation of spring wheat in Northern Kazakhstan**

Aipova P., Abdykadyrova A.Zh., Kurmanbayev A.A.

RSE "National Center for Biotechnology" of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan,  
Nur-Sultan, Kazakhstan  
E-mail: rakhilya\_73@mail.ru

**Key message.** Based on Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), a biological product for wheat was created and tested in Northern Kazakhstan.

**Keywords:** plant growth stimulation, efficiency, wheat, biofertilizers, productivity

The great importance for Kazakhstan has the creation of complex-acting microbial preparations containing compositions from various groups of microorganisms. In this regard, the most promising is the rhizobacteria of the PGPR group, which allow to increase the yield of spring wheat.

The aim of the research is to determine the effectiveness of PGPR complex biofertilizers in spring wheat cultivation in Northern Kazakhstan. The objects of research were: spring wheat (*Triticum aestivum* L) cultivar "Astana 2". The effectiveness of the active PGPR strains of microorganisms in vegetation experiments in the field was evaluated. Field plot experience was laid in the fields belonging to RPCGM named after A.I. Baraev. Seeds were treated with complex biofertilizers K1 and 2/1C. According to the results of studies, it was found that bacterization increased the grain productivity of spring wheat compared with the control in all cases. An analysis of the results of wheat productivity showed that the use of biofertilizer 2/1C for pre-sowing bacterization of seeds in soil climatic conditions of Northern Kazakhstan is an effective way to increase grain productivity. The effectiveness of the preparations is confirmed by the data on the quality of wheat grains. The highest amount of protein content and gluten were noted in the experimental variants: K1–14.82%–27.92% and 2/1C – 14.75% –27.85%, relative to the control variant 14.37% –27.18%, respectively. Despite the severe drought of 2019 and low temperatures during the sprouting phase, biological products provided a grain yield of 14.38-15.72 c / ha, which exceeded the untreated control by 1.89 - 3.23 c / ha.

Thus, according to the results of field trials, K1 and strain 2/1C can be recommended as biological products for increasing the yield of spring wheat in the conditions of Northern Kazakhstan. The results will be the basis for the development of new competitive biotechnological products for crops.

This work was carried out as part of the state program "BR06349586" according to the Ministry of Agriculture and as part of the program BR05236334 for BB, Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

**Оценка эффективности комплексного биоудобрения при возделывании яровой пшеницы в Северном Казахстане**

Aipova P., Abdykadyrova A.Zh., Kurmanbayev A.A.

РГП "Национальный центр биотехнологии" КН МОН РК, Нур-Султан, Казахстан

**Аннотация.** На основе стимулирующих рост растений (PGPR - Plant Growth Promoting Rhizobacteria) создан и испытан биопрепарат под пшеницу в Северном Казахстане.

**Ключевые слова:** стимуляция роста растений, эффективность, пшеница, биоудобрения, урожайность

Большую важность для Казахстана имеет создание микробных препаратов комплексного действия, содержащие композиции из различных групп микроорганизмов. В этом плане наиболее перспективны ризобактерии группы PGPR, позволяющие повысить урожайность яровой пшеницы.

Цель исследований – определение эффективности комплексных биоудобрений из PGPR при возделывания яровой пшеницы в Северном Казахстане. Объектами исследований являлись: яровая пшеница (*Triticum aestivum* L) сорта "Астана 2". Проведена оценка эффективности активных штаммов PGPR микроорганизмов в вегетационных опытах в полевых условиях. Полевой деляночный опыт был заложен на полях, принадлежащих НПЦЗХ им. А.И.Бараева. Семена обрабатывали комплексными биоудобрениями K1 и 2/1C. По результатам исследований установлено, что бактеризация повышала зерновую продуктивность яровой пшеницы по сравнению с контролем на всех вариантах. Анализ результатов урожайности пшеницы показал, что применения биоудобрения 2/1c для предпосевной бактеризации семян в почвенных климатических условиях Северного Казахстана является эффективным приемом повышения зерновой продуктивности. Эффективность препаратов подтверждена данными по качеству зерна пшеницы. Наибольшее содержание белка и количество клейковины отмечены в опытных вариантах: K1–14,82%–27,92% и 2/1c–14,75%–27,85%, относительно контрольного варианта 14,37%–27,18%, соответственно. Несмотря на жестокую засуху 2019 года и низкие температуры во время фазы всходов биопрепараты обеспечили урожай зерна в 14,38-15,72 ц/га, что превышало необработанный контроль на 1,89 - 3,23 ц/га.

Таким образом, по результатам полевых испытаний K1 и штамм 2/1c могут быть рекомендованы в качестве биопрепаратов для повышения урожая яровой пшеницы в условиях Северного Казахстана. Полученные результаты будут положены в основу разработки новых конкурентоспособных биотехнологических препаратов под зерновые культуры.

Работа выполнена в рамках государственной программы "BR06349586" по МСХ и в рамках программы BR05236334 по ББ, МОН РК.



### Culturable endophytic bacteria from garden pea (*Pisum sativum* L.)

Akhtemova G.A.<sup>1</sup>, Vasileva E.N.<sup>1</sup>, Afonin A.M.<sup>1</sup>, Zhukov V.A.<sup>1</sup>, Tikhonovich I.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia  
E-mail: ahgulya@yandex.ru

**Key message.** From the organs of various genotypes of *Pisum sativum* L., culturable endophytic bacteria belonging to phyla Proteobacteria, Firmicutes, and Actinobacteria, were isolated. Among them, growth-stimulating strains were identified.

**Keywords:** endophytic bacteria, pea (*Pisum sativum* L.)

Leguminous plants form beneficial symbioses with microorganisms inhabiting the internal environment of the plants (endosphere), namely nodule bacteria, arbuscular-mycorrhizal fungi and plant-growth promoting bacteria (PGPB). Endophytic PGPB colonizing the intercellular space in various plant tissues can be isolated from all plant parts, including dry seeds. Aim of this work: to isolate and study culturable bacterial endophytes of pea (*Pisum sativum* L.). Endophytic bacteria were isolated from stems, leaves and seeds of different pea genotypes: SGE, JI 2822, K-8274, K-3358 and bred cultivar "Triumph". Plant organs were sterilized with 70% ethanol and 5% sodium hypochlorite, homogenized and plated on Petri dishes with agar nutrient medium TSA. All culturable endophytic bacteria were isolated as pure cultures; the collection was stored at at -80 °C. At the same time, pure cultures of endophytic bacteria were identified and tested for agronomically useful traits (plant growth promoting activity, production of auxin-like compounds, fungicidal and antibiotic activity). Molecular-genetic identification of these strains was performed by sequencing of V1-V9 variable regions of 16S rDNA amplified with universal primers. Endophytic bacteria found in pea belong to phyla Proteobacteria ( $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria), Firmicutes and Actinobacteria, which are represented by families *Sphingomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Ralstoniaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Pseudomonadaceae* and *Bacillaceae*, and 11 genera: *Bacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Paenibacillus* sp., *Kocuria* sp., *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Actinobacter* sp., *Serratia* sp., *Rahnella* sp., *Enterobacter* sp. Also, it was shown that the strains of *Rahnella* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp. and *Acinetobacter* sp. isolated from pea tissues stimulate the growth of plant and inhibit the growth of pathogens. This work was supported by the grants of RSF (17-76-30016) and RFBR (19-016-00194 A), and the Government contract № 0664-2020-0022.

### Культивируемые эндофитные бактерии гороха посевного (*Pisum sativum* L.)

Ахтемова Г.А.<sup>1</sup>, Васильева Е.Н.<sup>1</sup>, Афонин А.М.<sup>1</sup>, Жуков В.А.<sup>1</sup>, Тихонович И.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург -Пушкин, Россия; <sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Из надземных органов пяти генотипов гороха посевного выделены культивируемые эндофитные бактерии, принадлежащие к филум Proteobacteria, Firmicutes и Actinobacteria. Среди них выявлены ростстимулирующие штаммы.

**Ключевые слова:** эндофитные бактерии, горох посевной (*Pisum sativum* L.)

Бобовые растения образуют взаимовыгодные симбиозы с микроорганизмами, населяющими внутреннюю среду растений (эндосферу): клубеньковыми бактериями, арбускулярно-микоризными грибами и бактериями, способствующими росту растений (PGPB, Plant Growth-Promoting Bacteria). Эндофитные PGPB, колонизирующие межклеточное пространство в растительных тканях, могут быть выделены из всех частей растения, включая сухие семена. Цель данной работы: выделить и изучить культивируемые бактериальные эндофиты гороха (*Pisum sativum* L.). Эндофитные бактерии выделяли из стеблей, листьев и семян гороха посевного (*Pisum sativum* L.) различных генотипов: SGE, JI 2822, K-8274, K-3358 и селекционный сорт «Триумф». Органы растений стерилизовали 70% этанолом и 5% гипохлоритом натрия, гомогенизировали и высевали на чашки Петри с агаровой питательной средой TSA. Все культивируемые эндофитные бактерии доводили до состояния чистых культур, коллекцию отправляли на длительное хранение при -80 °C. Одновременно, чистые культуры эндофитных бактерий идентифицировали и тестировали на агрономически полезные признаки (активность, способствующая росту растений, продуцирование ауксиноподобных соединений, фунгицидная и антибиотическая активность). Молекулярно-генетическую идентификацию штаммов осуществляли секвенированием переменных областей V1-V9 16S рДНК, амплифицированных с использованием универсальных праймеров. Эндофитные бактерии, обнаруженные во всех генотипах гороха, принадлежат к типу Proteobacteria ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -протеобактерии), Firmicutes и Actinobacteria. В основном, они представлены семействами *Sphingomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Ralstoniaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Pseudomonadaceae* и *Bacillaceae*, которые относятся к родам: *Bacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Paenibacillus* sp., *Kocuria* sp., *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Actinobacter* sp., *Serratia* sp., *Rahnella* sp., *Enterobacter* sp. Было также установлено, что штаммы бактерий *Rahnella* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp. и *Acinetobacter* sp., выделенные из тканей гороха, стимулируют рост растений и подавляют рост патогенов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФ (17-76-30016) и РФФИ (19-016-00194 А), а также Госзадания № 0664-2020-0022.



### **The number of microbes–symbionts directly depends on the development power of the root system of the plant**

*Akhtyamova G.A., Chikov V.I.*

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center, Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

*E-mail: guzel1687@mail.ru*

**Key message.** *Separation of the flow of seeds and fertilizers during sowing of barley and the subsequent processing of the sowing with ammonia made it possible to increase the number of shoots and the weight of plants by a factor of three, while reducing the consumption of mineral fertilizers.*

**Keywords:** *photosynthesis, regulation, root growth, symbiosis of microorganisms*

Since the mass of plant roots, and hence the interaction surface of soil microbes, free nitrogen fixers, depends on the presence of nitrates in the soil and the amount of transported sugars from the leaves, we tried to influence the symbiosis of microbes with plants in both of these ways. We closed in a standard seeder SZS-3.6, part of the fertilizer wires (16 out of 24) for feeding fertilizer in the row so that after each one row with fertilizers, two rows without fertilizers followed. Thus, we have increased seed germination in rows without fertilizers by 40%. Subsequent spraying of the crops with complex compounds of zinc and copper with ammonia (ammonia) led to the activation of the appearance of additional tillering shoots and an increase in the mass of the whole plant by a factor of two. It is proposed to use this approach in the field for research with microbiologists on the features of regulation of the symbiosis of microbes with plants. The most important factor for implementing this approach is the use of mechanisms of regulation of photosynthesis at the level of the leaf and the whole plant, which was discovered in our laboratory.

### **Количество микробов–симбионтов прямо зависит от мощности развития корневой системы растения**

*Ахтямова Г.А., Чиков В.И.*

Казанский институт биохимии и биофизики Федерального исследовательского центра, Казанский научный центр Российской академии наук, Казань, Россия

**Аннотация.** *Разделение потоков семян и удобрений при посеве ячменя и последующая обработка посева аммиакатами позволила при снижении расхода минеральных удобрений в три раза повысить число побегов и массу растений в два раза.*

**Ключевые слова:** *фотосинтез, регуляция, рост корней, симбиоз микроорганизмов*

Поскольку масса корней растения, а значит и поверхность взаимодействия почвенных микробов-свободных азотфиксаторов, зависит от присутствия в почве нитратов и количества транспортируемых сахаров из листьев, то мы попробовали повлиять на симбиоз микробов с растениями обоими этими путями. Закрыли в стандартной сеялке СЗС-3,6, часть туко-проводов (16 из 24) для подачи в рядок посева удобрений таким образом, чтобы после каждого одного ряда с удобрениями, следовало два рядка без удобрений. Таким образом, мы повысили в рядках без удобрений всхожесть семян на 40%. Последующее опрыскивание посева комплексными соединениями цинка и меди с аммиаком (аммиакаты) привело к активации появления дополнительных побегов кущения и увеличения массы всего растения в два раза. Предлагается использовать в полевых условиях этот подход для совместных с микробиологами исследований особенностей регуляции симбиоза микробов с растениями. Важнейшим фактором для реализации этого подхода является использование механизмов регуляции фотосинтеза на уровне листа и целого растения, который был открыт в нашей лаборатории.

Чиков В.И., Ахтямова Г.А., Баташева С.Н., Михайлов А.Л., Хамидуллина Л.А., Тимофеева О.А. Влияние блокирования гена апопластной инвертазы на фотосинтез в растениях томата // Физиология растений, 2015, том 62, № 1, С. 45–51.

Chikov V.I. The participation of apoplast invertase in the regulation of photosynthesis by stomatal mechanism. Journal of Plant Sciences 2017; 5(5): 134-145.

Чиков В.И., Ахтямова Г.А., Пахомова В.М. Противоречие между существующей агротехникой и эволюционным развитием растений должно быть устранено // Доклады ТСХА Вып. 291, (часть 11). Москва. Издат. РГАУ-МСХА. 2019. С. 386- 391.

## Comparison of the reaction of barley plants to treatment with microorganisms producing auxins and cytokinins

Akhtyamova Z.A.

Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa

Email: akhtyamovazarina@gmail.com

**Key message.** We studied the effect of bacterization of seedlings of barley plants with strains of hormone-producing bacteria *B. subtilis* IB-22 and *P. mandelii* IB-Ki14. The parameters of plant growth, as well as RWC and the content of chlorophyll in their leaves were estimated.

**Keywords:** *Hordeum vulgare* L., growth, growth-stimulating bacteria

The ability of many strains of rhizospheric bacteria to stimulate plant growth and increase their productivity is increasingly used in crop production. The purpose of this work was to evaluate in detail the growth reaction of the shoots and roots of barley plants to bacterization of their seeds and to identify the peculiarities of the plants' response to treatment with bacteria that can mainly produce cytokinins or auxins. Barley plants were inoculated with the cytokinin-producing bacteria *B. subtilis* IB-22 (Arkhipova et al., 2006) and the auxin-producing bacteria *P. mandelii* IB-Ki14 (Kuzmina et al., 2018) from the collection of microorganisms of the Ufa Institute of Biology of the UFRC RAS. Bacterization of daily seedlings was carried out by soaking in suspension for 20 minutes and then introducing a suspension of bacteria into the root environment of plants ( $10^6$  CFU / g of soil). On the eleventh day from the beginning of the experiment, the fresh mass of shoots and roots, the length of the longest root, and the relative water content and chlorophyll in the leaves were evaluated; the length and width of the leaves was measured every two days from the appearance of the seedlings. *P. mandelii* IB-Ki14 showed their growth stimulating effect during the first days after bacterization, but by the end of the experiment it no longer appeared. The most stable effect from treatment with *B. subtilis* IB-22 strain was the shortening of plant roots, which persisted throughout the experiment. The beneficial effect of bacteria of *B. subtilis* IB-22 strain on barley plants was manifested in their effect on the relative water content and concentration of chlorophyll. An increase in the concentration of chlorophyll in the leaves contributed to a more rapid accumulation of plant biomass treated with bacteria of the *B. subtilis* IB-22 strain. Thus, this work demonstrates the greater effectiveness of the *B. subtilis* IB-22 strain in stimulating the growth of barley plants and the associated physiological processes.

## Сравнение реакции растений ячменя на обработку микроорганизмами, продуцирующими ауксины и цитокинины

Ахтямова З.А.

Уфимский институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа

**Аннотация.** Изучалось влияние бактеризации проростков растения ячменя штаммами гормонпродуцирующих бактерий *B. subtilis* IB-22 и *P. mandelii* IB-Ki14. Оценивались параметры роста растений, а также ОСВ и содержание хлорофилла в их листьях.

**Ключевые слова.** *Hordeum vulgare* L., рост, рост-стимулирующие бактерии

Способность многих штаммов ризосферных бактерий стимулировать рост растений и повышать их урожайность все шире используют в растениеводстве. Цель данной работы состояла в детальной оценке ростовой реакции побегов и корней растений ячменя на бактеризацию их семян и в выявлении особенностей реагирования растений на обработку бактериями, способными преимущественно продуцировать цитокинины или ауксины. Для инокуляции растений ячменя использовали цитокининпродуцирующие бактерии *B. subtilis* IB-22 (Архипова и др., 2006) и ауксинпродуцирующие бактерии *P. mandelii* IB-Ki14 (Кузьмина и др., 2018) из коллекции микроорганизмов Уфимского института биологии УФИЦ РАН. Бактеризацию суточных проростков проводили путем замачивания в суспензии в течение 20 минут и последующим внесением суспензии бактерий в прикорневую среду растений ( $10^6$  КОЕ / г почвы). На одиннадцатые сутки с начала эксперимента оценивали сырую массу побегов и корней, длину самого длинного корня, а также относительное содержание воды и хлорофилла в листьях; длину и ширину листьев оценивали каждые два дня с момента появления всходов. Бактерии *P. mandelii* IB-Ki14 проявляли свой рост стимулирующий эффект в первые дни после бактеризации, но к концу эксперимента он уже не проявлялся. Наиболее стабильным эффектом от обработки штаммом *B. subtilis* IB-22 было укорочение корней растений, сохраняющееся на протяжении всего эксперимента. Благоприятное действие бактерий штамма *B. subtilis* IB-22 на растения ячменя проявлялось в их влиянии на относительное содержание воды и концентрацию хлорофилла. Повышение концентрации хлорофилла в листьях способствовало более быстрому накоплению биомассы растений, обработанных бактериями штамма *B. subtilis* IB-22. Таким образом, данная работа свидетельствует о большей эффективности штамма *B. subtilis* IB-22 в стимуляции роста растений ячменя и связанных с ним физиологических процессов.

## The strategy for choosing nodule bacteria by perennial leguminous plants, depending on the stage of their vegetation

Akimova E.S., Koryakov I. S., Baymiev An.Kh.

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia.

E-mail: iv.katerina-bio@yandex.ru

**Key message.** Data on the genetic diversity and phylogeny of nodule bacteria of the wild perennial legume *Lotus zhegulensis* at different stages of its vegetation are obtained.

**Keywords:** highly effective symbiosis, perennial legumes, vegetative stage, nodule bacteria, genetic diversity of nodule bacteria

Leguminous plants of a temperate climate, mostly perennial, during their ontogenesis go through multiple cycles of interaction with nodule bacteria (rhizobia). Gaining knowledge about the level of specificity when choosing symbiotic partners by plants at different stages of their vegetation is an important condition for creating highly effective symbioses for plant growing.

The goal is to analyze the genetic composition of rhizobia obtained from nodules of wild perennial leguminous plants at different stages of their vegetation. The following methods were used: polymerase chain reaction (PCR) and its modifications (RAPD, RFLP), sequencing and analysis of nucleotide sequences.

At this stage of the work, the genetic composition of rhizobia obtained from nodules *Lotus zhegulensis* was analyzed. Nodules were collected at different stages of its growing season: in summer – at the stage of seed ripening and in autumn - at the end of the growing season, of which 75 and 55 isolates were subsequently isolated, respectively. Subsequent analysis of genetic diversity by the RAPD method using several arbitrary primers showed that all isolates are characterized by a relatively low polymorphism of the DNA sequence, while the RFLP profile of the 16S rRNA gene microorganisms isolated from autumn nodules are more heterogeneous than those obtained from summer "nodules. Determination of the phylogenetic position of the strains showed that according to the 16SrRNA and *recA* gene sequences, all the bacteria analyzed were related to microorganisms of the genus *Mesorhizobium*. In addition, the phylogeny of their symbiotic genes (sym genes) was studied: *nifH* and *nifD*, the presence of which in the bacterial genome is a prerequisite for the formation of an effective nitrogen-fixing symbiosis. Phylogenetic analysis of *nifH* and *nifD* revealed that studied microorganisms according to the sequences of these genes belong to bacteria of the genus *Mesorhizobium* as well. In the future, it is planned to isolate bacteria from nodules, which will be collected from the roots of *Lotus zhegulensis* at an early conduct their genetic analysis. Also, microsymbionts and other perennial wild bean plants obtained at various stages of their ontogenesis will be investigated.

This work was financially supported by the RFBR №17-44-020201.

## Стратегия выбора клубеньковых бактерий многолетними бобовыми растениями в зависимости от стадии их вегетации

Акимова Е.С., Коряков И.С., Баймиев Ан.Х.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

**Аннотация.** Получены данные о генетическом разнообразии и филогении клубеньковых бактерий дикорастущего многолетнего бобового растения *Lotus zhegulensis* на разных стадиях его вегетации.

**Ключевые слова:** эффективный симбиоз, многолетние бобовые растения, стадии вегетации, клубеньковые бактерии, генетическое разнообразие ризобий

Бобовые растения умеренного климата, в большей степени многолетние, в ходе своего онтогенеза проходят многократные циклы взаимодействия с клубеньковыми бактериями (ризобиями). Получение знаний об уровне специфичности при выборе симбиотических партнеров растениями на разных стадиях их вегетации является важным условием для создания высокоэффективных симбиозов для растениеводства.

Целью данного исследования стал анализ генетического состава ризобий, полученных из клубеньков дикорастущих многолетних бобовых растений на разных стадиях их вегетации. Были использованы следующие методы: полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ее модификации (RAPD, ПДРФ), секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей.

На данном этапе работы был проведен анализ генетического состава ризобий, полученных из клубеньков лядвенца жигулевского (*Lotus zhegulensis*). Клубеньки были собраны на разных стадиях его вегетации: летом – на этапе созревания семян и осенью – в конце вегетации, из которых в дальнейшем было выделено 75 и 55 изолятов соответственно. Последующий анализ генетического разнообразия методом RAPD с использованием нескольких произвольных праймеров показал, что все изоляты отличаются относительно низким полиморфизмом последовательности ДНК, в то время как по ПДРФ-профилю гена 16S рРНК микроорганизмы, выделенные из «осенних» клубеньков более разнородны, чем таковые, полученные из «летних» клубеньков. Определение филогенетического положения штаммов показало, что по последовательностям генов 16SpРНК и *recA*, все анализируемые бактерии, являются родственными с микроорганизмами рода *Mesorhizobium*. Кроме того, была изучена филогения их симбиотических генов (*sym*-генов): *nifH* и *nifD*, наличие которых в геноме бактерий является обязательным условием для формирования эффективного азотфиксирующего симбиоза. Филогенетический анализ *nifH* и *nifD* выявил принадлежность исследуемых микроорганизмов по последовательностям данных генов также к бактериям рода *Mesorhizobium*. В дальнейшем планируется выделить бактерии из клубеньков, которые будут собраны с корней лядвенца жигулевского на ранней стадии его вегетации (весной), и также провести их генетический анализ. Также будут исследованы микросимбионты и других многолетних дикорастущих бобовых растений, полученные в различные стадии их онтогенеза. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ р\_а №17-44-020201.

**The influence of growth stage on the structure and formation of fungal microbiota in potato root**Akosah Y.A.<sup>1</sup>, Pudova D.S.<sup>1</sup>, Vologin S.G.<sup>2</sup>, Mardanova A.M.<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute of fundamental medicine and biology of KFU, Kazan, Russia; <sup>2</sup>Tatar Research Institute of Agriculture, Kazan, Russia

E-mail: akosah2005@gmail.com

**Key message.** In the potato root, *Fusarium* populations greatly increase during the flowering stage of growth. At senescence, a decrease in their share and a significant surge in *Monographella* spp. is observed.

**Keywords:** fungal microbiome, potato, growth stage, metagenomic analysis

The spread of fungal-related diseases in potato plants, including *Fusarium* wilt is an urgent problem for the Mid-Volga region of Russia. The aim of the study was to characterize the formation and change of the fungal microbiota of potato roots at different stages of vegetation. Potato plants of the Zhukovskij rannij cultivar were grown on alfisol and soil probes of the soil (SL), rhizosphere (RS) and rhizoplane (RP) were sampled during different vegetation periods: flowering (FP) and senescence (PS). Total DNA was isolated using the commercial FastDNA® SPIN Kit for Soil according to the manufacturer's protocol and amplicons of conserved ITS regions of 5.8S rRNA genes were sequenced via high-throughput sequencing (Illumina Hi-seq). The fungal community of SL, RS, and RP was represented by 3 primary phyla: *Ascomycota*, which comprised 89.99-97.35% in the SL, 89.47-93.85% in the RS and 94.67-99.09% in the RP; *Basidiomycota*, which covered 0.88-1.88%, 2.26-4.90% and 0.25-1.42% in the SL, RS and RP respectively; as well as *Zygomycota*, the shares of which were 0.72-2.89%, 1.19-8.16% and 0.66-3.85% in the SL, RS and RP, respectively. Besides *Sordariomycetes* being dominant (43.54-89.39%) in all three compartments during both stages of growth, the population of fungal classes differed considerably compartment-wise. For instance, *Eurotiomycetes* were registered significantly in almost all SL (22.06-30.99%) and RS (11.17-12.29%) probes but substantially low in the RP (1.29-1.32%). In contrast, *Agariomycetes* were only noted in the RP but at minimal proportions (1.18-2.24%). According to the analysis of similarity by the Bree – Curtis and UniFrac metrics, the structure of the microbiota clearly clusters into microbiomes of SL and RP, with the RS microbiome occupying an intermediate position between them. Assessment of alpha diversity by Shannon's, Simpson's and Chao1 indices indicates that the diversity of species is higher in RS in comparison to SL and RP. At both stages of growth, sequences of *Penicillium* spp. were appreciably registered in the SL (FP=18.12±4.17%, PS=27.74±2.59%), moderately noted in the RS (FP=8.97±1.64%, PS=10.81±2.94), but virtually lacking in the RP (FP=0.67±0.25%, PS=0.38±0.20). On the other hand, representatives of the *Fusarium* genus were present in all tested samples; no considerable variations were noted in the SL during FP (15.54±2.19%) and PS (14.82±2.81%). However, their populations contrasted significantly in the RP and RS, having a higher representation of OTUs during the FP (RS=16.30±4.87%; RP=43.50±9.75%), in comparison with the PS probes, which remained considerably low (RS=7.42±1.52%; RP=10.33±1.88%). During the PS, the RS and RP recorded a surge in presence of *Monographella* (RS = 50.30±5.17%; RP=47.05±7.42%) and *Verticillium* (RS=9.84±2.01%; RP=14.37±5.50), which were practically nonexistent in these compartments at FP. It was concluded that flowering conditions favor an increase in the proportion of *Fusarium* in the root zone of potatoes, which, in turn, may lead to the occurrence of *Fusarium* infections in potato plants. During the senescence period, a decrease in the proportion of *Fusarium* and a surge in the proportion of *Monographella* spp. demonstrates the significance of the later in the degradation and utilization of dead plant matter. In addition, the formation of *Fusarium* communities in RP in such large proportions could be likewise tied to their important role in the biospheric cycle of nutrients and interaction with terrestrial plants (i.e., their influence on the growth and development of the host plant). In this regard, the fight against *Fusarium*, related diseases must be focused on measures aimed at the conservation of beneficial species, such as bio-control methods, crop rotation approaches and a number of other environmentally safe methods.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research [project no. 19-316-90028].

**Study of the genetic organization of the strain *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* forming a symbiosis with clover *Trifolium ambiguum***

Aksenova T.S., Onishchuk O.P., Kurchak O.N., Andronov E.E., Provorov N.A.  
All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology  
E-mail: t.aksenova@arriam.ru

**Key message.** *R. leguminosarum* bv. *trifolii* strains are characterized by narrow host specificity. We have identified a strain that forms nodules on several types of clover and studied the genetic organization of its symbiotic region.

**Keywords:** *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *T. ambiguum*, N<sub>2</sub>-fixing symbiosis

*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (*Rlt*) strains are characterized by narrow specificity to host plants and are able to form nodules only on species of the *Trifolium* genus. These rhizobia have a high specificity of interaction with different types of clover. The highest selectivity to microsymbionts is inherent to clover *T. ambiguum*, the Caucasian endemic specie. It has been shown that rhizobia, that are capable to form an effective symbiosis with *T. ambiguum*, usually do not form symbiosis with *T. repens* and *T. pratense* and vice versa (Beauregard et al. 2004). The genetic basis of this specificity is poorly understood, but it is known that in other rhizobia species, symbiotic genes, which evolution is controlled by host plants, are responsible for this function. In the present work, analyzing the collection of strains isolated from the soil of the Leningrad Region (Vyritsky District), strain 23B, which forms pinkish nodules on *T. ambiguum*, was detected in a micro-vegetation experiment using trap plants *T. repens* and *T. pratense*. Like the other studied strains, this strain formed pink nodules on the widespread types of clover - *T. repens*, *T. pratense*, *T. hybridum*. Total DNA was isolated from five *Rlt* strains and genome-wide sequencing (Oxford Nanopore) was performed. It was revealed that the size of the entire symbiotic cluster located on *Sym*-plasmids and including the *nodXONMLEFDABCIIJ*, *nifBA*, *fixXCBA*, *nifHDKEN*, and *fixNOQPGHIS* operons, is 72643±643 bp for the strains incapable of symbiosis with *T. ambiguum*, meanwhile as in strain 23B, capable of forming nodules on *T. ambiguum*, the size of the symbiotic cluster was 29016 bp. According to preliminary data, this difference is associated with reduced (almost three times) intergenic distances in the symbiotic region of strain 23B. The data obtained allow us to begin to identify genetic factors that determine the specificity of clover rhizobia in relation to *Trifolium ambiguum*. The equipment of the Center for Genomics, Proteomics and Cell Biology, ARRIAM was used. Supported by the Russian Science Foundation, grant 19-16-00081.

**Изучение генетической организации штамма *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, образующего симбиоз с клевером *Trifolium ambiguum***

Аксенова Т.С., Онищук О.П., Курчак О.Н., Андронов Е.Е., Проворов Н.А.  
ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Ризобии вида *R. leguminosarum* bv. *trifolii* характеризуются узкой хозяйской специфичностью. Нами выявлен штамм, образующий клубеньки на *Trifolium ambiguum* и изучена генетическая организация его симбиотического региона.

**Ключевые слова:** *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *T. ambiguum*, хозяйская специфичность, азотофиксирующий симбиоз

Штаммы *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* характеризуются узкой специфичностью по отношению к растениям-хозяевам и способны формировать клубеньки только на видах рода *Trifolium*. Для этих ризобий характерна высокая специфичность взаимодействия с разными видами клевера. Наибольшей избирательностью по отношению к микросимбионтам характеризуется клевер *T. ambiguum*, который является эндемиком Кавказа. Было показано, что ризобии, способные формировать эффективный симбиоз с *T. ambiguum*, обычно не образуют симбиоза с *T. repens* и *T. pratense* и наоборот (Beauregard et al. 2004). Генетические основы такой специфичности мало изучены, но известно, что у других видов ризобий за эту функцию отвечают симбиотические гены, эволюция которых контролируется растениями-хозяевами. В настоящей работе анализируя коллекцию штаммов, выделенных из почвы Ленинградской области (Вырицкий район), в микровегетационном опыте с использованием растений-ловушек *T. repens* и *T. pratense* был выявлен штамм 23В, образующий розоватые клубеньки на *T. ambiguum*. Этот штамм формировал, как и другие изученные штаммы, розовые клубеньки на широко распространенных видах клевера - *T. repens*, *T. pratense*, *T. hybridum*. Из пяти штаммов *Rlt* была выделена тотальная ДНК и проведено полногеномное секвенирование (Oxford Nanopore). Выявлено, что размер всего симбиотического кластера, находящегося на *Sym*-плазмидах и включающего опероны *nodXONMLEFDABCIIJ*, *nifBA*, *fixXCBA*, *nifHDKEN* и *fixNOQPGHIS*, составляет у штаммов, не способных к симбиозу с *T. ambiguum*, 72643±643 п.о., в то время как у штамма 23В, способного формировать клубеньки на *T. ambiguum*, размер симбиотического кластера составил 29016 п.о. Согласно предварительным данным, это различие связано с уменьшенными (почти в три раза) межгенными расстояниями в симбиотическом регионе у штамма 23В. Полученные данные позволяют приступить к выявлению генетических факторов, определяющих специфичность ризобий клевера по отношению к *Trifolium ambiguum*.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Геномики, протеомики и клеточной биологии» ВНИИСХМ, при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00839 и РНФ, грант 19-16-00081.

### **Petchoa in vitro culture**

Alatortseva T. A.

Saratov State University, Saratov, Russia

E-mail: alatortsevata@mail.ru

**Key message.** The possibility of *Petchoa* hybrid *Beautical Caramel Yellow* in vitro propagation was investigated. The optimal concentration of phytohormones for regeneration has been established.

**Keywords:** *petchoa*, leaf explants, in vitro, regeneration

In decorative floriculture, along with *Petunia* and *Calibrachoa*, their intergeneric hybrid - × *Petchoa* G. Boker & J.M.H. (*Petunia* Juss. × *Calibrachoa* Cerv. Ex La Llave & Lex) is becoming popular [1]. *Petchoa* combines the best qualities of parents: large flowers and fast growth from *Petunia*, unique flowers color, small leaves without stickiness like *Calibrachoa*. Commercial and scientific interests in the intergeneric hybrid require its mass reproduction. *Petchoa* is an allopolyploid with the number of chromosomes  $3n = 25$ . One chromosome set was obtained from *Petunia*,  $2n = 14$ , and two sets from *Calibrachoa*,  $4n = 36$  [2]. Genome imbalance and cytoplasmic male sterility inherited from *Calibrachoa* [3] prevent seed propagation of the hybrid. The method of clonal micropropagation allows to overcome difficulties. The purpose of the experiment is to evaluate the regeneration potential of *petchoa* during in vitro cultivation. Fragments of *Petchoa* hybrid *Beautical Caramel Yellow* leaves were explanted. The nutrient medium included MS mineral salts, vitamins, sucrose, and IAA and BAP in various combinations. There were 6 variants. Positive reaction of explants to cultivation conditions was revealed. There were: callusogenesis (morphogenic and non-morphogenic), hemmogenesis and regenerant development. The intensity and type of morphogenetic processes depended on the concentrations of IAA and BAP. The maximum amount of regenerants is observed on nutrient medium with IAA – 2.0 mg/l and BAP – 4 mg/l. The results suggest that *Petchoa* Hybrid *Beautical Caramel Yellow* can be a promising object for in vitro propagation.

### **Культура in vitro петхоа**

Алаторцева Т.А.

ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.

Чернышевского», Саратов, Россия

**Аннотация.** Исследована возможность размножения *Petchoa* hybrid *Beautical Caramel Yellow* культуре in vitro. Установлена оптимальная для регенерации концентрация фитогормонов.

**Ключевые слова:** петхоа, листовые экспланты, in vitro, регенерация

В декоративном цветоводстве, наряду с петунией и калибрахоа, становится популярным их межродовой гибрид – Петхоа × *Petchoa* G. Boker & J.M.H. (*Petunia* Juss. × *Calibrachoa* Cerv. ex La Llave & Lex) [1]. В петхоа сочетаются лучшие качества родителей: крупные цветки и быстрый рост от петунии, уникальная окраска цветков, мелкие листья без липкости как у калибрахоа. Коммерческий и научные интересы к межродовому гибриду требуют его массового воспроизводства. Петхоа – аллополиплоид с числом хромосом  $3n=25$ . Один хромосомный набор получен от петунии,  $2n=14$  и два набора – от калибрахоа,  $4n=36$  [2]. Несбалансированность генома и цитоплазматическая мужская стерильность, унаследованная от калибрахоа [3], препятствуют семенному размножению гибрида. Преодолеть трудности позволяет метод клонального микроразмножения. Цель настоящей работы – оценить регенерационный потенциал петхоа при культивировании in vitro. Эксплантировали фрагменты листьев *Petchoa* hybrid *Beautical Caramel Yellow*. Питательная среда включала минеральные соли MS, витамины, сахарозу, а также ИУК и БАП в различных комбинациях. Всего 6 вариантов. Выявлена позитивная реакция эксплантов на условия культивирования. Имели место: каллусогенез (морфогенный и неморфогенный), геммогенез и развитие регенерантов. Интенсивность и типы морфогенетических процессов зависели от концентраций ИУК и БАП. Максимальное количество регенерантов отмечено на питательной среде с ИУК – 2,0 мг/л и БАП – 4 мг/л. Результаты позволяют заключить, что *Petchoa* hybrid *Beautical Caramel Yellow* может быть перспективным объектом для воспроизводства в условиях in vitro.

1. Shaw, J.M.H. A new hybrid genus for *Calibrachoa* × *Petunia* (Solanaceae) / J.M.H. Shaw // *Hanburyana*. - 2007. - Vol. 2. - P. 50–51.

2. Jędrzejuka, A. Characterization of interspecific hybrids of *Petunia* and *Calibrachoa* by multiplex PCR, DNA content, and chromosome number / A. Jędrzejuka, L. Meyerb, M. Serek // *J. Hortic. Sci. Biotech.* – 2017. – Vol. 92, - No.5. – P. 493-501.

3. Colombo, N. A novel source of cytoplasmic male sterility in *Calibrachoa pubescens* / N.Colombo, A.Coviella, J. C Hagiwara // *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*. 2017. - Vol. 23. - No. 3. - P. 311-318.

## Characteristics of epiphytic microorganisms of wheat plants antagonists of phytopathogenic fungi

Aldosari M.D., Ksenofontova O.Y.

Saratov national research state University named after N. G. Chernyshevsky, Saratov, Russia

E-mail: ksenofontova64@mail.ru

**Key message.** Epiphytic microbiological complex of the surface of spring wheat plants of the Saratov 70 variety was studied. Among of the selected epiphyte cultures, strains of fungicide producers were screened for the genera *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*.

**Keywords:** Epiphytic microorganisms, antagonists, phytopathogenic fungi, *Bacillus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*

Epiphytic microflora of plants plays an important role in the life of plants, namely, it provides protection of plants from pathogens [1]. In nowadays, the damage to agricultural plants by phytopathogenic microorganisms is estimated at 12%. It was found that the most of the plant pathogens are fungi [2]. Chemical protection of plants from phytopathogens still occupies a leading place in the arsenal of control measures. However, it is not environmentally safe and must be combined with biological means of protection. The use of various biological preparations for the control of phytopathogens is one of the promising methods of biological protection of plants from mycoses [3]. As biological control measures against phytopathogenic fungi, the most practical interest is represented by antagonistic microorganisms, the search for which is advisable to conduct among the microbial population of plants.

All of the above has determined the purpose of our research to study the antagonistic activity of wheat plant phylloplan microorganisms in relation to phytopathogenic fungi. Our experiments were aimed at studying the epiphytic microbiological complex of the surface of spring wheat plants of the Saratov 70 variety. The composition of epiphytic microflora was studied at various stages of plant development: germination, tillering, earing and maturation. Among the selected epiphyte cultures, strains of fungicide producers were screened for the genera *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*.

Methods. For the work, a pilot site was selected in the fields of the research in Agricultural Research Institute of South-East Region in Saratov, where all the studied plants were kept in identical conditions. Sampling for the study of microorganisms of phylloplanes was carried out by the method of imprinting the upper and lower leaf blade. For research, 30 plants were selected at a certain stage of development. Cultivation of microorganisms was carried out at 28±2°C for 2-5 days on a potato medium and potato-dextrose agar. Isolated cultures of bacteria and fungi were identified using standard methods. The antagonism was determined using agar blocks on potato-dextrose agar.

Results. The analysis of the obtained results allowed us to establish that the most common bacteria were microorganisms of the genera *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Kurthia*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Escherichia*. The dependence of the number of microorganisms of the phase of wheat development was revealed. The largest number of epiphytic bacteria were isolated during the tillering and stemming phases. The most effective producers of fungicidal substances among epiphytes were bacteria of the genus *Bacillus*, which intensively suppressed the growth of fungi of the genera *Alternaria* and *Aspergillus*.

1. Selikhova A. A. Epiphytic microflora of plants as a specific factor of plant immunity. // Young scientist, 2019. No. 51 (289). P. 280–282.
2. Sanin S. S., Ibragimov, T. Z., Strizhekozin Y. A. Method of calculation of losses of the wheat crop from diseases // Protection and quarantine of plants. 2018 (1). P. 11–15.
3. Azizbekyan R. R. Biological preparations for the protection of agricultural plants // Biotechnology. 2018. 34 (5). P. 37–47.



**Recombinant *Bacillus subtilis* strain deficient in production of surfactin loses ability to induce resistance of wheat plants against aphid *Schizaphis graminum* (Rond.)**

Alekseev V.Yu., Veselova S.V., Blagova D.K., Sarvarova E.R., Burkhanova G.F., Rumyantsev S.D., Kasimova A.R., Maksimov I.V.

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia  
E-mail: valentin-1994@yandex.ru

**Key message.** An important role of surfactin synthesis by endophytic bacteria in protecting wheat against cereal aphids has been shown to manifest itself in a direct insecticidal effect and an indirect effect through the induction of systemic resistance in plants.

**Keywords:** *Bacillus subtilis* 26D, surfactin, *Schizaphis graminum*, insecticidal activity, induced systemic resistance

The application of biological agents based on bacteria of the genus *Bacillus* is an effective way to increase the resistance of crops to aphids. Many members of the genus *Bacillus* can effectively inhibit the development of pests on plants due to various mechanisms, including the synthesis of peptide antibiotic substances – lipopeptides, which are involved in the relationship of bacteria with plants, phytopathogens, and pests. The aim of the research was to study the role of surfactin in protecting plants from cereal aphids. We used the bacterial strain *Bacillus subtilis* 26D, synthesizing surfactin and the recombinant line *B. subtilis* 26D*sfp*<sup>-</sup>, deficient in surfactin synthesis with knockout of the gene for surfactin synthetase (*sfp*). We used methods for assessing pest survival and plant response to insect damage, real-time PCR, spectrophotometric methods for determining the concentration of reactive oxygen species (ROS) and the activity of pro / antioxidant enzymes. Unlike *B. subtilis* 26D, the recombinant line of *B. subtilis* 26D*sfp*<sup>-</sup> did not directly insecticidal effect on the greenbug aphid *S. graminum*. In addition, *B. subtilis* 26D indirectly influenced the mortality of greenbug aphid fed on wheat plants treated with this strain. This strain increased pest mortality by a factor of three compared to untreated plants. Treatment of plants with the recombinant line *B. subtilis* 26D*sfp*<sup>-</sup> did not affect mortality of greenbug aphids. With indirect (through the plant) effect on greenbug aphid *B. subtilis* 26D strain synthesizing surfactin increased the tolerance of wheat plants, and also induced systemic resistance, which was manifested in the accumulation of ROS, increased peroxidase activity and the accumulation of genes transcripts encoding protective proteins are markers of systemic resistance (PR-1, PR-2, PR-3, PR-6, PR-9 - pathogenesis-related protein). Treatment of plants with the recombinant line *B. subtilis* 26D*sfp*<sup>-</sup> did not increase the tolerance of plants and did not lead to the induction of systemic resistance, which was appeared in a decrease in the content of ROS and the absence of accumulation of transcripts of genes encoding protective proteins.

This work was supported by State Project no. 0246-2018-0035 and the RFBR project no. 17-29-08014.

**Рекомбинантный штамм *Bacillus subtilis* дефицитный по продукции сурфактина теряет способность индуцировать устойчивость растений пшеницы к злаковой тле *Schizaphis graminum* (Rond.)**

Алексеев В.Ю., Веселова С.В., Благова Д.К., Сарварова Е.Р., Бурханова Г.Ф., Румянцев С.Д., Касимова А.Р., Максимов И.В.

Институт биохимии и генетики ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

**Аннотация.** Показана важная роль синтеза эндофитными бактериями сурфактина в защите пшеницы от злаковой тли, проявляющаяся в прямом инсектицидном эффекте и опосредованном эффекте через индукцию системной устойчивости в растениях.

**Ключевые слова:** *Bacillus subtilis* 26D, сурфактин, *Schizaphis graminum*, инсектицидность, системная индуцированная устойчивость

Эффективным способом повышения устойчивости зерновых культур к тлям является применение биологических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus*. Многие представители рода *Bacillus* могут эффективно сдерживать развитие вредителей на растениях за счет различных механизмов, в том числе за счет синтеза антибиотических веществ пептидной природы – липопептидов, вовлекающихся во взаимоотношения бактерий с растениями, фитопатогенами и насекомыми-вредителями. Цель работы состояла в изучении роли сурфактина в защите растений от злаковых тлей. В работе были использованы бактериальный штамм *Bacillus subtilis* 26D, синтезирующий сурфактин и рекомбинантная линия *B. subtilis* 26D*sfp*<sup>-</sup>, дефицитная по синтезу сурфактина с подавленной активностью экспрессии гена сурфактинсинтазы (*sfp*). В работе использованы методы оценки выживаемости вредителя и ответа растения на повреждение насекомыми, ПЦР в режиме реального времени, спектрофотометрические методы определения концентрации активных форм кислорода (АФК) и активности про-/антиоксидантных ферментов. В отличие от *B. subtilis* 26D, рекомбинантная линия *B. subtilis* 26D*sfp*<sup>-</sup> не оказывала прямого инсектицидного эффекта на злаковую тлю *S. graminum*. Кроме того, *B. subtilis* 26D опосредованно влиял на смертность злаковой тли, кормившейся на обработанных данным штаммом растениях пшеницы, увеличивая смертность вредителя в три раза по сравнению с необработанными растениями. Обработка растений рекомбинантной линией *B. subtilis* 26D*sfp*<sup>-</sup> не влияла на смертность злаковой тли. При опосредованном через растение воздействии штамм *B. subtilis* 26D синтезирующий сурфактин повышал выносливость растений пшеницы, а также индуцировал системную устойчивость, что проявлялось в накоплении АФК, повышении активности пероксидазы и накоплении транскриптов генов, кодирующих защитные белки маркеры системной устойчивости (PR-1, PR-2, PR-3, PR-6, PR-9). Обработка растений рекомбинантной линией *B. subtilis* 26D*sfp*<sup>-</sup> не повышала выносливость растений и не приводила к индукции системной устойчивости, что проявлялось в снижении содержания АФК и отсутствии накопления транскриптов генов, кодирующих защитные белки. Работа выполнена в рамках госзадания № 0246-2018-0035 и при финансовой поддержке РФФИ № 17-29-08014.

### Growth-promoting activity of endophytic bacteria of the genus *Bacillus*

Alekseev V.Yu., Veselova S.V., Sarvarova E.R., Maksimov I.V.

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: valentin-1994@yandex.ru

**Key message.** Growth-promoting concentrations of the genus *Bacillus* new isolates and mixtures of endophytic strains of *Bacillus subtilis* were selected. Isolates *B. subtilis* Stl7 and Ttl2 are promising for the creation of biocontrol agents.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, plant growth promoting bacteria, biocontrol agents

Recently, the increasing attention of scientists has been focused on biocontrol agents based on plant growth promoting bacteria (PGPB). Endophytic bacteria that live mutualistically in plant tissues are particularly interesting. To establish the effectiveness of a future biocontrol agents based on PGPB in laboratory conditions, a method is used to determine intergrowth energy, seed germination and increment of raw and dry biomass using higher plants as a test object (GOST 12038-84). The aim of the work was to select growth-promoting concentrations of the genus *Bacillus* new isolates and mixtures of endophytic strains of *Bacillus subtilis*. Two strains (*B. subtilis* 26D, *B. subtilis* 11VM) and 2 isolates (*B. subtilis* Stl7 and Ttl2) were selected for experiments. The *B. subtilis* Stl7 isolate was isolated from the internal tissues of potato leaves. *B. subtilis* Ttl2 isolate was isolated from the internal leaf tissues of wild wheat *Triticum timopheevii* Zhuk. Growth-promoting activity of endophytic bacteria was tested on seeds of soft spring wheat *T. aestivum* L. of two varieties - Ekada 113, Salavat Yulaev. In our work, growth-stimulating concentrations of bacterial suspensions were selected: 2 µl per 1G of seeds for *B. subtilis* 26D and 1 µl per 1G of seeds for *B. subtilis* 11VM, *B. subtilis* Stl7, *B. subtilis* Ttl2. Ratio with a growth-promoting effect for the mixture of strains *B. subtilis* 26D and *B. subtilis* 11VM (26D+11VM) was selected. The treatment of seeds with bacterial suspensions increased germination by approximately 8.5 - 23% of the control level; the strain *B. subtilis* 26D had the greatest effect. At the same time, a mixture of 26D+11VM strains increased seed germination by 14%. The increment of raw and dry biomass of seedlings when treated with bacteria increased by 18-27% of the control level, the greatest effect was exerted by the *B. subtilis* Ttl2 isolate. At the same time, treatment with a mixture of 26D+11VM strains increased the raw and dry weight of seedlings by 18 and 23%, respectively. Thus, *B. subtilis* Stl7 and Ttl2 isolates and a mixture of 26D+11VM strains are promising prototypes for creating effective biocontrol agents.

The work was supported by RFBR no. 17-29-08014.

### Рост-стимулирующая активность эндофитных бактерий рода *Bacillus*

Алексеев В.Ю., Веселова С.В., Сарварова Е.Р., Максимов И.В.

Институт биохимии и генетики ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

**Аннотация.** Произведен подбор рост-стимулирующих концентраций новых изолятов рода *Bacillus* и эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* и их смесей. Показана перспективность изолятов *B. subtilis* Stl7 и Ttl2 для создания биопрепаратов.

**Ключевые слова:** *Bacillus subtilis*, стимулирующие рост растений бактерии, биопрепараты

В последнее время все большее внимание ученых приковано к созданию биопрепаратов, основу которых составляют стимулирующие рост растений бактерии (СРРБ) обладающие свойством эндофитности, т.е. способные мутуалистически жить внутри растительных тканей. Для установления эффективности будущего биопрепарата на основе СРРБ в лабораторных условиях используют методику определения энергии прорастания, всхожести семян и прироста сырой и сухой биомассы с использованием в качестве тест-объекта высших растений (ГОСТ 12038-84). Цель работы состояла в подборе рост-стимулирующих концентраций новых изолятов рода *Bacillus* и известных эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* и их смесей. Для экспериментов были отобраны 2 штамма (*B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ) и 2 изолята (*B. subtilis* Stl7 и Ttl2). Изолят *B. subtilis* Stl7 был выделен из внутренних тканей листьев картофеля. Изолят *B. subtilis* Ttl2 был выделен из внутренних тканей листьев дикой пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk. Рост-стимулирующая активность эндофитных бактерий проверялась на семенах мягкой яровой пшеницы *T. aestivum* L. двух сортов – Экада 113, Салават Юлаев. В нашей работе были подобраны рост-стимулирующие концентрации бактериальных суспензий: 2 мкл на 1г семян для *B. subtilis* 26Д и 1 мкл на 1г семян для *B. subtilis* 11ВМ, *B. subtilis* Stl7, *B. subtilis* Ttl2. Для смеси штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ (26Д+11ВМ) было подобрано соотношение с рост-стимулирующим эффектом. Обработка семян бактериальными суспензиями повышала всхожесть примерно на 8.5 – 23% от уровня контроля, наибольший эффект оказал штамм *B. subtilis* 26Д. При этом смесь штаммов 26Д+11ВМ повышала всхожесть семян на 14%. Прирост сырой и сухой биомассы проростков при обработке бактериями увеличивался на 18 – 27% от уровня контроля, наибольший эффект оказал изолят *B. subtilis* Ttl2. При этом обработка смесью штаммов 26Д+11ВМ повышала сырую и сухую массу проростков на 18 и 23%, соответственно. Таким образом, изоляты *B. subtilis* Stl7 и Ttl2 и смесь штаммов 26Д+11ВМ являются перспективными прототипами для создания эффективных биопрепаратов. Работа выполнена в рамках РФФИ № 17-29-08014.

**Influence of *Azospirillum* lectins on a stress-dependent change in the content of low-molecular antioxidants in plants**

Alen'kina S.A., Nikitina V.E.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

E-mail: alenkina\_s@ibppm.ru

**Key message.** It was shown that the lectins *Azospirillum brasilense* Sp7 (epiphyte) and Sp245 (endophyte) with different efficacy changed the content of ascorbate and glutathione in the initial period of exposure to CuSO<sub>4</sub>, CoSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> on the wheat seedling roots.

**Keywords:** rhizosphere, *Azospirillum* lectins, wheat roots, low-molecular-weight antioxidants, abiotic stresses

*Azospirillum brasilense* is a plant-growth-promoting bacterium. *Azospirillum* colonizes both root surface and inner tissue: *A. brasilense* Sp245 was found in the root xylem, whereas *A. brasilense* Sp7 was found on the root surface. Endophytic bacteria are of particular interest, because they can live mutualistically inside plant tissue. The surface lectins of *A. brasilense* Sp7 (epiphyte) and Sp245 (endophyte) can bind specific carbohydrates, and they ensure the adhesion of the bacteria to the root surface.

We investigated possible effects of the Sp7 and Sp245 lectins on the content of low-molecular-weight antioxidants - ascorbate and glutathione in roots of 4-day-old wheat seedlings. The roots were exposed to salts of heavy metals – CuSO<sub>4</sub>, CoSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>. Spectrophotometry was used to determine the content of ascorbate and glutathione in wheat seedling roots.

Combined effect of the lectins and the heavy metal salts also increased the root content of ascorbate and glutathione. With the Sp7 lectin, the highest increase in the presence of CoSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, and CuSO<sub>4</sub> was observed after 60 min of incubation; the effective lectin concentrations were 20 µg ml<sup>-1</sup> with CoSO<sub>4</sub>. Combined effect of the lectins and the heavy metal salts increased the root content of ascorbate and glutathione. and ZnSO<sub>4</sub> and 10 µg ml<sup>-1</sup> with CuSO<sub>4</sub>. The highest effect, however, was obtained with Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> and 10 µg ml<sup>-1</sup> of the Sp7 lectin; the incubation time was 30 min. The content of ascorbate increased by 150%, and that of glutathione increased by 200%. With the Sp245 lectin, the picture was the same but in the presence of Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, the effect was maximal at 5 µg ml<sup>-1</sup> of the Sp245 lectin after 30 min of incubation. The content of ascorbate increased by 210%, and that of glutathione increased by 250%. With both lectins, the direction of changes in the content of the antioxidants was the same in all cases; yet, the lectins had different levels of activity. These differences may have been caused by the different structures and carbohydrate specificities of the lectins, resulting in differences in the interaction with the plant cell surface, which are of deciding importance for the “switch on” of the subsequent stages.

The *Azospirillum* lectins are involved in adaptational changes in wheat seedling roots, and this involvement promotes the normal course of metabolism and ensures regulation of the plant–*Azospirillum* interaction in a wider range of soil and climatic factors. The range of effects of *Azospirillum* lectins on host plant metabolism is wider than previously thought. Together with the already existing evidence, our present data permit correction of the current views about the mechanisms that govern associative plant–bacterium interactions.

**Участие лектинов азоспирилл в стресс-зависимом изменении количества низкомолекулярных антиоксидантов в растениях**

Аленькина С.А., Никитина В.Е.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук Саратов, Россия

**Аннотация.** Показано, что лектины *Azospirillum brasilense* Sp7 (эпифит) и Sp245 (эндифит) с различной эффективностью изменяли содержание аскорбата и глутатиона в начальный период воздействия CuSO<sub>4</sub>, CoSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> на корни проростков пшеницы.

**Ключевые слова:** ризосфера, лектины азоспирилл, корни пшеницы, низкомолекулярные антиоксиданты, абиотические стрессы

*Azospirillum brasilense* – это бактерии, способствующие росту растений. Азоспириллы колонизируют как поверхность корня, так и внутренние ткани. Штамм *A. brasilense* Sp245 был найден в силеме корня, в тоже время штамм *A. brasilense* Sp7 был обнаружен на поверхности корня. Эндифитные бактерии представляют особый интерес, поскольку они способны мутуалистически жить внутри растительных тканей. Поверхностные лектины *A. brasilense* Sp7 (эпифит) и Sp245 (эндифит) могут связывать специфические углеводы и обеспечивать адгезию бактерий к поверхности корня.

Мы исследовали возможное влияние лектинов Sp7 и Sp245 на содержание низкомолекулярных антиоксидантов - аскорбата и глутатиона в корнях 4-дневных проростков пшеницы при воздействии солей тяжелых металлов - CuSO<sub>4</sub>, CoSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>.

Для определения содержания аскорбата и глутатиона в корнях проростков пшеницы использовались спектрофотометрические методы.

Совместное действие лектинов и солей тяжелых металлов увеличило содержание аскорбата и глутатиона в корнях. В случае лектина Sp7 наибольшее увеличение наблюдалось в присутствии CoSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> и CuSO<sub>4</sub> после 60 мин инкубацию. Эффективные концентрации лектина составляли 20 мкг/мл - в случае с CoSO<sub>4</sub> и ZnSO<sub>4</sub> и 10 мкг/мл – в случае с CuSO<sub>4</sub>. Наибольший эффект, однако, был получен в варианте с Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> и концентрации лектина 10 мкг/мл; время инкубации составляло 30 мин. Содержание аскорбата увеличилось на 150%, а глутатиона - на 200%. С лектином Sp245 картина была такой же, но в присутствии Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> эффект был максимальным при концентрации лектина 5 мкг/мл после 30 мин инкубации. Содержание аскорбата увеличилось на 210%, а глутатиона – на 250%. С обоими лектинами направление изменений содержания антиоксидантов было одинаковым во всех случаях, тем не менее, лектины проявляли разные уровни активности. Эти различия могут быть вызваны различной структурой и углеводной специфичностью лектинов, что приводит к различиям во взаимодействии с поверхностью растительных клеток, которые имеют решающее значение для «включения» последующих стадий.

Результаты настоящей работы свидетельствуют об участии лектинов азоспирилл в адаптационных реакциях в корнях проростков пшеницы, что обеспечивает нормальный ход метаболических процессов и регуляцию взаимодействия растений с азоспириллами при абиотических воздействиях. Важным является то, что лектины способны проявлять ростстимулирующий и защитный эффекты в низких концентрациях, то есть в экологически безопасных дозах. Спектр воздействия лектинов *Azospirillum* на метаболизм растений-хозяев шире, чем предполагалось ранее. Вместе с уже имеющимися данными наши нынешние данные позволяют скорректировать существующие представления о механизмах, которые управляют ассоциативными взаимодействиями растений и бактерий.

**Application of microbial preparations and plants of genus *Vaccinium* for peat-hag recovery**Aleschenkova Z.M.<sup>1</sup>, Rupasova Zh.A.<sup>2</sup>, Yakovlev A.P.<sup>2</sup>, Kartyzhova L.E.<sup>1</sup>, Antohina S.P.<sup>2</sup><sup>1</sup>Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus; <sup>2</sup>Central Botanic Gardens, NAS of Belarus, Minsk, Belarus

E-mail: aleschenkova@mbio.bas-net.by

**Key message.** The technology was originally developed for phytoremediation of exhausted peateries with cultures of genus *Vaccinium*, like blueberry cultivars and microbial preparations PolyFunCur, MacLoR, AgroMyc, Bactopin.

**Keywords:** phytoremediation, peat-hag, microbial preparations

The areas abandoned after peat excavation are typically overgrown with bog-meadow vegetation or turn into marshland. Currently elaboration of biotechnologies for peat-hag remediation has come to the foreground as top priority challenge.

Aim. Development of peat-hag phytorecultivation technology based on introduction of berry cultures of *Vaccinium* genus e.g. blueberry varieties and microbial preparations.

Methods. Biofertilizer PolyFunCur was ploughed in the autumn soil across the total field area 1.3 ha to enrich the depleted peat deposits with extra organic matter and beneficial microbiota and thereupon in spring 3000 blueberry seedlings were planted. Microbial preparations (MacLoR, AgroMyc, Bactopin) were introduced twice per vegetation season (in May and June).

2 year application of microbial preparations in blueberry phytocenoses was found to promote alkalization of peat soil by 19% over the control (with 10% MaCloR solution) and by 24% (50% MaCloR solution), build-up of ammonium nitrogen levels from 44,3 mg/kg to 52,2 mg/kg soil, of phosphorus from 57,0 mg/kg to 117,2 mg/kg soil, of potassium from 134,5 mg/kg to 194,7 mg/kg soil with concomitant reduction of nitrate nitrogen concentration from 70,1% to 67,7%, biogenic potential of soil to  $3,1 \times 10^{10}$  CFU/g, restructuring of major ecological-trophical groups in peat-hag microbiocenoses, accumulation of microbial biomass to 405 mgC/g soil. It was found that efficiency of microbial preparations exceeds the effect of mineral fertilizers by 1,1-3 times (concerning vegetating activity of blueberry seedlings), 10% MaCloR working solution ensured the highest yields of vegetating blueberry cultivars *Northcountry* and *Northblue*. The onset of the sustained fruit-bearing period by 5 years of blueberry growth was accompanied by the increased beneficial impact of microbial fertilizers on productivity of berry plantations (harvest increment totaled 17-26%) and quality (nutritional and vitamin value) of the collected produce (solids content rose by 5-21%, soluble sugars ratio by 4-20% and flavor/taste characteristics improved by 44-142% in comparison with the control).

**Использование микробных препаратов и растений рода *Vaccinium* для рекультивации выработанных торфяных месторождений**Алеценкова З.М.<sup>1</sup>, Рупасова Ж.А.<sup>2</sup>, Яковлев А.П.<sup>2</sup>, Картыжова Л.Е.<sup>1</sup>, Антохина С.П.<sup>2</sup><sup>1</sup> Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь; <sup>2</sup> Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь

**Аннотация.** Впервые разработана технология фиторемедиации выработанных торфяников на основе использования растений рода *Vaccinium* на примере сортовой голубики и микробных препаратов ПолиФунКур, МакЛоР, АгроМик и Бактопин.

**Ключевые слова:** фиторемедиация, выработанные торфяники, микробные препараты

Актуальность. После добычи торфа выработанные торфяники обычно зарастают болотно-луговой растительностью и кустарниками или подвергаются заболачиванию. Разработка технологий биологической рекультивации выработанных торфяных месторождений является актуальной задачей в настоящее время.

Цель. Разработка технологии фиторекультивации выработанных торфяников на основе использования ягодных растений рода *Vaccinium* на примере сортовой голубики и микробных препаратов.

Методы. В полевых условиях на площади 1,3 га осенью проведена запашка биоудобрения ПолиФунКур с целью обогащения выработанной торфяной залежи дополнительным органическим веществом и полезной микрофлорой, весной посажены 3000 штук саженцев голубики. Внесение микробных препаратов (МакЛоР, АгроМик, Бактопин) осуществляли дважды за сезон (в мае и июне).

Результаты. Установлено, что применение микробных препаратов в фитоценозе голубики в течение 2-х лет способствует подщелачиванию торфяной залежи по сравнению с контролем на 19% (в составе с 10% р-ром МакЛоР) и на 24% (в составе с 50% р-ром МакЛоР); дополнительному накоплению аммиачного азота от 44,3 мг/кг до 52,2 мг/кг почвы, фосфора от 57,0 мг/кг до 117,2 мг/кг, калия от 134,5 мг/кг до 194,7 мг/кг; снижению нитратного азота в почве от 67,7% до 70,1%; увеличению биогенности почвы до  $3,1 \times 10^{10}$  КОЕ/г почвы; перестройке основных эколого-трофических групп в структуре микробиоценоза торфяной залежи; накоплению микробной биомассы до 405 мг С/г почвы.

Показано, что эффективность микробных препаратов превосходит действие минеральных удобрений в 1,1-3 раза (развитие вегетативной сферы растений голубики). У сортов *Northcountry* и *Northblue* наибольшую прибавку урожайности в вегетативной сфере, обеспечивало применение 10%-ного рабочего раствора МакЛоР. При вступлении растений в устойчивый период плодоношения на 5-м году развития голубики выявлено усиление позитивного влияния микробных удобрений на продуктивность ягодных плантаций (прибавка составила 17-26%) и качество (питательной и витаминной ценности) полученной продукции (накопление сухих веществ на 5-21%, обогащение растворимыми сахарами на 4-20% и улучшение органолептических свойств на 44-142% по сравнению с контролем).



**Auxin production and agronomic significance of halotolerant bacterial communities associated with *Suaeda fruticosa* (L.)**

Ali B.

Department of Microbiology and Molecular Genetics, University of the Punjab, Lahore, Pakistan

E-mail: basharat.ali.mmg@pu.edu.pk

**Key message.** Natural plant settings of saline habitats are a good source for the isolation of beneficial salt tolerant bacteria to grow crops under saline conditions.

**Keywords:** bacterial auxin production; halotolerant bacteria; halophytes; plant growth promoting rhizobacteria; salinity stress

Halotolerant bacterial strains associated with the rhizosphere and phytosphere of *Suaeda fruticosa* (L.) growing in saline habitats were isolated to mitigate the salinity stress of *Zea mays*. 16S rRNA gene sequencing confirmed the presence of strains that belong to *Gracilibacillus*, *Staphylococcus*, *Virgibacillus*, *Salinicoccus*, *Bacillus*, *Zhihengliuella*, *Brevibacterium*, *Oceanobacillus*, *Exiguobacterium*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* and *Halomonas* genera. Strains were screened for auxin production, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase and biofilm formation. Bacterial auxin production ranged from 14 to 215  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Moreover, several bacterial isolates were also recorded positive for ACC-deaminase activity, phosphate solubilization and biofilm formation. In pot trials, bacterial strains significantly mitigated the salinity stress of *Z. mays* seedlings. For instance, at 200 and 400 mM NaCl, significant increase for shoot and root length (up to 1-fold) was recorded with *Staphylococcus jettensis* F-11. At 200 mM, *Zhihengliuella flava* F-9 (45%) and *Bacillus megaterium* F-58 (42%) witnessed significant improvements for fresh weight. For dry weight, *S. jettensis* F-11 and *S. arlettiae* F-71 recorded up to three-fold increase at 200 mM, over respective control. Results of this study suggested that natural plant settings of saline habitats are a good source for the isolation of beneficial salt tolerant bacteria to grow crops under saline conditions.



## Pathways of wheat drought stress tolerance improvement under the influence of endophytic bacteria *Bacillus subtilis*

Allagulova Ch.R., Avalbaev A.M., Lastochkina O.V.

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Center  
of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: allagulova-chulpan@rambler.ru

**Key message.** Endophytic bacteria *Bacillus subtilis*, which belongs to plant growth promoting microorganisms, are considered as an alternative to agrochemicals for increasing of wheat drought stress tolerance.

**Keywords:** PGPB, *Bacillus subtilis*, wheat, *Triticum aestivum* L., drought

Drought is one of the main factors that reduce plant growth and productivity. For yield improvement of different crops, including wheat, traditionally used agrochemicals which pose a serious threat to humans and the environment. Application of beneficial plant growth-promoting bacteria (PGPB) is bio-safe and eco-friendly alternative approach. The endophytic *Bacillus subtilis* has a particular advantage due to they are able to colonize the internal host-plant tissues and influence on their metabolism inside throughout ontogenesis, maintaining a protective potential in the post-harvest period. The positive effect of *B. subtilis* is based on their ability to influence on the state of the plant hormonal system, assimilation of mineral nutrition elements (nitrogen, phosphorus and potassium), to produce a wide range of biologically active compounds (biosurfactants, siderophores, vitamins: folic acid, biotin, thiamine, nicotinic acid, B6, B12, etc.) and hormone-like substances. IAA-synthesizing *B. subtilis* stimulated the formation and growth of roots in wheat plants, thereby enhancing the process of water absorption and nutrients uptake in conditions of water stress was found. An important contribution to *B. subtilis*-induced drought tolerance of wheat can be made through activation of antioxidant and osmoprotective defense systems, facilitating to ROS neutralization and as well as preventing cell water losing and recovering their water supply, which enhance water-holding capacity of wheat plant tissues and their drought tolerance in general.

This work was supported by RFBR (№ 19-016-00035) and the President of the Russian Federation (№ MK 643.2019.11).

## Пути повышения устойчивости растений пшеницы к засухе под влиянием эндофитных бактерий *Bacillus subtilis*

Аллагулова Ч.Р., Авальбаев А.М., Ласточкина О.В.

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа, Россия

**Аннотация.** Рассматриваются стимулирующие рост растений эндофитные бактерии *Bacillus subtilis* в качестве альтернативы агрохимикатам для повышения устойчивости пшеницы к засухе.

**Ключевые слова:** PGPB, *Bacillus subtilis*, пшеница, *Triticum aestivum* L., засуха

Одним из основных факторов, снижающих рост и продуктивность растений, является засуха. Традиционно для повышения урожайности зерновых культур, в частности пшеницы, используются агрохимикаты, представляющие серьезную угрозу для человека и окружающей среды. Альтернативным инструментом является применение полезных рост-стимулирующих бактерий (PGPB - *plant growth-promoting bacteria*). Особым преимуществом обладают эндофитные *Bacillus subtilis*, способные колонизировать ткани растений-хозяев и изнутри влиять на их метаболизм в течение всего онтогенеза, сохраняя защитный потенциал в послеуборочный период. В основе реализации положительного действия *B. subtilis* лежит их способность оказывать влияние на состояние гормональной системы растений, усвоение элементов минерального питания (азота, фосфора и калия), продуцировать широкий спектр биологически активных соединений (биосурфактантов, сидерофоров, витаминов: фолиевая кислота, биотин, тиамин, никотиновая кислота, B6, B12 и мн.др.) и веществ с гормональной активностью. Обнаружено, что ИУК-синтезирующие *B. subtilis* стимулировали процессы образования и роста корней пшеницы, усиливая тем самым процесс поглощения воды и питательных веществ в условиях водного стресса. Важный вклад в *B. subtilis*-индуцированное развитие засухоустойчивости пшеницы может вносить активация систем антиоксидантной и осмопротекторной защиты, способствующих нейтрализации АФК, а также предотвращению потери клетками воды и восстановлению их водоснабжения, что отражается в повышении водоудерживающей способности тканей растений пшеницы и их засухоустойчивости в целом.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 19-016-00035) и Президента РФ (№ МК-643.2019.11).

**Detection of bacteria in water by an acoustic slot-mode sensor**Alsworth A.K.M.<sup>1</sup>, Guliy O.I.<sup>2</sup>, Zaitsev B.D.<sup>3</sup>, Karavaeva O.A.<sup>2</sup>, Khomyakova A.A.<sup>1</sup>, Shavishvili I.Z.<sup>1</sup>, Ksenofontova O.Yu.<sup>1</sup>, Borodina I.A.<sup>3</sup><sup>1</sup>Chernyshevsky National Research State University, Saratov, Russia; <sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia; <sup>3</sup>Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia  
E-mail: alialsoewide@gmail.com

**Key message.** A method has been developed for the determination of amoxicillin in an aqueous medium using an acoustic sensor system and bacteria sensitive to a defined antibiotic. The analysis time is 15 minutes.

**Keywords:** acoustic sensor, microbial cells, amoxicillin, determination

Relevance. Antibiotics are used in medicine, veterinary medicine, the food industry for canning, for processing food products during their transportation. In this regard, the development of methods for the determination of antibiotics in water, food, wastewater of pharmaceutical enterprises and other facilities is relevant. Goal. Development of a method for determining antibiotics in aqueous solutions using a non-contact acoustic sensor. Methods. We used a sensor based on a structure consisting of two piezoelectric plates of lithium niobate with a gap between them. Interdigital transducers were applied on one side of the plate to excite and receive an acoustic wave with shear horizontal polarization. A liquid container was placed on the opposite side of the plate with some clearance, the base of which was made of a lithium niobate plate  $Z - X + 30^\circ$  cut with a thickness of 500  $\mu\text{m}$ . The gap between the bottom of the container and the surface of the piezoelectric plate was provided using strips of aluminum foil 16  $\mu\text{m}$  thick. The velocity of an acoustic wave propagating in such a structure changes with a change in the conductivity of the liquid in the container. A change in the wave velocity leads to a change in the output parameters of the sensor (peaks of resonance absorption in the frequency dependence of the insertion loss of the acoustic delay line). Using the sensor, we studied the effect of different concentrations of amoxicillin on microbial cells sensitive to the antibiotic directly in the liquid phase. To do this, the sensor was connected to the S-parameters meter E5071C (Agilent, USA) in the mode of measuring the frequency dependence of the insertion loss of the output signal of the device. Results. The effect of amoxicillin on microbial cells was studied using the probe under study. It was established that the effect of amoxicillin (from 4 to 50  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) leads to a change in the depth of the resonance peaks. A method has been developed for determining amoxicillin based on a non-contact acoustic sensor with a minimum detecting antibiotic concentration of 4  $\mu\text{g} / \text{ml}$  with an analysis time of 15 minutes. The method is based on recording changes in the depth and frequency of the resonance absorption peaks on the output signal of the sensor before and after exposure of the antibiotic to microbial cells sensitive to the studied antibiotic. Control experiments were carried out to assess the effect of the antibiotic on microbial cells using an acoustic biological sensor and seeding cells on solid nutrient media after exposure to antibiotics. A distinctive feature of the sensor used is the presence of a removable liquid cell, which makes it possible to reuse it and facilitates the process of cleaning the cell from the sample, which is an important condition when working with microorganisms. The developed method allows the analysis of amoxicillin in aqueous solutions of water in a short time.

This work was partially supported by the RFBR grant No. 19-07-00300 and 19-07-00304.

**Микробная сенсорная система для определения амоксициллина**Алсовэйд А.К.М.<sup>1</sup>, Гулий О.И.<sup>2</sup>, Зайцев Б.Д.<sup>3</sup>, Караваева О.А.<sup>2</sup>, Хомякова А.А.<sup>1</sup>, Шавишвили И.З.<sup>1</sup>, Ксенофонтова О.Ю.<sup>1</sup>, Бородин И.А.<sup>3</sup><sup>1</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов; <sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов; <sup>3</sup>Институт радиотехники и электроники им В.А. Котельникова РАН, Саратовский филиал, Саратов

**Аннотация.** Разработан способ определения амоксициллина в водной среде с помощью акустической сенсорной системы и бактерий, чувствительных к определяемому антибиотику. Время анализа составляет 15 мин.

**Ключевые слова.** Акустический датчик, микробные клетки, амоксициллин, определение

Актуальность. Антибиотики применяются в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности при консервировании, для обработки пищевых продуктов и при их транспортировке. В связи с этим актуальным является разработка методов для определения антибиотиков в воде, продуктах питания, сточных водах фармацевтических предприятий и других объектах. Цель. Развитие метода определения антибиотиков в водных растворах с помощью бесконтактного акустического датчика. Методы. В работе использовали датчик, основанный на структуре из двух пьезоэлектрических пластин ниобата лития с зазором между ними. На одной из сторон пластины были нанесены встречно-штыревые преобразователи для возбуждения и приема акустической волны с поперечно-горизонтальной поляризацией. На противоположной стороне пластины с некоторым зазором помещался жидкостный контейнер, основание которого было выполнено из пластины ниобата лития  $Z-X+30^\circ$  среза толщиной 500 мкм. Зазор между дном контейнера и поверхностью пьезопластины обеспечивался с помощью полосок алюминиевой фольги толщиной 16 мкм. Скорость акустической волны, распространяющейся в такой структуре, изменяется при изменении проводимости жидкости, находящейся в контейнере. Изменение скорости волны приводит к изменению выходных параметров датчика (пику резонансного поглощения на частотной зависимости полных потерь акустической линии задержки). При помощи датчика исследовалось воздействие различных концентраций амоксициллина на микробные клетки, чувствительные к антибиотику непосредственно в жидкой фазе. Для этого датчик подключался к измерителю S-параметров E5071C («Agilent», США) в режиме измерения частотной зависимости полных потерь выходного сигнала устройства. Результаты. Исследовано влияние амоксициллина на микробные клетки с помощью исследуемого датчика. Установлено, что воздействие амоксициллина (от 4 до 50 мкг/мл) приводит к изменению глубины резонансных пиков. Разработан способ определения амоксициллина на основе бесконтактного акустического датчика при минимальной определяющей концентрации антибиотика 4 мкг/мл при времени анализа 15 мин. Способ основан на регистрации изменений глубины и частоты пиков резонансного поглощения на выходном сигнале датчика до и после воздействия антибиотика на микробные клетки, чувствительные к исследуемому антибиотику. Проведены контрольные эксперименты по оценке воздействия антибиотика на микробные клетки с помощью акустического биологического датчика и посева клеток на плотные питательные среды после воздействия на них антибиотиков. Отличительной особенностью используемого датчика является наличие съемной жидкостной ячейки, что дает возможность ее многократного использования и облегчает процесс очистки ячейки от образца, что является важным условием при работе с микроорганизмами. Разработанный метод позволяет проводить анализ амоксициллина в водных растворах воды в краткие сроки.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ №№ 19-07-00300 и 19-07-00304.

### Study of the population dynamics of endophytic bacteria introduced into winter wheat

Ananyeva I.N., Aleschenkova Z.M., Rybaltovskaya P.V., Chindareva M.A.

Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

E-mail: ananeva@mbio.bas-net.by

**Key message.** High efficiency of introducing endophytic microbiota was demonstrated upon application of nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing bacteria for pre-sowing treatment of winter wheat seeds.

**Keywords:** endophytic bacteria, wheat, introduction

One of the main functions of endophytic microorganisms is to provide the host with nutrient elements such as nitrogen and phosphorus by converting them into easily digested forms. Endophytic bacteria are able to produce plant hormones and to provide a growth-promoting effect on plants, which is particularly important at the early stages of plant ontogenesis.

Aim. Study of the population dynamics of endophytic bacteria introduced into winter wheat.

Methods. The introduction of antibiotic-resistant strains of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing endophytic bacteria was carried out by inoculating winter wheat seeds of "Bogatka" variety. Microbiological culture of plant samples (root, stem, leaf) of winter wheat were plated on the media (Ashby and glucose-aspartic with calcium orthophosphate) containing rifampicin in concentration 0.150 ug / ml on 14 and 21 days after inoculation.

Seed inoculation is an effective method of wheat treatment with endophytic bacteria, providing high introduction capacity.

Seeds were inoculated. Under model conditions with nitrogen-fixing strain *Rahnella aquatilis* A3K (nitrogen-fixing activity in pure culture – 38 nM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> vial per day, phosphate-mobilizing activity - diameter of calcium phosphate dissolution zones – 19.5 mm, IAA synthesis – 72 ug/ml) and phosphate-mobilizing strain *Pantoea agglomerans* 6SK (phosphate-mobilizing activity - diameter of calcium phosphate dissolution zones – 17.5 mm, IAA synthesis – 133 ug/ml). The treatment resulted in accumulation of nitrogen-fixing bacteria in roots, stems and leaves of seedlings by 14 days in cell titers  $(2.360 \pm 0.147) \cdot 10^7$ ,  $(2.681 \pm 0.045) \cdot 10^8$ ,  $(7.958 \pm 0.800) \cdot 10^6$  CFU/g, respectively, and of phosphate-mobilizing bacteria –  $(3.780 \pm 0.207) \cdot 10^7$ ,  $(4.723 \pm 0.003) \cdot 10^8$ ,  $(1.336 \pm 0.201) \cdot 10^7$  CFU/g, respectively. On 21 days after inoculation, the number of endophytic nitrogen fixing species in the roots, stems, and leaves increased to  $(8.849 \pm 0.147) \cdot 10^7$ ,  $(3.920 \pm 0.040) \cdot 10^8$ ,  $(9.130 \pm 0.435) \cdot 10^6$  CFU/g respectively. The cell titer of phosphate-mobilizers by 21 days constituted  $(1.055 \pm 0.068) \cdot 10^8$ ,  $(2.240 \pm 0.120) \cdot 10^8$ ,  $(5.609 \pm 0.217) \cdot 10^6$  CFU/g, respectively.

In model experiments, the high efficiency of using seed treatment for the introduction of endophytes was established.

### Изучение динамики численности интродуцированных эндофитных бактерий озимой пшеницы

Ананьева И.Н., Алещенко З.М., Рыбалтовская П.В., Чиндарева М.А.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**Аннотация.** На основании результатов использования азотфиксирующих и фосфатсольбилизирующих эндофитных бактерий для обработки семян озимой пшеницы установлена высокая эффективность данного способа интродукции эндофитов.

**Ключевые слова:** эндофитные бактерии, пшеница, интродукция

Одной из основных функций эндофитных микроорганизмов является обеспечение хозяина питательными элементами, такими как азот и фосфор, путем перевода их в легкоусвояемые формы. Эндофитные бактерии способны продуцировать растительные гормоны и оказывать ростстимулирующий эффект на растение, что особенно важно на ранних стадиях онтогенеза растений.

Цель. Изучить динамику численности интродуцированных эндофитных бактерий озимой пшеницы.

Методы. Интродукцию антибиотикорезистентных штаммов азотфиксирующих и фосфатсольбилизирующих эндофитных бактерий осуществляли методом инокуляции семян озимой пшеницы сорта «Богатка». Микробиологический посев растительных образцов (корень, стебель, лист) озимой пшеницы на среды (Эшби и глюкозо-аспарагиновую с орто-фосфатом кальция) с рифампицином в концентрации 150 мкг/мл проводили через 14 и 21 сутки после инокуляции.

Эффективным способом обработки эндофитными бактериями растений пшеницы, обеспечивающим высокую интродуцирующую способность, является инокуляция семян. В модельных условиях обработку семян проводили азотфиксирующим штаммом *Rahnella aquatilis* A3K (азотфиксирующая активность в чистой культуре – 38 нМ C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> фл./сут, фосфатмобилизующая активность – диаметр зон растворения фосфатов кальция – 19,5 мм, синтез ИУК – 72 мкг/мл) и фосфатсольбилизирующим штаммом *Pantoea agglomerans* 6SK (фосфатмобилизующая активность – диаметр зон растворения фосфата кальция – 17,5 мм, синтез ИУК – 133 мкг/мл) обеспечивает накопление азотфиксирующих бактерий в корне, стебле и листьях проростков через 14 дней в количестве  $(2,360 \pm 0,147) \cdot 10^7$ ,  $(2,681 \pm 0,045) \cdot 10^8$ ,  $(7,958 \pm 0,800) \cdot 10^6$  КОЕ/г, соответственно, а фосфатмобилизующих бактерий –  $(3,780 \pm 0,207) \cdot 10^7$ ,  $(4,723 \pm 0,003) \cdot 10^8$ ,  $(1,336 \pm 0,201) \cdot 10^7$  КОЕ/г, соответственно. На 21 сутки после инокуляции численность эндофитных азотфиксаторов в корне, стебле и листьях увеличилась и составила  $(8,849 \pm 0,147) \cdot 10^7$ ,  $(3,920 \pm 0,040) \cdot 10^8$ ,  $(9,130 \pm 0,435) \cdot 10^6$  КОЕ/г. Численность фосфатмобилизаторов на 21 сутки составила  $(1,055 \pm 0,068) \cdot 10^8$ ,  $(2,240 \pm 0,120) \cdot 10^8$ ,  $(5,609 \pm 0,217) \cdot 10^6$  КОЕ/г, соответственно.

В модельных экспериментах установлена высокая эффективность использования обработки семян для интродукции эндофитов.



### Blue honeysuckle introduction to *in vitro* culture

Antsiferov D.V.<sup>1</sup>, Lukjanova E.A.<sup>1</sup>, Ivashenko D.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Darwin LLC, Tomsk, Russia; <sup>2</sup>Laboratory of Industrial Microbiology, Biological Institute, Tomsk State University, Tomsk, Russia

Email: dmitry.antsiferov@gmail.com

**Key message.** *In vitro* cultures of three varieties of blue honeysuckle were obtained, the optimum time for material selection was determined and the method of explants sterilization was developed.

**Keywords:** microclones, honeysuckle, explants, sterilization, propagation

Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) has a number of important physiological properties, such as high frost resistance, the ability to tolerate frost during flowering, and a long fruiting period (up to 40 years). The fruits of this culture are in demand in many countries of the world. This makes it economically viable for cultivation in our country, where most of the territories are in the risky farming zone. But, despite the fact that Russia occupies a leading position in honeysuckle breeding, our nurseries are not able to fully satisfy the demand for seedlings of this crop. This is partly due to the use of ineffective methods for propagation. The purpose of this study: to select the conditions for the preparation and sterilization of blue honeysuckle explants for their subsequent *in vitro* cultivation. The material for the study was annual lignified shoots, which were cut in October, November and December. The shoots were washed in running tap water for 30 minutes. Then they were placed in a microelement solution of MS and illuminated for 16 hours per day and an intensity of 3500 lux. Flower buds were cut. After two weeks, the overgrown green shoots were cut off and washed for two hours with running tap water. The washed shoots were moistened for 10 seconds in a 70 % ethanol solution, then sterilized for 10 minutes in a 2.6 % solution of sodium hypochlorite (in active chlorine). After sterilization, they were washed three times with sterile distilled water. The buds were isolated with 4-5 rudimentary leaves. The latter were placed in test tubes with half MS medium with the addition of 6-BAP - 0.6 mg/L and ascorbic acid - 10 mg/L. As a result of studies, it was shown that only 20 % of explants taken from shoots cut in October are capable of developing *in vitro*, and only 7 % have successfully undergone sterilization; for explants received in November - 87 % and 22 %, respectively; and for the "December" explants, these figures were 100 % and 94 %. Moreover, the growth of "late" explants was noted already on the 3<sup>rd</sup>-4<sup>th</sup> day of cultivation, which is 3-5 days earlier than that taken in October and November. Thus, *in vitro* cultures of 3 varieties of blue honeysuckle were obtained. It was established that the material for the subsequent production of microclones should be cut off not earlier than December, and it is advisable to use green shoots as explants.

### Введение в культуру *in vitro* жимолости синей

Анциферов Д.В.<sup>1</sup>, Лукьянова Е.А.<sup>1</sup>, Ивашенко Д.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ООО «Дарвин», Томск, Россия; <sup>2</sup>Лаборатория промышленной микробиологии Биологического института Томского государственного университета, Томск, Россия

**Аннотация.** Получены культуры *in vitro* трёх сортов жимолости синей, определены сроки отбора материала и отработан метод стерилизации эксплантов.

**Ключевые слова:** микроклоны, жимолость, экспланты, стерилизация, размножение

Жимолость (*Lonicera caerulea* L.) имеет ряд важных физиологических свойств, таких как высокая морозостойчивость, способность переносить заморозки во время цветения, длительный срок плодоношения (до 40 лет). Плоды этой культуры пользуются спросом во многих странах мира. Это делает её экономически выгодной для возделывания в нашей стране, где большая часть территорий находится в зоне рискованного земледелия. Но, несмотря на то что в селекции жимолости Россия занимает лидирующее положение, наши питомники не способны полностью удовлетворить спрос на саженцы этой культуры. Отчасти это обусловлено использованием для размножения малоэффективных методов. Цель данного исследования: подобрать условия получения и стерилизации эксплантов жимолости синей для их последующего культивирования *in vitro*. Материалом для исследования были однолетние одревесневшие побеги, срезанные со взрослых растений в период с октября по декабрь. Побеги промывали в проточной водопроводной воде в течение 30 мин. Затем помещали в раствор микроэлементов MS и освещали с периодичностью 16 часов в сутки и интенсивностью 3500 Лк. Цветочные бутоны обрывали. Через две недели срезали отросшие зелёные побеги и два часа промывали в проточной водопроводной воде. Промытые побеги смачивали в течение 10 секунд в 70% растворе этанола, затем стерилизовали 10 минут в 2,6 % растворе гипохлорита натрия (по активному хлору). После стерилизации их трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Почку вычленили с 4-5ю зачаточными листьями. Последние помещали в пробирки с половинной средой MS с добавлением 6-БАП – 0,6 мг/л и аскорбиновой кислоты – 10 мг/л. В результате исследований показано, что только 20 % эксплантов, взятых с побегов, срезанных в октябре, способны развиваться в условиях *in vitro*, и лишь 7 % успешно прошли стерилизацию; для эксплантов, полученных в ноябре – 87 % и 22 % соответственно; и для «декабрьских» эксплантов эти показатели составили 100 % и 94 %. При этом рост «поздних» эксплантов отмечали уже на 3-4й день культивирования, что на 3-5 дней раньше, чем у взятых в октябре и ноябре. Таким образом, получены культуры *in vitro* трех сортов жимолости синей. Установлено, что материал для последующего получения микроклонов следует срезать не ранее декабря, а в качестве эксплантов целесообразно использовать зелёные побеги.

## Selection of genetically marked maize lines for the ability to parthenogenesis

Apanasova N.V.

Saratov State University named after N.G. Chernyshevskiy, Saratov, Russia

E-mail: [apanasova.natasha@mail.ru](mailto:apanasova.natasha@mail.ru)

**Key message.** *New genetically marked lines have been created. They could facilitate the transfer of parthenogenesis genes to other lines and serve as the basis for creating a collection of parthenogenesis donors.*

**Keywords:** *Zea maize, haploid, parthenogenesis*

The creation of maize lines with recessive marker genes could facilitate the transfer of parthenogenesis genes to other lines and would allow controlling the homo- or heterozygosity of apomicts, autonomous or hybrid origin of the endosperm.

The aim of the work was creating parthenogenesis analogues of maize lines in which each chromosome carries known recessive genes that are well manifested phenotypically (*lg, bm, su, g, gl, wx, etc.*).

A series of lines was obtained by crossing the Tester Mangelsdorf line and the parthenogenetic line AT-1

Data analysis of field research in 2006 - 2017. The lines with the highest frequencies (5-10%) of haploids were identified. The frequencies of haploids varied in different years.

The analysis of data on the occurrence of haploid plants in the field was divided into periods (2006-2011 and 2012-2017). The frequency of haploids increased in 18 of 24 lines.

The greatest change in this frequency is more than 9 times observed at line 19. High values of haploids are characterized by lines 17 and 18, and, to a lesser extent lines 5, 13 and 21.

The lines whys signs of parthenogenesis and homozygous in recessive genes, located in the nine chromosomes very obtained. Parthenogenetic line with marked genes in 5 chromosome don't obtained. it can be assumed that the parthenogenesis factor may be located on the 5th chromosome.

To confirm the parthenogenesis origin of haploid plants in the lines a cytoembryological analysis was performed.

The following groups of embryo sacs were distinguished: 1) normal structure; 2) with additional egg cells and egg-like synergides; 3) with parthenogenesis proembryo; 4) with additional divisions in the central cell. Embryo sacs with parthenogenetic proembryo were detected only in 13 and 18 lines. Embryo sacs with additional egg cells were observed in all the studied lines with a frequency of 0.7 to 3.3%, while with an egg-like synergid only in 6 and 15 lines. Autonomous development of the endosperm was noted in lines 13, 6, 18 and 11 (1.3; 0.5; 1.0 and 1.0%, respectively).

The created lines inherited the ability to parthenogenesis from the parent line AT-1 and could serve as the basis for creating a collection of parthenogenesis donors.

## Отбор генетически маркированных линий кукурузы на способность к партеногенезу

Apanasova N.V.

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Саратов, Россия

**Аннотация.** *Созданы новые генетически маркированные линии, которые могли бы облегчить передачу генов партеногенеза в другие линии и послужить основой для создания коллекции доноров партеногенеза.*

**Ключевые слова:** *кукуруза, гапloid, партеногенез*

Создание линий кукурузы с рецессивными маркерными генами могло бы облегчить передачу генов партеногенеза в другие линии и позволило бы контролировать гомо - или гетерозиготность апомиктов, автономное или гибридное происхождение эндосперма.

Целью работы было создание партеногенетических аналогов линий кукурузы, у которых каждая хромосома несет известные рецессивные гены, хорошо проявляющиеся фенотипически (*lg, bm, su, g, gl, wx* и др.).

Серия линий была получена в результате скрещивания линии Тестер Мангельсдорфа и партеногенетической линии АТ-1.

На основе анализа данных многолетних полевых исследований с 2006 по 2017 гг. выделили линии с наиболее высокими значениями частот возникновения гаплоидов (5-10%). Частоты гаплоидии варьировали в разные годы исследования.

Анализ данных по встречаемости гаплоидных растений в поле разделили на периоды (2006-2011 гг. и 2012-2017 гг.). Частота гаплоидии увеличивалась в 18 линиях из 24.

Наибольшее изменение частоты гаплоидии более чем в 9 раз отмечено у линии 19. Высокими значениями гаплоидии характеризуются линии 17 и 18 и в несколько меньшей степени линии 5, 13 и 21.

Были получены линии с признаками партеногенеза гомозиготные по маркированным рецессивным генам, локализованным в девяти хромосомах. По 5-ой хромосоме получить гомозиготную линию не удалось, поэтому можно предположить, что фактор партеногенеза может располагаться в данной хромосоме.

Для подтверждения партеногенетического происхождения гаплоидных растений у линий был проведен цитозембриологический анализ.

В результате цитозембриологического анализа выделены следующие группы зародышевых мешков: 1) нормального строения; 2) с дополнительными яйцеклетками и яйцеклеткоподобными синергидами; 3) с партеногенетическим проэмбрио; 4) с дополнительными делениями в центральной клетке. Зародышевые мешки с партеногенетическим проэмбрио зарегистрированы только у линий 13 и 18. Зародышевые мешки с дополнительной яйцеклеткой отмечены во всех исследованных линиях с частотой от 0,7 до 3,3 %, тогда как с яйцеклеткоподобной синергидой только у линий 6 и 15. Автономное развитие эндосперма отмечено у линий 13, 6, 18 и 11 и составило 1,3; 0,5; 1,0 и 1,0 % соответственно.

Созданные линии унаследовали от родительской линии АТ-1 способность к партеногенезу и могли бы послужить основой для создания коллекции доноров партеногенеза.

## Comparison of the influence bacteria producing either auxin or cytokinin on growth and water relation of wheat plants under salinity

Arkhipova T.N., Martynenko E.V., Kuzmina L.Yu., Veselov D.S.

Ufa Institute of Biology – Separate Structural Division of Ufa Federal Scientific Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: TNArkhipova@mail.ru

**Key message.** Rhizobacteria reduced the negative effects of salinity on wheat plants. Similarities and differences in the effect of hormone-producing halotolerant bacteria on plant growth and water relations during salinity are discussed.

**Keywords:** wheat, hormone-producing halotolerant bacteria, salinity, water relations, growth

A deeper understanding of the mechanism of action of PGP bacteria on plants will increase the effectiveness of biotechnologies aimed at increasing plant stress resistance.

The aim of this work was to study and to compare the effect of auxin and cytokinin-producing halotolerant bacteria on the growth, water relation and productivity of wheat plants (*Triticum durum* Desf., Bashkirskaya 27) under salinity.

We measured plant growth, transpiration, water content and RWC, stomatal and hydraulic conductivity, water and osmotic potentials, hormone content, MDA, photosynthesis, and productivity.

Introduction of halotolerant auxin- (*P. mandelii* IB-Ki14) or cytokinin-producing (*B. subtilis* IB-22) bacteria into the rhizosphere of wheat plants (*Triticum durum* Desf.) reduced the negative effects of salinity. Against the background of salinity under laboratory conditions, inoculation increased the shoot mass, roots and leaf area, and these indices were higher in the case of *B. subtilis* IB-22-treatment than under *P. mandelii* IB-Ki14.

Inoculation with both strains increased transpiration of plants compared to non-inoculated plants which required an increase in water flow from the roots. Transpiration was higher in the case of *B. subtilis* IB-22 treatment compared to *P. mandelii* IB-ki14 inoculation. In the case of auxin producing bacteria salvation of the problem of maintenance of water flow from the roots was achieved due to a decline in leaf water potential enabling an increase in the driving force for lifting water from the roots as well as due to an increase in root mass as influenced by inoculation. In the plants treated with cytokinins producing bacteria optimization of water balance was due to increased hydraulic conductance alongside with the increased root mass resulting in higher effectiveness of growth stimulating effect on plants produced by these bacteria. Furthermore, the weakening of oxidative stress and an increase in the content of chlorophyll under bacterial influence contributed to the greater efficiency of the action of cytokinin-producing bacteria. In the field, against the background of different salinity levels, pre-sowing treatment of wheat seeds with hormone-producing bacteria increased plant productivity, but to a greater extent under the influence of *B. subtilis* IB-22. At the early stages of development, optimization of water relations under the influence of bacteria manifested in the accumulation of osmotics and a decrease in the level of stress-induced accumulation of ABA in shoots contributed to an increase in plant productivity against the background of salinity. (RFBR № 18-04-00577, № 20-04-00305).

## Сравнение влияния бактерий, продуцирующих ауксины или цитокинины, на рост и водный обмен растений пшеницы при засолении

Архипова Т.Н., Мартыненко Е.В., Кузьмина Л.Ю., Веселов Д.С.

Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

**Аннотация.** Ризобактерии уменьшали отрицательные последствия действия засоления на растения пшеницы. Обсуждаются сходства и различия в действии гормонпродуцирующих галотолерантных бактерий на рост и водный обмен растений при засолении.

**Ключевые слова:** пшеница, гормонпродуцирующие галотолерантные бактерии, засоление, водный обмен, рост

Более глубокое понимание механизма действия PGP бактерий на растения позволит увеличить эффективность биотехнологий, направленных на повышение стрессоустойчивости растений.

Цель работы состояла в сравнении влияния ауксин- и цитокининпродуцирующих галотолерантных бактерий на рост, водный обмен и продуктивность растений пшеницы (*Triticum durum* Desf., сорт Башкирская 27) при засолении.

Измеряли рост растений, транспирацию, содержание воды и ОСВ, устьичную и гидравлическую проводимости, водный и осмотический потенциалы, содержание гормонов, МДА, показатели фотосинтеза и элементы структуры урожая.

Введение в ризосферу растений пшеницы ауксинпродуцирующих (*P. mandelii* IB-Ki14) или цитокининпродуцирующих (*B. subtilis* IB-22) бактерий уменьшало отрицательные последствия засоления. На фоне засоления в лабораторных условиях инокуляция увеличивала массу побега, корней и площадь листьев и при обработке *B. subtilis* IB-22 эти показатели были выше, чем при действии *P. mandelii* IB-Ki14. Инокуляция обоими штаммами повышала транспирацию растений, что требовало увеличения притока воды из корней. В случае ауксинпродуцирующих бактерий решением этой проблемы оказалось снижение водного потенциала листьев, обеспечивающего увеличение движущей силы для подъема воды, а также наращивание массы корней под влиянием инокуляции. У растений, обработанных цитокининпродуцирующими бактериями, оптимизации водного баланса наряду с увеличением массы корней способствовало повышение гидравлической проводимости, что определило большую эффективность ростстимулирующего действия этих бактерий на растения. Также свой вклад в большую эффективность действия бацилл вносило ослабление под их влиянием оксидативного стресса и увеличение содержания хлорофилла. В полевых условиях предпосевная обработка семян пшеницы гормонпродуцирующими бактериями повышала урожайность растений, но в большей степени под влиянием *B. subtilis* IB-22. Оптимизация водных отношений под влиянием бактерий на ранних стадиях развития, которая проявлялась в накоплении осмотиков и снижении уровня стресс-индуцированного накопления АБК в побегах, способствовала увеличению урожайности растений на фоне засоления (РФФИ № 18-04-00577, № 20-04-00305).

## Fungi of *Aspergillus* genus in oil contaminated soils of Azerbaijan

Atakishiyeva Y.Y.

Institute of Microbiology of National Academy of Sciences of Azerbaijan, Baku, Azerbaijan

E-mail: y.atakishiyeva@mail.com

**Key message.** The thesis presents the results of studies on the species composition of fungi of *Aspergillus* genus in oil-contaminated gray-brown soils of Azerbaijan.

**Keywords:** oil-contaminated soils, micromycetes, genus, *Aspergillus*

Fungi genera: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus* and others are well known for their ability to use hydrocarbons and create the potential for oil decomposition in heterogeneous microorganisms in the environment. Genus *Aspergillus* is one of the most common among these fungi groups.

The purpose of this work is to isolate and study the species composition of microscopic fungi of *Aspergillus* genus from the oil-contaminated gray-brown soil of Azerbaijan.

20 soil samples from six main oil producing areas in Absheron were selected for this study. The hydrocarbon content in the soil was measured gravimetrically after hexane extraction. Isolation of micromycetes was performed in Czapek nutrient medium. Species identification was done by using common methods. Soil samples were provisionally divided into three groups according to the quantitative content of oil pollution: 1) contaminated soil around live drilling wells (oil pollution-above 15%), 2) areas of bituminized soil around old, abandoned oil derricks (oil pollution-5-10%), 3) weathered soils with weak vegetation cover (oil pollution – 4.0-5.0%).

Analyses have shown that in heavily oil-contaminated soils, almost all groups of microorganisms, including micromycetes, are suppressed. Overall, there were isolated 8 species of micromycetes of *Aspergillus* genus from the studied soils, including those not contaminated with oil: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *A. ustus*, *A. niger*, *A. wentii*, *A. flavipes*, *A. versicolor*.

8 species of micromycetes of *Aspergillus* genus were isolated from the studied soil samples taken from outside of the pollution zone, 4 species isolated from weathered soils with 4.0-5.0% oil and from areas around abandoned derricks 2 species. Among the isolated and identified aspergillus, representatives of *A. fumigatus* take a leading place. They dominate in all the studied soils. Representatives of *A. niger* are also present in the studied samples, but in very small amounts.

*A. oryzae* and *A. wentii* species were isolated only from samples of unpolluted soil and group 3. The complete absence of species *A. flavipes*, *A. versicolor* and *A. ustus* species was noted in oil-contaminated soils.

Thus, it has been shown that the change in the species composition of microscopic fungi of *Aspergillus* genus is affected by the amount and period of oil pollution.

## Грибы рода *Aspergillus* в нефтезагрязненных почвах Азербайджана

Атакишиева Я.Ю.

Институт Микробиологии НАН Азербайджана, Баку, Азербайджан

**Аннотация.** В тезисе приведены результаты исследований по изучению видового состава грибов рода *Aspergillus* в загрязненных нефтью серо-бурых почвах Азербайджана.

**Ключевые слова:** нефтезагрязненные почвы, микромицеты, род, *Aspergillus*

Грибы рода *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus* и др. хорошо известны благодаря их способности использовать углеводороды и создавать потенциал разложения нефти у разнородных микроорганизмов в окружающей среде. Род *Aspergillus* является одной из наиболее распространенных среди этих групп грибов.

Цель данной работы – выделение и изучение видового состава микроскопических грибов рода *Aspergillus* из нефтезагрязненной серо-бурой почвы Азербайджана. Для исследования были отобраны 20 почвенных образцов почв по шести основным районам нефтедобычи на Апшероне. Содержание углеводородов в грунте определяли гравиметрически после экстракции гексаном. Выделение микромицетов проводили на питательной среде Чапека. Идентификацию видов проводили общепринятыми методами.

Образцы почв были условно разделены на три группы по количественному содержанию нефтяного загрязнения: 1) замасленные земли вокруг действующих буровых скважин (нефтяное загрязнение – выше 15%), 2) участки битумизированных земель вокруг старых, брошенных нефтяных вышек (нефтяное загрязнение – 5-10%), 3) выветриваемые почвы со слабым растительным покровом (нефтяное загрязнение – 4,0-5,0%).

Анализы показали, что в сильно нефтью загрязненных почвах наблюдается угнетение почти всех групп микроорганизмов, в том числе и микромицетов. Всего из исследуемых почв, в том числе и незагрязненных нефтью почв выделено 8 видов микромицетов рода *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *A. ustus*, *A. niger*, *A. wentii*, *A. flavipes*, *A. versicolor*.

Из исследованных почвенных образцов, взятых из вне зоны загрязнения, было выделено 8, из выветриваемых почв с 4,0-5,0% нефтью 4 и из участков вокруг брошенных вышек 2 вида микромицетов рода *Aspergillus*. Среди выделенных и идентифицированных аспергиллов представители вида *A. fumigatus* занимают ведущее место. Они доминируют во всех исследованных почвах. Представители *A. niger* также присутствуют в исследованных образцах, но очень в малом количестве.

Виды *A. oryzae* и *A. wentii* были выделены только из образцов незагрязненных земель и 3-й группы. Полное отсутствие видов *A. flavipes*, *A. versicolor* и *A. ustus* отмечено в нефтезагрязненных почвах.

Таким образом показано, что на изменение видового состава микроскопических грибов рода *Aspergillus* влияет количество и временной период нефтяного загрязнения.

**Study of the antibacterial properties of sulfated polysaccharides from brown algae *Fucus vesiculosus***Ayrapetyan O.N.<sup>1,2</sup>, Zhurishkina E.V.<sup>1</sup>, Obluchinskaya E.D.<sup>3</sup>, Kulminskaya A.A.<sup>1</sup>, Lapina I.M.<sup>1</sup>.<sup>1</sup>National Research Center "Kurchatov Institute", B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina, Russia;<sup>2</sup>Saint-Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, St. Petersburg, Russia;<sup>3</sup>Federal State Budgetary Scientific Institution of Murmansk Marine Biological Institute, Kola Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Murmansk, Russia

E-mail: ayrapetyan\_on@npi.nrcki.ru

**Key message.** Two fractions of fucoidans were identified and characterized, and their effects on bacteria were investigated. The values of the minimum inhibitory concentration (MIC) were determined, and the effect on the formation of biofilms was studied.

**Keywords:** fucoidan, bacteria, biofilms, bacteriostatic action

The necessity of searching for new antimicrobial agents is due to the growing resistance of pathogenic strains to antibiotics. Brown algae, whose contain sulfated polysaccharides (fucoidans) with a wide range of biological activities, are currently being actively studied as a natural source of antibacterial compounds.

Purpose: To Study the antibacterial properties of two fractions of sulfated polysaccharides with different degrees of purification, emitted from brown algae *Fucus vesiculosus*.

The monosaccharide composition was determined by the HPLC method, the content of sulfates and uronic acids was determined by the turbidimetric method. MIC -by dilution on a tablet; determination of living and dead cells-spectrophotometry. Researching the biofilms-staining with a crystal violet dye.

Brown algae *Fucus vesiculosus* has been collected in the littoral of the Barents Sea. Polysaccharides were emitted in accordance with the technological scheme [1]. The chemical composition of the purified fucoidan fraction obtained as a result of processing the native fucopolysaccharide differed from the composition of the coarse fraction. The following bacteria were used as the research object: *E. coli*, *B. licheniformis*, *S. epidermidis*, and *S. aigeis*. The minimum inhibitory concentration of polysaccharides was determined. The growth curves of microorganisms during cultivation for 24 hours are constructed. [2] The Bacteriostatic effect of fucoidans was proved by the growth of microorganisms treated with polysaccharides when transferred from a liquid medium to an agarized one. During processing the bacterial cultures at the early stages of biofilms formation with fucoidans in MIC concentrations, a violation of their formation is observed. While at a low concentration of fucoidans (below MIC), film formation increases. [3]

**Исследование антибактериальных свойств сульфатированных полисахаридов из бурых водорослей *Fucus vesiculosus***Айрапетян О.Н.<sup>1,2</sup>, Журишкина Е.В.<sup>1</sup>, Облучинская Е.Д.<sup>3</sup>, Кульминская А.А.<sup>1</sup>, Лапина И.М.<sup>1</sup><sup>1</sup>НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, Гатчина, Россия; <sup>2</sup>Научно-исследовательский институт механики, технологий и оптики, Санкт-Петербург, Россия; <sup>3</sup>Мурманский морской биологический институт Кольского научного центра РАН, Россия

**Аннотация.** Были выделены и охарактеризованы две фракции фукоиданов, исследовано их воздействие на бактерии. Определены значения минимальной подавляющей концентрации (МПК), изучено влияние на формирование биопленок.

**Ключевые слова:** фукоидан, бактерии, биопленки, бактериостатическое действие

Необходимость поиска новых антимикробных средств обусловлена ростом резистентности патогенных штаммов к антибиотикам. В качестве природного источника антибактериальных соединений в настоящее время активно исследуются бурые водоросли, которые содержат сульфатированные полисахариды (фукоиданы), обладающие широким спектром биологических активностей.

Цель: Исследование антибактериальных свойств двух фракций сульфатированных полисахаридов с разной степенью очистки, выделенных из бурых водорослей *Fucus vesiculosus*.

Моносахаридный состав был определен методом ВЭЖХ, содержание сульфатов и уроновых кислот – турбидиметрическим методом. МПК – методом разведений на планшете; определение живых и мёртвых клеток – спектрофотометрия. Изучение биопленок – окрашивание кристаллическим фиолетовым.

Бурые водоросли *Fucus vesiculosus* были собраны в литорали Баренцева моря. Полисахариды выделены в соответствии с технологической схемой [1]. Химический состав очищенной фракции фукоидана, отличался от состава грубой фракции (изменились соотношения моносахаридов, уменьшилось количество уроновых кислот). В качестве объекта исследования были использованы следующие бактерии: *E. coli*, *B. licheniformis*, *S. epidermidis*, *S. aureus*. Была определена минимальная подавляющая концентрация. Построены кривые роста микроорганизмов при культивировании в течение 24 часов. [2]. При обработке культур на ранних стадиях формирования биопленок фукополисахаридами в концентрациях МПК наблюдается нарушение их формирования. Тогда как при низкой концентрации фукоиданов (ниже МПК) происходит усиление пленкообразования. [3]

1. Пат. 2337571 Российская Федерация МПК А61К41 А61J; C01, C07, C08, C12N; C11D; C12N, A23L1/30, A23L 1/308 A23L1/337 Способ комплексной переработки бурых водорослей Облучинская Е.Д., заявитель и правообладатель; ММБИ КНЦ РАН, Б.И. № 31 (2008)

2. Foerster, M. Unemo, L.J. Hathaway, N. Low, C.L. Althaus, Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for *in vitro* evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*, BMC Microbiol. 16 (2016) 216

3. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. 2002; 68:2950-8

## Creation of a collection of microorganisms - destructors of organic substances that are promising for bioremediation of technogenic disturbed lands in Kazakhstan

Baigonusova Zh.A., Rysbek A.B., Kurmanbaev A.A.

RSE "National Center for Biotechnology" SC MES, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan

E-mail: zhanatb71@mail.ru, kurmanbayev@biocenter.kz

**Key message.** The cultural-morphological and biochemical properties of 83 selected strains of organic substance destructor were studied. The analysis of nucleotide sequences of the genome of bacteria *Bacillus cereus* Fd 2 was performed.

**Keywords:** surfactant destructor, oil destructor, fat destructor, production-valuable strain, identification

Collections of microbial cultures are fundamental to biotechnology. The cultures stored in the collections are the basis for using the achievements of Microbiology, genetics, and molecular biology in industry, agriculture, and medicine. The purpose of the research was to create and replenish the collection of microorganisms with strains of organic substance destructor bacteria.

The generic identity of the isolated bacteria was determined on the basis of morphological, cultural and chemotaxonomic characteristics, using the "Determinant of Bergey bacteria" [1]. Tests for biochemical properties were used to differentiate microorganisms to the genus [2]. The identification of bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry was performed by comparing data on the composition and ratio of peptides obtained by hydrolysis of proteins in the colony of the studied microorganism with similar data of typical strains from the database using the Biotyper 3.0 RTC program (Bruker Daltonics, Germany). Full-genome sequencing of *Bacillus cereus* FD 2 strains was performed on the Miseq, Illumina platform. Initially, bacterial DNA was isolated from the culture medium using a standard STAV method [3].

The objects of research were 83 active strains of oil and surfactant destructive bacteria isolated from the soils of Mangistau, Atyrau, Aktau regions, from the effluents of active silt of the treatment facilities of Nur-Sultan "Astana Su Arnasy", as well as from the wastewater of private baths and car washes.

Morphophysiological and biochemical properties of collection bacterial strains of fat destructors (Fd), surfactant destructors (Sd) and oil destructors (Od) were studied.

As a result of the analysis of 16 bacterial strains of fat destructors, 10 strains were gram-positive rods, 6 were gram-negative rods, all had oxidase and catalase activity. Microscopy of smears of surfactant destructor strains (Sd) revealed that 9 of them were gram-positive rods, 9-gram-negative rods, 1 strain was assigned to gram - positive cocci, and 1-to gram-negative cocci. Among the oil destructor bacteria (Od), 10 strains were gram-positive rods, 30 gram-negative rods, 2 strains were assigned to gram - positive cocci, and 5-to gram-negative cocci, 20 strains did not have oxidase activity, and 22 strains have catalase activity.

All the studied bacterial strains of organic destructors had catalase and oxidase activity, were capable of liquefying gelatin, carried out starch hydrolysis, did not form indole, and assimilated glucose, fructose, trehalas, sucrose, mannose, rhamnose and maltose, galactose and lactose.

54 bacterial cultures were identified to the genus and species using MALDI-TOF mass spectrometry.

In this study, the Fd – 2 active strain with lipase activity was selected from the collection of studied microorganisms for full-genome sequencing.

Thus, a collection of active strains of bacteria – destructors of organic matter is obtained. All the studied strains of microorganisms can serve as the basis for creating preparations for cleaning the environment from xenobiotics.

This work was prepared as part of the BR05236334 project, funded by the Ministry of education and science of the Republic of Kazakhstan for 2018-2020.

1. Holt J. et al. The determinant of Bergey bacteria / TRANS. from English in 2 volumes / Moscow: Mir, 1997. - 800 p.
2. Tepper E. Z., Shilnikova V. K., Pereverzeva G. I. Practicum on Microbiology / ed. by V. K. Shilnikova. - Moscow: bustard, 2004. - 256 p.
3. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 // Molecular Biology and Evolution. – 2013. – Vol.30. – P. 2725-2729

### Induction of somatic embryogenesis in different cotton cultivars and lines

Baimukhametova E.A., Musin K.G., Kuluev B.R.

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,  
Ufa, Russia

E-mail: elvina.baimuhametova@yandex.ru

**Key message.** During *in vitro* cultivation of various cultivars and lines of cotton, lines less prone to browning and forming healthy calli were revealed. The experiments on induction of somatic embryogenesis in these lines are conducted.

**Keywords:** cotton, transgenic plants, somatic embryogenesis

The cultivation of cotton - one of the economically important crops - in the climatic conditions of the Russian Federation is extremely problematic. Therefore, it seems relevant to create stress-resistant transgenic cotton plants. The main problem in this process is the regeneration of plants by somatic embryogenesis, which is effective only in some foreign cultivars. The aim of our work was to study different cultivars and lines of cotton for the possibility of successful *in vitro* cultivation and induction of somatic embryogenesis. For this, the sterile cotyledon leaves of cotton plants were cut into explants, which were placed on a number of nutrient media of various compositions. In the experiments we used Yulduz, AN-415 and C4727 cultivars of cotton medium-fiber *Gossypium hirsutum* L., as well as lines № 1, 2, 7, 8, 10, 12, 90 of domestic selection provided by VolSAU. During the experiment, the selection of lines most suitable for *in vitro* cultivation was carried out. Thus, it was found that cultivars and lines of cotton differ both in the intensity of callus formation and in the nature of the formed calluses. So, in lines № 1 and 8, the appearance of predominantly hydrated calli was observed. Therefore, these lines were excluded from the experiments, as well as the Yulduz and AN-415 cultivars, in which darkening of the calli and nutrient medium due to the active isolation and oxidation of phenolic compounds was observed. Lines № 2, 7, 10, and 12 turned out to be less browning, their calli remained green and healthy. At the moment, the calli of these lines are cultivated on the MSBEF medium. The induction of somatic embryogenesis and plant regeneration is expected. Thus, in our experiment, it was shown that the cotton lines № 2, 7, 10, and 12 are most suitable for *in vitro* cultivation. The remaining lines and varieties form either hydrated calluses or have a high level of synthesis of polyphenolic compounds that reduce callus survival and inhibit the induction of somatic embryogenesis and plant regeneration.

### Индукция соматического эмбриогенеза у различных сортов и линий хлопчатника

Баймухаметова Э.А., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

**Аннотация.** В ходе *in vitro* культивирования различных сортов и линий хлопчатника выявлены линии менее склонные к коричневению и образующие здоровые каллусы. Ведутся работы по индукции соматического эмбриогенеза у данных линий.

**Ключевые слова:** хлопчатник, трансгенные растения, соматический эмбриогенез

Возделывание хлопчатника – одной из экономически важных сельскохозяйственных культур – в климатических условиях РФ крайне проблематично. Поэтому, актуальным представляется создание стрессоустойчивых трансгенных растений хлопчатника. Основной проблемой при этом является регенерация растений через индукцию соматического эмбриогенеза, эффективно происходящая лишь у некоторых зарубежных сортов. Целью нашей работы было исследование сортов и линий хлопчатника на возможность успешного *in vitro* культивирования и индукции соматического эмбриогенеза. Для этого стерильные семядольные листья растений хлопчатника разрезались на экспланты, которые помещались на ряд питательных сред различного состава. В экспериментах использовались сорта хлопчатника средневолокнистого *Gossypium hirsutum* L. Юлдуз, АН-415 и С4727, а также линии № 1, 2, 7, 8, 10, 12, 90 отечественной селекции, предоставленные ВолГАУ. В ходе эксперимента проводился отбор линий наиболее подходящих для *in vitro* культивирования. Так, было обнаружено, что сорта и линии хлопчатника отличаются как по интенсивности каллусообразования, так и по характеру образующихся каллусов. Так, у линий №1 и 8 наблюдалось появление преимущественно гидратированных каллусов. Поэтому данные линии были исключены из экспериментов, также как и сорта Юлдуз и АН-415, у которых уже на первых этапах исследования наблюдалось потемнение образующихся каллусов и питательной среды вследствие активного выделения и окисления фенольных соединений. Линии № 2, 7, 10 и 12 оказались менее коричневеющими, их каллусы оставались зелеными и здоровыми. В настоящий момент каллусы данных линий находятся на питательной среде MSBEF. Ожидается индукция соматического эмбриогенеза и регенерация растений. Таким образом, в ходе данного эксперимента было показано, что наиболее подходящими для *in vitro* культивирования являются линии хлопчатника средневолокнистого № 2, 7, 10 и 12 из ВолГАУ. Остальные линии и сорта образуют либо гидратированные каллусы, либо обладают высоким уровнем синтеза и окисления полифенольных соединений, снижающих выживаемость каллусов и препятствующих индукции соматического эмбриогенеза и регенерации растений.

### Promising microorganisms for coping herbicide stress in plants

Bakaeva M.D., Chetverikov S.P., Chetverikova D.V., Kendzhiyeva A.A.

Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia  
e-mail: margo22@yandex.ru

**Key message.** *Herbicide-resistant strains of Pseudomonas and Achromobacter have been isolated. They are diazotrophic, can mobilize phosphorus from insoluble compounds and synthesize phytohormones in the presence of herbicides.*

**Keywords:** *herbicide stress, PGPB, Pseudomonas, Achromobacter*

The use of herbicides is an element of integrated protection of agricultural plants. Nevertheless, herbicides have a negative stressful effect on the development of the cultivated plant too. Herbicide stress can be overcome using anti-stress agents based on herbicide-resistant PGP-bacteria that have a complex positive effect on the plant.

The purpose of this work is to characterize some herbicide – resistant plant growth promoting microorganisms.

Initially the microorganisms were selected according to their ability to grow on the of Raymond mineral medium with the addition of herbicides based on 2,4-D (2,5 g/l) (Octapon, Florax, Chistalan) and sulfonylureas (1,0 g/l) (Nanomet). Phytohormone production was measured by enzyme immunoassay [Veselov et al., 1992], antifungal activity was detected when bacteria and fungi were cultured together in Petri dishes [Asabina et al., 2009]. The ability of bacteria to mobilize phosphorus from insoluble compounds and fixing atmospheric nitrogen were also evaluated taking into account its ability to grow on selective nutrient media. Whether the studied strains retained PGPB characteristic in the presence of herbicides was investigated as a property important for their anti- stress potential.

Herbicide-resistant strains of the *Pseudomonas* and *Achromobacter* were isolated. They were capable of suppressing phytopathogenic *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Bipolaris*, *Botrytis*, synthesizing auxins, nitrogen fixation and mobilizing phosphorus from insoluble compounds under the influence of herbicides. The described microorganisms can be recommended for field testing as anti-stress agents for coping herbicidal stress of plants.

The study was carried out within the framework of the Ministry of education and science of Russia № 075-00326-19-00 on the topic № ААААА-А19-119021390081-1.

### Перспективные микроорганизмы для нивелирования гербицидного стресса растений

Бакаева М.Д., Четвериков С.П., Четверикова Д.В., Кенджишева А.А.

Уфимский Институт биологии - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа, Россия

**Аннотация.** *Выделены устойчивые к действию ряда гербицидов бактерии родов Pseudomonas и Achromobacter. Показана их способность в присутствии гербицидов к синтезу фитогормонов и антибиотиков, мобилизации соединений фосфора и азотфиксации.*

**Ключевые слова:** *гербицидный стресс, PGPB, Pseudomonas, Achromobacter*

Применение гербицидов – один из элементов мероприятий по интегрированной защите сельскохозяйственных растений, оказывающий одновременно и отрицательное стрессовое воздействие на развитие культивируемого растения. Нивелирование гербицидного стресса возможно с использованием антистрессовых препаратов на основе PGP – бактерий, устойчивых к действию гербицидов и в их присутствии способных оказывать комплексное положительное воздействие на растение.

Цель настоящей работы – оценка потенциала для нивелирования гербицидного стресса у резистентных к гербицидам микроорганизмов.

Первичный скрининг микроорганизмов проводили по способности к росту на минеральной среде Раймонда в присутствии гербицидов на основе 2,4-Д (2,5 г/л) (Октапон, Флоракс, Чисталан) и сульфонилмочевин (1,0 г/л) (Наномет). Проводили измерение продукции фитогормонов методом иммуноферментного анализа [Veselov et al., 1992], антигрибной активности методом лунок [Асабина и др., 2009]. Также оценивали способность к мобилизации соединений фосфора и потенциал азотфиксации по наличию роста на селективных средах. Оценку потенциала для нивелирования гербицидного стресса проводили по сохранению свойств, характерных для PGP - бактерий в присутствии гербицидов.

Выделены устойчивые к действию гербицидов бактерии родов *Pseudomonas* и *Achromobacter*, способные в их присутствии к подавлению фитопатогенов рода *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Bipolaris*, *Botrytis*, синтезу ауксинов, азотфиксации и мобилизации соединений фосфора. Новые микроорганизмы могут быть рекомендованы для проведения полевых испытаний в качестве антистрессовых агентов по нивелированию гербицидного стресса растений.

Исследование выполнено в рамках ГЗ Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А19-119021390081-1.

Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Оптимизация биосинтеза ингибиторов роста фитопатогенов бактериями рода *Pseudomonas* // Биотехнология. 2009. № 3. С. 67-71.

Veselov S.U., Kudoyarova G.R., Egutkin N.L., Guili-Zade V.Z., Mustafina A.R., Kof E.M. Modified solvent partitioning scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay for indole 3- acetic acid // Physiologia Plantarum. 1992. V. 86. P. 93–



**The influence of plant growth stimulating bacteria on phytoremediation of oil-contaminated soils**

Bakaeva M.D., Vysotskaya L.B., Arkhipova T.N., Kuzina E.V., Chetverikov S.P., Rafikova G.F., Korshunova T.Y.,  
Loginov O.N., Veselov D.S., Kudoyarova G.R.  
Ufa Institute of Biolog, RAS, Ufa, Russia  
E-mail: vysotskaya@anrb.ru

**Key message.** The mechanisms of the effect of bacteria oxidizing hydrocarbons and synthesizing hormones on plant resistance to oil pollution of the soil are studied.

**Keywords:** bacteria – hydrocarbon destructors, hormones, plant growth, photosynthesis

The effectiveness and safety of soil cleaning from oil pollution depend on the use of hydrocarbon destructing bacteria and plants associations, which mechanisms of interaction are poorly studied.

Goal. The study of the influence of bacteria of the genus *Pseudomonas* on the growth, water balance and state of the photosynthetic apparatus of plants, brought about by ability bacteria to degrade oil hydrocarbons and the synthesis of phytohormones.

Methods. In laboratory experiments, soil pollution was simulated by introducing crude oil. The resistance of oats, barley, Sudan grass, sowing peas, seedless bonfire, meadow fescue, meadow clover and hedgehogs to the presence of oil hydrocarbons in the soil was assessed.

Results. We found inhibition of plant germination and growth, a decrease in transpiration and a change in photosynthesis parameters: maximum (Fv / Fm) and effective (Y (II)) quantum yield of photosystem II and non-photochemical quenching (NPQ). Different potential ability to accumulate IAA (ABA and cytokinins - trace amounts), when cultured on King B. medium, was shown for a number of bacterial strains, actively oxidizing oil hydrocarbons, mainly from the genus *Pseudomonas* belonging to the collection of the Ufa Institute of Biology of the UFIC RAS. We revealed some strains demonstrating minimal reduction of IAA synthesis in the presence of oil and hydrocarbons in the medium. Inoculation of barley plants with *P. plecoglossicida* 2.4-D, *P. turukhanskensis* IB 1.1 and *P. hunanensis* IB C7, *Enterobacter* sp. UOM 3, to varying degrees, reduced the negative impact of oil on the studied indicators. It was shown that this was not always directly dependent on the ability of the strains to reduce the content of oil hydrocarbons in the soil. At the same time, the maximum mass of barley plants in the presence of oil was observed during inoculation of plants with the strain *P. hunanensis* IB C7, characterized by minimal reduction of IAA production in the presence of oil hydrocarbons in the culture medium. Obviously, the bacterial IAA contributed to the detected activation of root growth in conditions of impaired access to water and nutrition due to oil pollution and to an increase in root secretions, which is important for both introduced and native microorganisms oxidizing hydrocarbons.

This work was supported by a grant of Russian Foundation of Basic Researches № 18-29-05025.

**Влияние бактерий, стимулирующих рост растений, на фиторемедиацию загрязненных нефтью почв**

Бакаева М.Д., Высоцкая Л.Б., Архипова Т.Н., Кузина Е.В., Четвериков С.П., Рафикова Г.Ф., Коришнунова Т.Ю.,  
Логинов О.Н., Веселов Д.С., Кудоярова Г.Р.  
Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, Россия

**Аннотация.** Изучены механизмы влияния окисляющих углеводов и синтезирующих фитогормоны бактерий на устойчивость растений при нефтяном загрязнении почв.

**Ключевые слова:** бактерии – деструкторы углеводов, гормоны, рост растений, фотосинтез

Эффективность и безопасность очистки почв от нефтяных загрязнений зависят от применения ассоциаций бактерий - деструкторов углеводов и растений, механизмы взаимодействия которых мало исследованы.

Цель. Изучение влияния бактерий рода *Pseudomonas* на рост, водный баланс и состояние фотосинтетического аппарата растений, обусловленное их способностью к деструкции углеводов нефти и синтезу фитогормонов.

Методы. В лабораторных опытах моделировали загрязнение почвы, внося в нее сырую нефть. Проведена оценка устойчивости растений овса, ячменя, суданской травы, гороха посевного, костра безостого, овсяницы луговой, клевера лугового и ежи сборной к присутствию в почве углеводов нефти.

Обнаружено подавление прорастания и роста растений, снижение транспирации и изменение параметров фотосинтеза: максимальный (Fv/Fm) и эффективный (Y (II)) квантовый выход фотосистемы II и нефотохимическое тушение (NPQ). Показана разная потенциальная способность ряда бактерий в основном рода *Pseudomonas* из коллекции Уфимского Института биологии УФИЦ РАН, активно окисляющих углеводы нефти, накапливать ИУК (АБК и цитокинины – следовые количества) при культивировании их на среде Кинг Б. Выявлены штаммы, которые минимально снижали синтез ИУК в присутствии в среде нефти и углеводов. Инокуляция растений ячменя отобранными по этому признаку штаммами *P. plecoglossicida* 2.4-D, *P. turukhanskensis* IB 1.1, *P. hunanensis* IB C7 и *Enterobacter* sp. UOM 3 в разной степени нивелировала негативное влияние нефти на изученные показатели. Показано, что не всегда это напрямую зависело от способности штаммов снижать содержание углеводов нефти в почве. В то же время максимальную массу растений ячменя в присутствии нефти наблюдали при инокуляции растений штаммом *P. hunanensis* IB C7, который в наименьшей степени снижал продукцию ИУК в присутствии углеводов нефти в культуральной питательной среде. Очевидно, бактериальная ИУК способствовала обнаруженной активации роста корней в условиях нарушения доступности воды и питания вследствие нефтяного загрязнения и увеличению корневых выделений, что важно как для вносимых, так и аборигенных окисляющих углеводов микроорганизмов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантом РФФИ № 20-04-00305.

### **Bacteria *Lelliottia nimipressuralis* CCM 32-3 -- the producer of organic acids**

*Baranskaya M.I., Chaikovskaya L.A.*

FSBSI "Research Institute of Agriculture of Crimea", Simferopol, Republic of Crimea

E-mail: [baranskaya@rambler.ru](mailto:baranskaya@rambler.ru)

**Key message.** It was established that the CL strain of *L. nimipressuralis* CCM 32-3 contains acetic, citric and gluconic organic acids, as well as a substance of unknown nature.

**Keywords:** *Lelliottia nimipressuralis* CCM 32-3, organic acids

During the life of microorganisms, a large number of metabolites accumulate, which determine the quality characteristics of the final product. One of these metabolites is organic acids. Its accumulation leads to a change in the active acidity of the nutrient medium, which significantly affects the speed and nature of biochemical reactions that occur during the cultivation of microorganisms in various substrates. Acidification of the environment also affects the charge of the cell membranes, the solubility of cations and anions, which leads to an improvement in the intake of nutrients to the microbial cell and, as a result, to the intensification of all ongoing metabolic processes. Many microorganisms with a complex of useful properties have been used in various sectors of the national economy, including agricultural production. Given the above, the aim of our research was to determine the qualitative and quantitative content of organic acids in the culture fluid of the strain *L. nimipressuralis* CCM 32-3. The strain included in the Crimean collection of microorganisms (<http://ckp-rf.ru/usu/507484/>) of FSBSI "Research Institute of Agriculture of Crimea". *L. nimipressuralis* CCM 32-3 is a basis of a fertilizer preparation for optimizing the mineral nutrition of plants, stimulating their growth and increasing productivity.

Determination of organic acids was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). It was found that the cell-free cultural liquid (CL) contains 8 components, 3 of which quantitatively prevail. When using the labels of standard substances, it was shown that the following organic acids predominate in the CL of the strain *L. nimipressuralis* CCM 32-3: acetic – 0.39 g/l, citric – 0.36 g/l and gluconic – 0.06 g/l, as well as an unidentified substance containing carboxyl groups. Thus, it was established that the CL strain of *L. nimipressuralis* CCM 32-3 contains acetic, citric and gluconic organic acids, as well as a substance of unknown nature.

### **Бактерия *Lelliottia nimipressuralis* CCM 32-3 – продуцент органических кислот**

*Баранская М.И., Чайковская Л.А.*

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»

Симферополь, Республика Крым

**Аннотация.** Приведены результаты исследований по изучению качественного и количественного содержания органических кислот в культуральной жидкости *Lelliottia nimipressuralis* CCM 32-3. Установлено, что в процессе жизнедеятельности штамм продуцирует органические кислоты: уксусную, лимонную и глюконовую в количестве 0,39 г/л, 0,36 г/л и 0,06 г/л соответственно.

**Ключевые слова:** *Lelliottia nimipressuralis* CCM 32-3, органические кислоты

В процессе жизнедеятельности микроорганизмов накапливается большое количество метаболитов, определяющих качественные характеристики конечного продукта. Одними из таких метаболитов являются органические кислоты, накопление которых приводит к изменению активной кислотности питательной среды, что существенно влияет на скорость и характер биохимических реакций, происходящих при культивировании микроорганизмов в различных субстратах. Подкисление среды влияет также и на заряд клеточных оболочек, растворимость катионов и анионов, что приводит к улучшению поступления питательных веществ в микробную клетку и, как следствие, к интенсификации всех протекающих метаболических процессов. Многие микроорганизмы, обладающие комплексом полезных свойств, нашли применение в различных отраслях народного хозяйства, в том числе и сельскохозяйственном производстве. Учитывая вышесказанное, цель наших исследований заключалась в определении качественного и количественного содержания органических кислот в культуральной жидкости штамма *L. nimipressuralis* CCM 32-3. Изучаемый штамм Крымской коллекции микроорганизмов ФГБУН "НИИСХ Крыма" (<http://ckp-rf.ru/usu/507484/>) – основа удобрительного препарата для оптимизации минерального питания растений, стимуляции их роста и повышения урожайности.

Определение органических кислот проведено методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Установлено, что освобожденная от клеток культуральная жидкость (КЖ) содержит 8 компонентов, 3 из которых количественно преобладают. При использовании меток стандартных веществ показано, что в КЖ штамма *L. nimipressuralis* CCM 32-3 преобладают следующие органические кислоты: уксусная – 0,39 г/л, лимонная – 0,36 г/л и глюконовая – 0,06 г/л, а также содержится не идентифицированное вещество, содержащее карбоксильные группы. Таким образом, методом ВЭЖХ установлено, что в КЖ штамма *L. nimipressuralis* CCM 32-3 содержатся уксусная, лимонная и глюконовая органические кислоты, а также вещество не установленной природы.

### **Influence of the microbiological preparation Atuva + Premax on the formation of soy nodule bacteria**

*Barchukova A.Ya., Chernysheva N.V., Tosunov Ya.K.*

Kuban state agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russia

*E-mail: nv.chernisheva@yandex.ru*

**Key message.** Soy is characterized by specific nutrition, the ability to assimilate nitrogen from the air through symbiosis with nodule bacteria. Microbiological preparation Atuva + Premax activates the formation of nodule bacteria.

**Keywords:** soy, Atuva + Premax, inoculant, nitrogen fixation, nodule bacteria

The goal is to establish the optimal concentration of the test drug solution for pre-sowing treatment of soybean seeds.

The experiments were carried out in a field experiment at the experimental site of Kubgau (Uchkhoz "Kuban", ot. 1). The registered area of the plot is 25 m<sup>2</sup>, the repeatability is fourfold. Soya – Vilana variety. The experiment scheme included: control-without seed treatment; experimental variants – Atuva + Premax-pre-sowing treatment of seeds (drug consumption – 62.5, 125, 250 ml/50 kg of seeds, working solution consumption – 10 l / t). During the flowering phase, plant samples were taken to determine the number and mass of nodules.

The main mechanisms of stimulation of plant growth by microorganisms are: fixation of atmospheric nitrogen, synthesis of phytohormones, suppression of growth of phytopathogenic microorganisms. Previously widely used in production, Nitragine increased the accumulation of nodules in roots and crop residues, which had a very favorable effect on the yield of crops sown after legumes [1, 2, 3]. Pre-sowing treatment of soybean seeds with microbiological preparation Atuva + Premax had a significant impact on the formation of nodule bacteria. In experimental variants, especially in the variant with the use of the drug at a dose of 250 ml/50 kg of seeds (optimal concentration), a larger number of nodules (29.3-32.6, in the control – 26.1 PCs.), larger by weight (9.96-14.04 mg, in the control – 6.80 mg) were formed. It should be noted that if the percentage of inactive nodules (less than 2 mm) and inactive nodules (2-4 mm) that take a minimal part in the symbiotic process is 75.5 %, then in the experimental variants – 40.2-62.5 %. Moreover, with an increase in the rate of consumption of agrochemicals, the percentage of inactive nodules decreases, thereby increasing the nutrition regime, and, consequently, the growth of soy plants is activated.

### **Влияние микробиологического препарата Атува + Премакс на формирование клубеньковых бактерий сои**

*Барчукова А. Я., Чернышева Н. В., Тосунов Я. К.*

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина», Краснодар, Россия

**Аннотация.** Соя характеризуется специфичностью питания, способностью ассимилировать азот из воздуха посредством симбиоза с клубеньковыми бактериями. Микробиологический препарат Атува + Премакс активизирует формирование клубеньковых бактерий.

**Ключевые слова:** соя, Атува + Премакс, инокулянт, азотфиксация, клубеньковые бактерии

Цель – установить оптимальную концентрацию раствора испытуемого препарата для предпосевной обработки семян сои.

Опыты проводились в условиях полевого опыта на опытном участке КубГАУ (учхоз «Кубань», отд. 1). Учетная площадь делянки – 25 м<sup>2</sup>, повторность – четырехкратная. Сорт сои – Вилана. Схема опыта включала: контроль – без обработки семян; опытные варианты – Атува + Премакс – предпосевная обработка семян (расход препарата – 62,5, 125, 250 мл/50 кг семян, расход рабочего раствора – 10 л/т). В фазу цветения отбирали растительные образцы для определения количества и массы клубеньков.

Основными механизмами стимуляции микроорганизмами роста растений являются: фиксация атмосферного азота, синтез фитогормонов, подавление роста фитопатогенных микроорганизмов. Ранее широко используемый в производстве Нитрагин усиливал накопление клубеньков в корнях и пожнивных остатках, что весьма благоприятно сказывалось на урожайности сельскохозяйственных культур, высеваемых после бобовых [1, 2, 3]. Предпосевная обработка семян сои микробиологическим препаратом Атува + Премакс оказала существенное влияние на формирование клубеньковых бактерий. В опытных вариантах, особенно в варианте с применением препарата в дозе 250 мл/50 кг семян (оптимальная концентрация), формировалось большее число клубеньков (29,3-32,6, в контроле – 26,1 шт.), более крупных по массе (9,96-14,04 мг, в контроле – 6,80 мг). При этом следует отметить, что если процент неактивных клубеньков (менее 2 мм) и малоактивных (2-4 мм), принимающих минимальное участие в симбиотическом процессе, составляет 75,5 %, то в опытных вариантах – 40,2-62,5 %. Причем с увеличением нормы расхода агрохимиката процент неактивных клубеньков снижается, тем самым, усиливается режим питания, а, следовательно, активизируется рост растений сои.

1. Баранов В.Ф. Инкрустирование семян сои КПИС – залог высоких урожаев / В.Ф. Баранов, О.М. Ширинян, Н.Ф. Чайка // Сельские зори, 2004. – № 2. – С. 21.
2. Барчукова А.Я. Применение новых препаратов для инокуляции семян сои / А.Я. Барчукова, Э.Ш. Габибуллаев, Т.В. Цикункова, В.Ю. Хреновский // Земледелие, 2010. – № 3. – С. 26-27.
3. Мишустин Е.Н. Микроорганизмы и продуктивность земледелия / Е.Н. Мишустин. – М., 1972. – 343 с.

### **The effect of the biological product on the productivity of plants of the *Solanaceae***

*Baubekova D.G.*

Volzsko–Caspian branch of FSBI «VNIRO» (FSBSI «CaspNIRKh»), Astrakhan, Russia

*E-mail: suslig.zenia@mail.ru*

**Key message.** *A laboratory sample of a biological product has a pronounced phytostimulating activity and does not show a phytotoxic effect. The use of a sample in field experiments increases the yield of a tomato, improving its qualitative and quantitative indicators.*

**Keywords:** *Phytostimulating activity, biological product, productivity, plants of the Solanaceae, agriculture*

One of the strategic areas of biological farming is biotechnological research on the development of technologies for the production and practical application of new environmentally friendly microbial biological products. The use of biological products based on microorganisms that are antagonists of phytopathogens allows not only to reliably control the development of the disease caused by phytopathogens, but also to influence the agronomic characteristics of cultivated crops, including yield.

The aim of the study was to study the effect of a laboratory sample of a biological preparation based on a microorganism of the genus *Bacillus* on the productivity of plants *Solanaceae*.

To achieve the goal in the work, a number of laboratory and field studies were carried out. In laboratory experiments, the phytostimulating activity of a laboratory sample in relation to a test culture (white rhapsody «mustard») was studied. In the field, the effect of the laboratory sample on the agronomic characteristics of the Gift variety tomatoes was studied. Cultivated seedlings before planting in open ground were sprayed with a laboratory sample. The first strait under the root of the plants was carried out in the budding phase, the second strait during flowering. The growing season lasted 5 months.

As a result of preliminary studies, a manifestation of the phytostimulating activity in relation to white mustard by the studied laboratory sample was established. The introduction of a laboratory sample helps to stimulate the growth of seedlings of test plants by 79 % relative to the control. When studying the effect on seed germination of a test plant, the absence of toxic effects was determined: the difference in the number of germinated seeds in the experiment and control did not exceed 30 % and amounted to 3 %.

The use of the studied laboratory sample in field experiments on tomato showed the influence of the sample on the germination of seedlings (increase by 4,0 %), biometric indicators of the culture (increase in plant height by 2,0 %, number of leaves by 2,5 %, shoots by 6,5 %, fruit by 13,0 %), as well as increase yield (by 30,8 %), qualitative and quantitative indicators of tomato (increase in fruit weight by 4,5 %, decrease in the number of diseased fruits by 100,0 %).

### **Действие биологического препарата на урожайность растений семейства Пасленовых**

*Бaubекова Д.Г.*

Волжско-Каспийский филиал ФГБНУ «ВНИРО» («КаспНИРХ»), Астрахань, Россия

**Аннотация.** *Лабораторный образец биопрепарата обладает выраженной фитостимулирующей активностью и не проявляет фитотоксического действия. Применение образца в полевых экспериментах повышает урожайность томата, улучшая его качественные и количественные показатели.*

**Ключевые слова:** *фитостимулирующая активность, биопрепарат, урожайность, растения семейства Пасленовых, сельское хозяйство*

Одним из стратегических направлений биологического земледелия являются биотехнологические исследования по разработке технологий получения и практического применения новых экологически безопасных микробных биопрепаратов. Использование биопрепаратов на основе микроорганизмов–антагонистов фитопатогенов позволяет не только надежно контролировать развитие заболевания, вызванных фитопатогенами, но и влиять на агрономические характеристики возделываемых сельскохозяйственных культур, в том числе и на их урожайность.

Целью исследования являлось изучение влияния лабораторного образца биологического препарата на основе микроорганизма рода *Bacillus* на урожайность растений семейства Пасленовых.

Для достижения поставленной в работе цели проведен ряд лабораторных и полевых исследований. В лабораторных экспериментах во влажных камерах изучена фитостимулирующая активность лабораторного образца по отношению к тест–культуре (горчице белой сорта «Рапсодия»). В полевых условиях исследовано влияние лабораторного образца на агрономические характеристики томатов сорта «Подарочный». Выращенные всходы перед высадкой в открытый грунт опрыскивали лабораторным образцом, первый пролив под корень растений осуществили в фазу бутонизации, второй пролив – во время цветения. Вегетационный опыт длился 5 месяцев.

В результате предварительных исследований установлено проявление исследуемым лабораторным образцом выраженной фитостимулирующей активности по отношению к горчице белой. Внесение лабораторного образца способствует стимуляции роста проростков тест–растения на 79 % по отношению к контролю. При исследовании влияния на всхожесть семян тест–растения определено отсутствие токсического действия: разница в количестве проросших семян в опыте и контроле не превышала 30 % и составляла 3 %.

Использование исследуемого лабораторного образца в полевых экспериментах на томате показало положительное влияние образца на всхожесть всходов (повышение на 4,0 %), биометрические показатели культуры (увеличение высоты растений на 2,0 %, количества листьев на 2,5 %, побегов на 6,5 %, плодов на 13,0 %), а также повышению урожайности (на 30,8 %), качественных и количественных показателей томата (увеличение массы плодов на 4,5 %, снижение количества больных плодов на 100,0 %).

### Artificial symbioses of plants and microorganisms

Baymiev A.Kh., Vershinina Z.R., Chubukova O.V., Matniyazov R.T., Baymiev An.Kh.

Institute of biochemistry and genetics UFRC RAS, Ufa, Russia

E-mail: baymiev@mail.ru

**Key message.** The report discusses the problems of creating artificial associations of cultivated plants and rhizobia using plant and bacterial adhesins, as well as systems of controlled synthesis of growth-promoting substances by rhizospheric microorganisms.

**Keywords:** symbiosis, rhizobia, adhesins, nod genes

The creation of rhizosphere associations of cultivated plants with bacteria that stimulate plant growth and protect them from stresses of a biotic and abiotic nature is one of the most promising directions for the development of modern ecologically oriented agriculture. In this work, we consider the possibility of using plant and bacterial adhesins to create artificial associations of cultivated plants with rhizobia, in which the mechanism of activation of nod genes by root exudates is used for the controlled synthesis of growth-promoting substances. Using genetic engineering methods, we created various transgenic plants (tobacco, rapeseed, tomato, radish) expressed *psl* lectin gene of pea or *rapA1* adhesin gene of *Rhizobium leguminosarum*, and recombinant rhizobia strains containing *gfp/gus* marker genes under the control of *Rhizobium leguminosarum* nodABC promoter. On tobacco, tomato, and rapeseed plants, transgenic for *psl* and *rapA1* genes, showed the selectivity of colonization of their rhizosphere by *R. leguminosarum* bacteria in competition with natural soil microflora. Using rhizobia strains expressing the RFP fluorescent protein gene, a significant increase in the number of bacteria adhered to the roots of transgenic plants was shown compared with the control, which was preserved after a month of cultivation in the soil. It was shown that in recombinant rhizobia strains transformed with plasmids carrying the activation system for the synthesis of nod genes “nodD gene + nod promoter ABC + *gfp/gus*”, the synthesis is activated and the products of marker genes are accumulated when treated with root exudates of host plants.

The strategy of inducible incorporation of target genes of PGPR microorganisms in the plant rhizosphere, with an experimental approach to constructing an “artificial rhizosphere” of nonsymbiophilic plants, selectively and competitively colonized by nodule bacteria, can be successfully used to create stable and effective associations of nonsymbiophilic economically beneficial plants with microorganisms with increased and included growth-promoting activity.

This research was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project 18-34-20004 mol\_a\_ved).

### Искусственные симбиозы растений и микроорганизмов

Баймиев Ал.Х., Вершинина З.Р., Чубукова О.В., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

**Аннотация.** Обсуждаются проблемы создания искусственных ассоциаций культурных растений и ризобий с применением растительных и бактериальных адгезинов, а также системы регулируемого синтеза ростостимулирующих веществ ризосферными микроорганизмами.

**Ключевые слова:** симбиоз, ризобии, адгезины, nod-гены

Создание ризосферных ассоциаций культурных растений с бактериями, стимулирующими рост растений и защищающими их от стрессов биотической и абиотической природы, является одним из наиболее перспективных направлений на пути развития современного экологически ориентированного сельского хозяйства. В представленной работе рассматривается возможность использования растительных и бактериальных адгезинов для создания искусственных ассоциаций культурными растениями с ризобиями, в которых механизм активации *nod*-генов корневыми экссудатами используется для регулируемого синтеза ростостимулирующих веществ. Методами генной инженерии были получены линии различных культурных растений (табак, рапс, томат, редька) трансгенных по генам *psl* лектина гороха и *rapA1* адгезина *Rhizobium leguminosarum*, а также рекомбинантные штаммы ризобий, содержащие маркерные гены *gfp* и *gus* под управлением промотора *nodABC Rhizobium leguminosarum*. На трансгенных по генам *psl* и *rapA1* растениях табака, томата и рапса показана избирательность колонизации их ризосферы бактериями *R. leguminosarum* в условиях конкуренции с естественной микрофлорой почвы. С использованием штаммов ризобий, экспрессирующих ген флуоресцентного белка RFP, показано значительное увеличение количества бактерий адгезировавшихся на корнях трансгенных растений по сравнению с контрольными, которое сохранялось и через месяц выращивания в почве. Показано, что в рекомбинантных штаммах ризобий, трансформированных плазмидами, несущими систему активации синтеза *nod*-генов «ген *nodD* + промотор *nod ABC* + *gfp/gus*» происходит включение синтеза и накопление продуктов маркерных генов при обработке корневыми экссудатами растений-хозяев.

Стратегия индуцируемого включения целевых генов PGPR-микроорганизмов в ризосфере растений вкуче с экспериментальным подходом к конструированию «искусственной ризосферы» несимбиотрофных растений, избирательно и конкурентоспособно колонизируемой клубеньковыми бактериями, может быть с успехом использована для создания стабильных и эффективных ассоциаций несимбиотрофных хозяйственно-полезных растений с микроорганизмами, обладающими повышенной и включаемой ростостимулирующей активностью.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-34-20004 мол\_a\_вед «Ризосферные микроорганизмы с регулируемым синтезом ростостимулирующих веществ».

### High activity of horizontal gene transfer in nodule bacteria as a strategy for interaction with legumes

Baymiev An.Kh., Vladimirova A.A., Akimova E.S., Koryakov I.S., Baymiev Al.Kh.

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia.

E-mail: baymiev@anrb.ru

**Key message.** *The contribution of the legume plant to the formation of the genetic diversity of nodule bacteria and its effect on the activity of horizontal transfer of symbiotic genes in rhizospheric bacteria is studied.*

**Keywords:** *rhizobia, horizontal gene transfer, symbiotic genes, legumes*

The interaction of partners in legume-rhizobium symbiosis occurs along a complex multi-stage path in which both plant and bacterial components take an active part. Leguminous plants of a temperate climate, mostly perennial, undergo multiple cycles of interaction with nodule bacteria during their ontogenesis. An important role in this is played by seasonal cyclicity, in which cycles of nodule formation and dying off occur. In turn, nodule bacteria undergo changes in ecological niches in the plant-soil system in which various selection factors act on bacteria. The main genetic component in the legume-rhizobial interaction is the symbiotic bacterial genes, which largely determine the specificity and effectiveness of legume-rhizobial symbiosis. In the saprophytic state, rhizobia often lead to the loss of symbiotic genes as unnecessary genetic material under the given conditions of existence. The continuous processes of loss and acquisition of *sym* genes associated with "infection and release" require nodule bacteria to have genome plasticity and high horizontal gene transfer activity, which, in turn, is one of the reasons for the high polymorphism of the populations of these microorganisms. The contribution of the legume plant to the formation of the genetic diversity of nodule bacteria, its influence on the activity of horizontal transfer of symbiotic genes in rhizosphere bacteria by studying the patterns of changes in the genetic diversity and phylogenetic composition of nodule bacteria obtained from nodules of perennial wild legume plants at different stages of their ontogenesis, is considered. The mechanism for the formation of the specificity of legume-rhizobial symbiosis with high polymorphism of nodule bacteria, the importance of high mobility of symbiotic genes and the panmictic structure of the rhizobia population for successful symbiotic interaction are also considered.

### Высокая активность горизонтального переноса генов у клубеньковых бактерий как стратегия взаимодействия с бобовыми растениями

Баймиев Ан.Х., Владимировна А.А., Акимова Е.С., Коряков И.С., Баймиев Ал.Х.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия.

**Аннотация.** *Рассмотрен вклад бобового растения в формирование генетического разнообразия клубеньковых бактерий, его влияния на активность горизонтального переноса симбиотических генов у ризосферных бактерий.*

**Ключевые слова:** *ризобии, горизонтальный перенос генов, симбиотические гены, бобовые растения*

Взаимодействие партнеров в бобово-ризобальном симбиозе происходит по сложному многостадийному пути, в котором активное участие принимают как растительные, так и бактериальные компоненты. Бобовые растения, в большей степени умеренного климата, в ходе своего развития проходят многократные циклы взаимодействия с клубеньковыми бактериями. Немаловажную роль в этом играет сезонная цикличность, при котором происходят циклы образования и отмирания клубеньков. В свою очередь у клубеньковых бактерий при этом происходят изменения экологических ниш в системе «растение-почва», в которых на бактерии действуют различные факторы отбора. Основным генетическим компонентом в бобово-ризобальном взаимодействии являются симбиотические гены бактерий, которые определяют во многом специфичность и эффективность бобово-ризобального симбиоза. В сапрофитном состоянии у ризобий часто происходит потеря симбиотических генов, как ненужного генетического материала в данных условиях существования. Постоянные процессы потери и приобретения *sym*-генов, сопряженные с «инфекцией и освобождением», требуют от клубеньковых бактерий пластичности генома и высокой активности горизонтального переноса генов, что, в свою очередь, является одной из причин высокого полиморфизма популяций данных микроорганизмов. Рассмотрен вклад бобового растения в формирование генетического разнообразия клубеньковых бактерий, его влияния на активность горизонтального переноса симбиотических генов у ризосферных бактерий путем изучения закономерностей изменения генетического разнообразия и филогенетического состава клубеньковых бактерий, полученных из клубеньков многолетних дикорастущих бобовых растений на разных стадиях их онтогенеза, а также механизм формирования специфичности бобово-ризобального симбиоза при высокой полиморфности клубеньковых бактерий, значении высокой мобильности симбиотических генов и панмиктической структуры популяции ризобий для успешного симбиотического взаимодействия.

**Response of plants and nitrogen-fixing symbiosis to the toxicity of cadmium and mercury using the pea mutant SGE<sup>Cd</sup>**

Belimov A.A., Shaposhnikov A.I., Syrova D.S., Guro P.V., Yuzikhin O.S., Azarova T.S., Sazanova A.L., Gladkov G.V., Sekste E.A., Safronova V.I.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia  
E-mail: belimov@rambler.ru

**Key message.** The combined effect of Hg and Cd on the growth, elemental composition, root exudation and interactions with rhizobia of pea SGE and its mutant SGE<sup>Cd</sup> was studied in hydroponics and sand. The tolerance mechanisms of legume-rhizobia symbiosis to heavy metals are discussed.

**Keywords:** heavy metals, nitrogen fixation, nodulation, *Pisum sativum*, symbiosis

Heavy metals (HM) cadmium (Cd) and mercury (Hg) are among the most widespread and toxic soil pollutants, that inhibits plant growth and microbial activity. Legume plants are relatively sensitive to heavy metals. Although plant mutants with altered metal tolerance and accumulation have been used to study physiological mechanisms regulating these traits, using these plants to study the role of microorganisms in plant-HMs interactions and phytoremediation of polluted soils is limited. In this respect, the pea (*Pisum sativum* L.) mutant SGE<sup>Cd</sup> with increased Cd tolerance and decreased Hg tolerance (Belimov et al., 2016) is of particular interest.

The previously developed gnotobiotic method of cultivating plants in open plastic vessels with forced aeration by sparging was used to study the combined effect of Hg and Cd on the growth, elemental composition and root exudation. The content of Cd, Hg and nutrients in the obtained plant samples was carried out using an ICPE-9000 emission spectrometer. The total nitrogen content in plants was determined using a Kjeltac 8200 automatic analyzer. The effect of HMs on the root exudation was studied using the UPLC Waters ACQUITY H-class system. Pot experiment was conducted in which plants were inoculated with nodule bacterium and grown in vessels containing washed silica sand enriched with Cd and Hg.

Inhibition of SGE root growth by Cd was approximately 2 times stronger than that of the SGE<sup>Cd</sup> mutant. Mercury treatment did not affect the biomass of SGE roots, but reduced the biomass of SGE<sup>Cd</sup> roots by 2 times. Combined treatment with Cd and Hg of plants did not have an additive or synergistic effect on root biomass of both genotypes. The additive effect of Cd and Hg appeared only on the SGE<sup>Cd</sup> shoots. The Cd content in the roots and shoots of the mutant was higher than that of SGE. The Hg content was also higher in the roots of the mutant. Mercury prevented Cd from entering the roots and transporting this metal into the shoot of the mutant. Cadmium treatment of plants led to a decrease in the content of most nutrients in the roots and shoots, and this effect was manifested to a greater extent for SGE compared to SGE<sup>Cd</sup>. The negative effect of Hg on the consumption of nutrients by roots and their transport to the shoot was found in mutant plants. Important and original observations seem to be the opposite in the action of Cd and Hg on genotypic differences in the transport of elements from the root to the shoot and the leveling of these differences under combined stress.

The treatment with Cd significantly increased the exudation of several amino acids, sugars and organic acids. This effect was manifested to a greater extent in the mutant SGE<sup>Cd</sup>. Stimulation of the exudation of amino acids was also found in Hg treatment to a greater extent in wild-type SGE. The combined action of Cd and Hg did not lead to a further increase in exudation. Cluster dendrograms were constructed showing the similarity and differences of the exudation profiles by roots SGE and SGE<sup>Cd</sup>. The obtained results indicate various mechanisms of exudation of the studied fractions, while the most pronounced differences are observed between the fractions of amino acids or sugars with organic acids.

Enrichment of sand with Cd reduced the biomass of roots and shoots in control and inoculated plants of only wild-type SGE, and Hg reduced only the biomass of shoots of inoculated plants SGE<sup>Cd</sup>. Cadmium reduced the nodule biomass in the wild-type SGE, and mercury reduced the nodule biomass in the mutant SGE<sup>Cd</sup>. The combined effect of metals on the biomass of nodules was more negative than the effect of individual metals. The nitrogen fixation activity of plants also decreased. The results suggest the ability of the SGE<sup>Cd</sup> to actively transport nitrogen from the nodule to the root and further to the shoot under stressful conditions. It was established that SGE<sup>Cd</sup> has mechanisms to maintain the effective functioning of the nodule under stress. The reaction of the SGE<sup>Cd</sup> mutant and its symbiotic apparatus to stress caused by the toxicity of Hg and the combination of Hg and Cd was characterized, and valuable information was obtained on the mechanisms of resistance of legume-rhizobial symbiosis to heavy metals.

The work was supported by the Russian Science Foundation (grants 19-16-00097 and 16-16-00080).

Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Malkov N.V., Davies W.J., Tikhonovich I.A. The cadmium tolerant pea (*Pisum sativum* L.) mutant SGE<sup>Cd</sup> is more sensitive to mercury: assessing plant water relations. *J. Exp. Bot.*, 2015, 66(8), 2359-69.

## An integrated approach to design of new biotechnological products to reduce man-induced load on environment

Belovezhets L.A.<sup>1</sup>, Tretyakova M.S.<sup>2</sup>, Markova Yu.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>IRIH SB RAS, Irkutsk, Russia; <sup>2</sup>SIFIBR SB RAS, Irkutsk, Russia

E-mail: lyu-sya@yandex.ru

**Key message.** The regularities of transformation of complex organic substrates (oil, sawdust, hydrolysis lignin) by microbial associations have been established.

**Keywords:** microorganisms, lignocellulose substrates, oil destruction, integrated approach

Industrial and communal human activities are accompanied by strong atmospheric pollutant emission. Currently, the most promising methods for soil remediation are based on the application of a variety of microorganisms and microbial communities.

The present work is aimed at the development of an integrated approach to the biotransformation of lignocellulosic substrates and oil by microorganisms.

It is found that the processes occurring during composting of lignocellulosic waste and remediation of soil from oil have similar features. It is proved that the observed surge in the phytotoxicity of the transformable substrate is due to the effective activity of oxidoreductase enzymes and an increase in the number of microorganisms, which differ in substrate specificity and type of nutrition. Consequently, this accelerates all the processes, thereby significantly reducing the transformation time. After 3-4 months, all indicators of biological activity are normalized, and toxicity does not differ from the control that evidences the completion of the substrate transformation and efficiency of the drugs. Correspondingly, the processes, which without treatment usually last for decades, in the presence of microorganisms take 2–3 months to afford almost non-toxic products. In addition, the comprehensive studies reveal a multi-faceted biological activity of microorganisms, incorporated in the drug composition, which positively affects the properties of the processed lignocellulosic waste and remediation of soil from oil. For instance, it is established that the microorganisms exhibit phyto stimulating effect due to their ability to synthesize biologically active substances such as amino acids and phytohormones. It is also found that the microorganisms can synthesize biosurfactants. The structure and main physical-chemical properties of these surfactants have been studied. It is shown that the effect of these compounds on plant survival under the conditions of soil contamination with oil is owing to emulsification of the oil film on the root surface.

The study was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research, project No. 20-016-00114 A.

## Комплексный подход к созданию новых биотехнологических препаратов для снижения техногенной нагрузки на окружающую среду

Беловежец Л.А.<sup>1</sup>, Третьяков М.С.<sup>2</sup>, Маркова Ю.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ИрИХ СО РАН, Иркутск, Россия; <sup>2</sup>СИФИБР СО РАН, Иркутск, Россия

**Аннотация.** В результате работы выявлены закономерности трансформации сложных органических субстратов (нефть, опилки, гидролизный лигнин) микробными ассоциациями.

**Ключевые слова:** микроорганизмы, лигноцеллюлозные субстраты, нефтедеструкция, комплексный подход

Производственная и бытовая деятельность человека сопровождается выбросом в окружающую среду большого количества загрязняющих веществ. В настоящее время наиболее перспективными являются методы ремедиации, использующие разнообразные микроорганизмы и микробные сообщества.

Целью работы была разработка комплексного подхода к биотрансформации лигноцеллюлозных субстратов и нефти микроорганизмами.

Результаты исследования выявили однотипность процессов, происходящих при компостировании лигноцеллюлозных отходов и ремедиации почв от нефти. Доказано, что наблюдаемый всплеск фитотоксичности трансформируемого субстрата происходит за счет эффективной деятельности оксидоредуктазных ферментов и увеличения численности микроорганизмов, различных по субстратной специфичности и типу питания. Это приводит к ускорению всех процессов, что значительно сокращает сроки трансформации. Через 3-4 месяца все показатели биологической активности нормализуются, а токсичность не отличается от контроля, что свидетельствует об окончании трансформации субстратов и эффективности препаратов. Соответственно, процессы, без обработки растягивающиеся на десятилетия, происходят в течение 2-3 месяцев и приводят к полному отсутствию токсичности продукта. Кроме того, в результате комплексного исследования выявлена многофакторная биологическая деятельность микроорганизмов, входящих в состав препаратов, позитивно влияющая на свойства переработанных лигноцеллюлозных отходов и очистку почвы от нефти. Так, установлено фитостимулирующее действие микроорганизмов, основанное на их способности синтезировать биологически активные вещества, такие как аминокислоты и фитогормоны. Выявлена способность микроорганизмов синтезировать биогенные поверхностно-активные вещества – биосурфактанты, исследованы их структура и основные физико-химические свойства. Доказано, что влияние этих соединений на выживаемость растений в условиях загрязнения почвы нефтью происходит за счет эмульгирования нефтяной пленки на поверхности корней.

Исследование поддержано грантом РФФИ, проект № 20-016-00114 А.



**The effectiveness of the use of strains of soil microorganisms in the cultivation of spring wheat in the Primorsky Krai**Berezhnaya V.V.<sup>1</sup>, Klykov A.G.<sup>1</sup>, Sidorenko M.L.<sup>2</sup>, Bykovskaya A.N.<sup>2</sup><sup>1</sup>FSC of agrobiotechnology in the Far East named after A. K. Chaika, Timiryazevsky, Ussuriysk, Russia; <sup>2</sup>FSC of Biodiversity FEB RAS, Vladivostok, Russia  
E-mail: bereg911@mail.ru

**Key message.** The results of studies of the effects of nitrogen-fixing, phosphate- and potassium-mobilizing strains of microorganisms on the discovery of the potential of spring wheat during pre-sowing seed inoculation and seedling treatment in different phases of growth and development are presented.

**Keywords:** nitrogen-fixing, phosphate and potassium-mobilizing microorganisms, soil, spring wheat

One of the promising methods of cultivating field crops is the use of environmentally friendly farming systems using microbiological fertilizers, which are based on living cultures of soil microorganisms [1, 2]. Presowing treatment of seeds and vegetative plants with these fertilizers reveals the potential of plants due to a decrease in the anthropogenic load on the soil [3].

The goal is to evaluate the effect of presowing seed inoculation and seedling treatment with active strains of soil microorganisms in spring wheat crops in the Primorsky Krai.

Methods. The studies were carried out in 2018-2019. on the experimental field of the Federal State Budget Scientific Institution “Federal Research Center for Agrobiotechnologies of the Far East named after A.K Chaika” (Ussuriysk, stl Timiryazevsky) together with the Federal State Budget Scientific Center “Biodiversity of Terrestrial Biota East Asia” FEB RAS (Vladivostok) on spring wheat cultivars of Primorskaya variety 39. Based on strains of soil nitrogen-fixing, phosphate- and potassium-mobilizing bacteria obtained from a collection of microorganisms of the Federal Research Center for Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, various combinations for presowing treatment of seeds (working fluid solution of 10 liters per ton) and plants in the seedling phase (working fluid solution of 300 liters per hectare) were compiled. As a comparison, the drug “Extrasol” and the control version without treatments were used.

The results of the studies showed that the nitrogen-fixing, phosphate- and potassium-mobilizing strains of microorganisms used increase their number in the soil, contribute to the mineralization of organic compounds and translate the main nutrients into a form accessible to plants. As a result, the yield of spring wheat increases. Treatment of seeds before sowing and vegetating plants with bacteria in the seedling phase promotes resistance to the defeat of harmful diseases, brown rust (*Puccinia recondita*, *P. trichina*) and septoria (*Septoria tritici*), as well as to damage to the spike by fusarium (*Fusarium graminearum*). Thus, the use of live cultures of soil microorganisms is a promising agrotechnical technique that allows to reveal the potential of spring wheat in the Primorsky Krai.

**Эффективность применения штаммов почвенных микроорганизмов при возделывании яровой пшеницы в условиях Приморского края**Бережная В.В.<sup>1</sup>, Клыков А.Г.<sup>1</sup>, Сидоренко М.Л.<sup>2</sup>, Быковская А.Н.<sup>2</sup><sup>1</sup>ФНЦ агробιοтехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки, Тимирязевский, Уссурйск, Россия; <sup>2</sup>ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, Владивосток, Россия

**Аннотация.** Приводятся результаты исследований действия азотфиксирующих, фосфат- и калиймобилизирующих штаммов микроорганизмов на раскрытие потенциальных возможностей яровой пшеницы при предпосевной инокуляции семян и обработке всходов в разные фазы роста и развития.

**Ключевые слова:** азотфиксирующие, фосфат и калиймобилизирующие микроорганизмы, почва, яровая пшеница

Одним из перспективных приемов возделывания полевых культур – применение экологически безопасных систем земледелия с использованием микробиологических удобрений, основу которых составляют живые культуры почвенных микроорганизмов [1, 2]. Предпосевная обработка семян и вегетирующих растений этими удобрениями позволяет раскрыть потенциальные возможности растений вследствие уменьшения антропогенной нагрузки на почву [3].

Цель - оценить влияние предпосевной инокуляции семян и обработки всходов активными штаммами почвенных микроорганизмов в посевах яровой пшеницы в условиях Приморского края.

Методы. Исследования выполнялись в 2018-2019 гг. на опытном поле ФГБНУ «ФНЦ агробιοтехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки» (г. Уссурйск, п. Тимирязевский) совместно с ФГБНУ «ФНЦ Биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН (г. Владивосток) на посевах яровой пшеницы сорта Приморская 39. На основе штаммов почвенных азотфиксирующих, фосфат- и калиймобилизирующих бактерий полученных из коллекции микроорганизмов ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН составлены различные комбинации для предпосевной обработки семян (раствор рабочей жидкости 10 л/т) и растений в фазу всходов (раствор рабочей жидкости 300 л/га). В качестве сравнения использовали препарат «Экстрасол» и контрольный вариант без обработок.

Результаты исследований показали, что используемые азотфиксирующие, фосфат- и калиймобилизирующие штаммы микроорганизмов увеличивают их численность в почве, способствуют минерализации органических соединений и переводят основные элементы питания в доступную для растений форму. В результате чего повышается урожайность яровой пшеницы. Обработка семян перед посевом и вегетирующих растений бактериями в фазу всходов, способствует устойчивости к поражению вредоносных заболеваний, бурой ржавчине (*Puccinia recondita*, *P. trichina*) и септориозу (*Septoria tritici*), а также к поражению колоса фузариозом (*Fusarium graminearum*). Таким образом, применение живых культур почвенных микроорганизмов – перспективный агротехнический прием, позволяющий раскрыть потенциальные возможности яровой пшеницы в условиях Приморского края.

1. Петров, В.Б. Микробиологические препараты – базовый элемент современных интенсивных агротехнологий растениеводства / В.Б. Петров, В.К. Чеботарь // Достижения науки и техники АПК. – 2011. С. 11-14.
2. Завалин, А.А. Биопрепараты, удобрения и урожай / А.А. Завалин. – М.: ВНИИА, 2005. – 302 с.
3. Бережная В.В., Клыков А.Г., Сидоренко М.Л., Быковская А.Н., Богдан П.М. Влияние бактериальных комплексов на урожайность яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Вестн. ДВО РАН. – 2019. - № 3. – С. 103-111.

**Characterization of *Erwinia amylovora* bacteriophages isolated in Belarus**Besarab N.V.<sup>1</sup>, Golomidova A.K.<sup>2</sup>, Kulikov E.E.<sup>2</sup>, Letarov A.V.<sup>2</sup>, Lagonenko A.L.<sup>1</sup>, Evtushenkov A.N.<sup>1</sup><sup>1</sup>Faculty of Biology, Belarusian State University, Minsk, Belarus; <sup>2</sup>Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences», Winogradsky Institute of Microbiology, Moscow, Russia

E-mail: natal-vasilna@rambler.ru

**Key message.** *Erwinia amylovora* bacteriophages from the *Myoviridae* and *Podoviridae* families were isolated in Belarus. The *E. amylovora* growth rate was 1.6-7.8 times decreased in the presence of investigated bacteriophages.

**Keywords:** *Erwinia amylovora*, bacteriophages, fire blight, *Podoviridae*, *Myoviridae*

Control of phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora*, the causative agent of fire blight, could be conducted using specific bacteriophages, able to suppress the growth of phytopathogen without the use of antibiotics. Such phages can be isolated from natural sources and characterized by various methods before use as a biocontrol agent. This work was aimed to isolate from natural sources and characterize the *E. amylovora* bacteriophages as the potential biocontrol agent to combat the phytopathogen. Isolation of bacteriophages from soil samples was performed using enrichment culture method and bacterial strain *E. amylovora* 1/79Sm was used for bacteriophage propagation. The analysis of the morphology of bacteriophage particles was carried out employing the JEOL JEM-2100 transmission electron microscope (TEM), by using negative staining with 2% uranyl acetate. Bacteriophage protein profiles were analyzed by SDS-PAGE technique in a 10% polyacrylamide gel. The dynamics of bacterial culture growth after infection with bacteriophages were studied during an incubation in LB broth in 96-well plates at a temperature of 28 °C using a Thermo Scientific Multiskan FC photometer. In the present work, *E. amylovora* bacteriophages were isolated from soil samples on the territory of the Minsk and Grodno regions of Belarus. Electron microscopic studies indicated that bacteriophages belong to two tailed phages families – *Myoviridae* (Hena2, Pixel, Dichka, Roscha1, VyarbaS) and *Podoviridae* (Loshitsa2, Fleur, Stepyanka, Micant). The particle sizes of bacteriophages belonged to a range of values: head 54,19±2,38 - 61,15±1,87 nm (*Podoviridae*), 64,10±3,45 - 72,28±1,86 nm, tail 104,30±2,01 - 107,08±2,5 nm (*Myoviridae*). SDS-PAGE analysis of phage proteins indicated similarity of protein profiles among bacteriophages of these groups. The OD<sub>620nm</sub> measurement of the bacterial culture during 5 hours of incubation after infection with bacteriophages (10<sup>6</sup> and 10<sup>7</sup> PFU/ml phage titer) indicated a 1.6–7.8 times decrease of the bacterial culture growth rate. The growth rate was determined by the slope of the linear function of the bacterial culture growth as an approximation model. A more significant effect on the bacterial growth rate was exerted by infection with the investigated bacteriophages of the *Podoviridae* family – a 6,1 (Fleur, Loshitsa2), 7,8 (Stepyanka) times decrease of the growth rate. This study identified new *Myoviridae* and *Podoviridae* bacteriophages capable of reducing *in vitro* growth of *E. amylovora*. This data is of great importance to guide the discovery of new possible plant-protection product to be used in the management of fire blight.

**Bacteria of *Pseudomonas* genus in sugar beet agrocenosis**

Bezler N.V., Petyurenko M.Yu.

Federal State Budgetary Scientific Institution “The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar”, Voronezh  
E-mail: bezler@list.ru

**Key message.** Bacteria of *Pseudomonas* genus able to fix nitrogen and to produce heteroauxin are developed on roots of sugar beet. Their isolation from rhizoplane and introduction onto surface of sugar beet leaf apparatus promotes development of aerobic spore-forming bacteria, ammonifiers, and nitrogen immobilizers that activates growing of leaf blade growth, syntheses of sucrose and growth of beet roots.

**Keywords:** bacteria, *Pseudomonas* sp., *P. fluorescens*, ammonifiers, immobilizers

Bacteria of *Pseudomonas* genus are assigned to microorganisms capable to activate growth and development of plants at the expense of atmosphere nitrogen fixation and physiologically active substances production. Pseudomonads are one of the most numerous groups of microorganisms in the zone near plant roots and remarkable for great colonizing ability [1]. Their use in agriculture is one of actual directions of ecological agriculture development.

Aim of the investigations is to study influence of *Pseudomonas* genus bacteria isolated from sugar beet rhizoplane on microbial community of leaves and to reveal interaction between the bacteria and plants.

In the Laboratory of soil ecological-microbiological studies (Federal State Budgetary Scientific Institution “The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar”), *Pseudomonas fluorescens* 116 and *Pseudomonas* sp. 75 were isolated from sugar beet rhizoplane. Genus and species to which they belonged were identified with the help of molecular-genetic methods, and their ability to fix nitrogen was determined by presence of the gene *nifH* coding nitrogenase [2].

Ability of *P. fluorescens* 116 to produce heteroauxin was shown in a laboratory experiment with Salkovsky reagent.

Based on the laboratory investigations, a field experiment was set up [3]. Cultivation methods were common for the Central Black-Earth Region. Suspension of bacterial cultures were applied by pneumatic sprayer. A titre of viable bacterial cells was  $10^{8-10}$  colony-forming units/ml. Working solution consumption was 200 l/h. The experiment was designed with 4 replications.

The investigation results showed that introduction of *P. fluorescens* 116 and *Pseudomonas* sp.75 onto sugar beet leaf surface made the number of aerobic spore-forming bacteria (with many antagonists of phytopathogens revealed among them) more by 0.0081 and 0.0091 million of colony-forming units per 1 cm<sup>2</sup> of leaf area accordingly (vs. 0.0003 in the control). Quantity of ammonifiers and nitrogen immobilizers increased by 33 % and 0.019-0.136 million of colony-forming units per 1 cm<sup>2</sup> of leaf area accordingly (vs. 0.0001 in the control). It indirectly testified to increase of nitrogenous substances' supply for leaf surface. Practically, it could be compared with foliar application of nitrogen for plants. This method promoted growth of leaf blade mass due to its thickening by 46 %. Sugar content of beet roots improved by 0.3 %, and productivity had a 2.2 t/h gain only when spraying sugar beet with *P. fluorescens* 116  $10^8$  colony-forming units/ml.

**Бактерии рода *Pseudomonas* в агроценозе сахарной свеклы**

Безлер Н.В., Петюренко М.Ю.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара им. А.Л. Мазлумова». Воронеж, Россия

**Аннотация.** На корнях сахарной свеклы развиваются бактерии рода *Pseudomonas*, которые способны фиксировать азот и продуцировать гетероауксин. Выделение их из ризопланы и интродукция на поверхность листового аппарата сахарной свеклы способствует развитию аэробных спорообразующих бактерий, аммонификаторов, иммобилизаторов азота, что активизирует рост листовой пластинки, синтез сахарозы и рост корнеплодов.

**Ключевые слова:** бактерии, *Pseudomonas* sp., *P. fluorescens*, аммонификаторы, иммобилизаторы

Бактерии рода *Pseudomonas* относятся к микроорганизмам, способным активизировать рост и развитие растений за счет фиксации азота атмосферы и продуцирования физиологически активных веществ. Псевдомонады являются одной из наиболее многочисленных групп микроорганизмов в прикорневой зоне растений и отличаются высокими колонизирующими свойствами [1]. Использование их в сельском хозяйстве – одно из актуальных направлений развития экологического земледелия.

Цель исследований: изучить влияние бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из ризопланы сахарной свеклы, на МСО листьев и определить их взаимодействие с растениями.

В лаборатории эколого-микробиологических исследований почв ФГБНУ «ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова» были выделены *Pseudomonas fluorescens* 116 и *Pseudomonas* sp. 75 из ризопланы сахарной свёклы. Родовую и видовую их принадлежность идентифицировали с помощью молекулярно-генетических методов, способность фиксировать азот по наличию гена *nifH*, кодирующего нитрогеназу [2].

В лабораторном опыте с реактивом Сальковского была показана способность *P. fluorescens* 116 продуцировать гетероауксин.

На основании лабораторных исследований был заложен полевой опыт [3]. Технология возделывания – общепринятая для ЦЧР. Суспензию бактериальных культур вносили помповым опрыскивателем. Титр жизнеспособных бактериальных клеток –  $10^{8-10}$  КОЕ/мл. Расход рабочей жидкости – 200 л/га. Повторность опыта – четырехкратная.

Результаты исследований показали, что интродукция *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas* sp. 75 на поверхность листьев сахарной свеклы повысила численность аэробных спорообразующих бактерий (среди них выявлено много антагонистов фитопатогенов) соответственно на 0,0081 и 0,0091 млн КОЕ на 1 см<sup>2</sup> листовой поверхности (в контроле 0,0003). Численность аммонификаторов выросла на 33 %, а иммобилизаторов азота – на 0,019 – 0,136 млн КОЕ на 1 см<sup>2</sup> листовой поверхности (в контроле 0,0001) соответственно. Это косвенно свидетельствует об увеличении поступления азотистых веществ на поверхность листьев. Что практически можно сравнить с внекорневой подкормкой растений азотом. Этот прием способствовал нарастанию массы листовой пластинки за счет увеличения ее толщины на 46%. Сахаристость корнеплодов увеличилась на 0,3 %, а урожайность на 2,2 т/га только при опрыскивании сахарной свеклы *P. fluorescens* 116 с титром  $10^8$  КОЕ/мл.

1. Логинов О.Н. Бактерии *Pseudomonas* и *Azotobacter* как объекты сельскохозяйственной биотехнологии. – М.: Наука, 2005. – 166 с.

2. Безлер Н.В., Хуссейн А.С., Петюренко М.Ю. ПЦР идентификация и генетическое разнообразие *Pseudomonas fluorescens*, выделенных из агроценоза сахарной свёклы (*Beta vulgaris* L.) // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2016. – № 1. – С. 43-49.

3. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта: с основами статистической обработки результатов исследований, 5-е изд., доп. и перераб. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.



## Efficient media for high production of microbial lipase from *Bacillus Subtilis* (BSK-L) using response surface methodology for enantiopure synthesis of drug molecules

Bhushan Indu

School of Biotechnology, Shri Mata Vaishno Devi University, Katra, India

E-mail: indu.bhushan@smvdu.ac.in; sharmasmvdu92@gmail.com

**Key message.** Lipases are a multipurpose enzyme that holds a significant position in industrial applications due to its ability to catalyse a large number of reactions such as hydrolysis, esterification, interesterification, transesterification which makes it a potential candidate. It is also used for the separation of chiral drugs from the racemic mixture and this property of lipase is considered very important in pharmaceutical industries for the synthesis of enantiopure bioactive molecules. Assuming the tremendous importance of lipases, as stereoselective biocatalysts, in pharmaceuticals and various other commercial applications, industrial enzymologists have been forced to search for those microorganisms which are able to produce novel biocatalysts at reasonably high yield. In the present study microbial lipase was isolated from the water sample of pond at Katra, Jammu and Kashmir (India). This enzyme has shown wide specificity and higher enantioselectivity, which make it pharmaceutical important enzyme. To make it economical for industrial application, it was produced on cheap nutrient media using Response Surface Methodology and got maximum production. It was used for resolution of chiral drugs and the significant results obtained during the course of work shall have potential towards pharmaceutical industries.

**Keywords:** microbial lipase, enantioselectivity, hydrolysis and response surface methodology

Relevance and purpose of work: Microbial lipases are known to depict diverse properties and substrate specificity, making them a potential source for various industrial applications. Several microbial lipases are produced commercially but their high cost and poor stability seem to be a major factor in their successful commercial applications. A crucial factor of industrial prices of these enzymes is the culture media composition that is constantly under review by researchers. In the present study, maximum lipase production by *Bacillus Subtilis* (BSK-L), was achieved using response surface methodology (RSM). This strain was collected from the water sample of Pond at Katra, J&K (India). The work is very relevant based on the review of literature and background of the area of research. The methodologies have been utilized accordingly and work has been done carefully towards achieving the objectives.

Methods: Culture medium parameters such as low and high cost carbon & nitrogen sources, substrates, temperature, pH, salts, metal ions and incubation time were evaluated. The production of lipase was optimized through RSM based on central composite design. Process optimization involved one variable at time (OVAT), wherein olive oil was used as an inducer and as a carbon source.

Results: Olive oil and peptone were found to be the best carbon and nitrogen sources respectively, whereas, MnSO<sub>4</sub> and temperature observed to be most significant factors for production of lipase from BSK-L. Optimized media components obtained from RSM produced satisfactory result of 7500U/g cell biomass and 12-fold increases in lipase production was achieved than that of conventionally optimized conditions (627 U/g cell biomass). The lipase produced from indigenous strain (BSK-L) was used for resolution of enantiomers of butyl-ketoprofen via hydrolysis.

Conclusion: In this investigation, significant enhancement in the production of microbial lipases was obtained using statistical tools. The isolated enzyme used for racemic resolution of ketoprofen butyl esters which exhibited better enantiomeric excess of 70% ee compared to commercially available *Candida antarctica* lipase (63% ee). This potential of lipase can be exploited in pharmaceutical industry.

## Genetically transformed plants growing in Russia: bans and punishments

*Bogatyreva N.V.*

Saratov State Law Academy, Saratov, Russian Federation

*E-mail: nvbogatyreva@gmail.com*

**Key message.** *The authors analyze the Russian system of prohibitions on work with plants obtained by genomic technologies and penalties for their violation. They further conclude there is an imbalance in this system.*

**Keywords:** *regulation of genomic technologies, administrative responsibility, control over the release of GMOs, ban on the cultivation of GMOs*

The global climate change and increased cost of imported agricultural products due to the ruble depreciation cause increased attention to the development of Russia's own technologies in production of new crops varieties with increased yield and resistance to unfavourable climatic conditions, including those genetically modified and genetically edited (GM- and GE-). In this context, it is important to correctly determine what falls under the GM-plants cultivation ban in Russia and what are the consequences of this ban's violation. Such assessment gets complicated due to inconsistencies in the Russian legislation and lacunae in the law. The results of the research show that it is formally allowed in the Russian Federation to grow plants that have no genetic engineering material, the introduction of which could not be caused by natural processes (Article 50 Federal Law No. 358). It means that GE-plants are formally not prohibited in Russia. However, the rules for issuing conclusions on the equivalence of genetic modifications to natural processes, if such are to be grown for food production, have not been established in Russia. It is impossible to register a GE-plant in the absence of such a conclusion. In fact, this is an unofficial administrative ban on cultivation of GE-plants for food production. At the same time, liability for violation of the GM-plants cultivation ban in the law is also not established. There is a liability for the cultivation of GM-plants for economic purposes without a certificate of registration, but this is limited to organizations and their officials (Article 6.3.1 of the Administrative Code of the Russian Federation). Only organizations growing GE-plants can become the subject of such responsibility in case the court classifies these objects as GMOs, i.e. as organisms other than natural ones (Article 2 Federal Law No. 86). The cultivation of GM- and GE-plants by farmers and other private persons is not punishable, although prohibited. Thus, the current prohibition system in the field of growing GM- and GE-plants is unbalanced and creates unwanted consequences for the Russian economic security, as it is not profitable for investors to invest in research, accompanied by significant external legal risks.

This work was supported financially by the Russian Foundation for Basic Research (Project No.18-29-14048mk).

## Выращивание генетически трансформированных растений в России: что запрещено и что наказуемо

*Богатырева Н.В.*

ФГБОУ ВО «Саратовская государственная юридическая академия», Саратов, Россия

**Аннотация.** *Проанализирована система запретов в РФ на работы с растениями, полученными с применением геномных технологий, а также наказаний за их несоблюдение. Сформулирован вывод о несбалансированности такой системы.*

**Ключевые слова:** *регулирование геномных технологий, административная ответственность, контроль за выпуском ГМО, запрет на выращивание ГМО*

Глобальное изменение климатических условий, повышение стоимости импортной сельскохозяйственной продукции из-за падения курса рубля обуславливают повышенное внимание к развитию в РФ собственных разработок по получению новых сортов сельскохозяйственных растений с повышенной урожайностью, устойчивостью к неблагоприятным климатическим условиям, в том числе геномно-модифицированных и геномно-редактируемых (далее – ГМ- и ГР-). В данных условиях важно верно определять, что попадает под законодательный запрет выращивания в России ГМ-растений и каковы последствия его несоблюдения. Оценка затрудняется несогласованностью действующего законодательства и его пробельностью. Результаты исследования показывают, что в РФ формально разрешено выращивание растений, в которых отсутствует генно-инженерный материал, внесение которого не может являться результатом естественных процессов (ст. 50 № 358-ФЗ), то есть ГР-растения не попадают под запрет. Однако отсутствует официальная методика проведения исследования на соответствие генетической модификации естественным процессам, если их планируется использовать для получения продуктов питания. В отсутствие заключения такого исследования зарегистрировать ГР-растения не получится. По сути, это неофициальный, административный запрет на их выращивание. В то же время ответственности за нарушение запрета на выращивание ГМ-растений в законе не установлено. За выращивание ГМ-растений в хозяйственных целях без свидетельства о регистрации ответственность есть только для организаций и их должностных лиц (ст. 6.3.1 КоАП РФ). Под эту ответственность могут попасть только организации, выращивающие ГР-растения, если суд посчитает, что они должны быть классифицированы как ГМО, то есть организмы, отличные от природных (ст. 2 № 86-ФЗ). Выращивание ГМ- и ГР-растений частными лицами, таким образом, административно не наказуемо, хоть и запрещено. Таким образом, действующая система запретов в сфере выращивания ГМ- и ГР-растений несбалансирована и в конечном итоге создает нежелательные последствия для экономической безопасности РФ из-за нежелания инвесторов вкладывать деньги в исследования, сопровождающиеся значительными внешними правовыми рисками.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-14048.

**Synthesis and anti-phytopathogenic activity of some water-soluble isatin hydrazones**Bogdanov A.V.<sup>1</sup>, Tsvileva O.M.<sup>2</sup>, Gil'fanova A.R.<sup>1</sup>, Voloshina A.D.<sup>1</sup>, Bukharov S.V.<sup>3</sup><sup>1</sup>A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry FRC KSC RAS, Kazan, Russia; <sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Saratov, Russia; <sup>3</sup>Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia

E-mail: abogdanov@inbox.ru

**Key message.** The activity of new isatin derivatives against bacterial phytopathogens was first studied. The high activity of compounds containing alkyl substituents at the ammonium nitrogen atom and the phenolic fragment is shown.

**Keywords:** heterocycles, phytopathogens, antimicrobial activity, isatin

Isatin (indoline-2,3-dione) is an object of natural origin, various heterocyclic compounds having a wide spectrum of biological activity can be obtained on its basis. So, the Schiff- or Mannich-Isatin bases exhibit various types of activity (antiviral, antibacterial, fungicidal). However, the solubility of isatin acylhydrazones in water remains an urgent problem.

In this work, the synthesis of new isatin acylhydrazones containing a positively charged nitrogen atom (trimethylammonium, pyridinium) was first carried out. The approach found makes it possible to obtain with high yields isatin acylhydrazones soluble in water and organic solvents, which have high antimicrobial activity and low cytotoxicity. The study of antibacterial activity by the method of diffusion into agar (analysis of the size of the zones of inhibition) showed the high potential of these compounds in the search for effective agents against bacterial phytopathogens. Preliminary results of the determination of bactericidal activity with *M. luteus* B-109, *P. atrosepticum* 1043, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* MI, *Ps. fluorescens* EL-2.1, *X. campestris* B-610 indicate non-zero activity against bacterial test systems of all samples studied. A commercially available 0.05% solution of chlorhexidine bigluconate was used as a comparison drug. Depending on the bacterial test system, many of the samples were characterized by an inhibition zone width of at least 4 mm. Among the entire series of compounds studied, only two samples showed the ability to form a zone of inhibition of growth of phytopathogens with a width of at least 3 mm only in isolated cases. Other compounds had higher activity. So, at this preliminary stage of research, it could be concluded that the test compounds containing the electron-donating substituent in the aromatic fragment of the heterocycle, the spatially hindered phenolic fragment and the trimethylammonium or 2,3-dimethylpyridinium fragment exert the most positive effect on their anti-phytopathogenic activity.

The synthetic part of the work was carried out as part of the state task № 0217-2018-003.

The study of biological activity was carried out in the framework of the state task № AAAA-A17-117102740098-8.

**Синтез и антифитопатогенная активность некоторых водорастворимых гидразонов изатина**Богданов А.В.<sup>1</sup>, Цвилева О.М.<sup>2</sup>, А.Р. Гильфанова<sup>1</sup>, А.Д. Волошина<sup>1</sup>, С.В. Бухаров<sup>3</sup><sup>1</sup>Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия; <sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия; <sup>3</sup>Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

**Аннотация.** Впервые исследована активность новых производных изатина в отношении бактериальных фитопатогенов. Показана высокая активность соединений, содержащих алкильные заместители при аммониевом атоме азота и фенольный фрагмент.

**Ключевые слова:** гетероциклы, фитопатогены, антимикробная активность, изатин

Изатин (индолин-2,3-дион) является объектом природного происхождения, на его основе могут быть получены различные гетероциклические соединения, обладающие широким спектром биологической активности. Так, основания Шиффа или Манниха изатина проявляют различные виды активности (противовирусную, антибактериальную, фунгицидную). Однако на сегодняшний день остается актуальной проблема растворимости ацилгидразонов изатина в воде.

В данной работе был впервые осуществлен синтез новых ацилгидразонов изатина, содержащих положительно-заряженный атом азота (триметиламмониевый, пиридиниевый). Найденный подход позволяет получать с высокими выходами растворимые в воде и органических растворителях ацилгидразоны на основе изатина, обладающие высокой антимикробной активностью при низкой цитотоксичности. Исследование антибактериальной активности по методу диффузии в агар (анализ размеров зон ингибирования) показал на высокий потенциал данных соединений в поиске эффективных агентов против бактериальных фитопатогенов. Предварительные результаты определения бактерицидной активности с *M. luteus* B-109, *P. atrosepticum* 1043, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* MI, *Ps. fluorescens* EL-2.1, *X. campestris* B-610 указывают на ненулевую активность против бактериальных тест-систем у всех исследованных образцов. В качестве препарата сравнения был использован коммерчески доступный 0,05%-ый раствор хлоргексидина биглюконата. В зависимости от бактериальной тест-системы, многие из образцов характеризовались величиной ширины зоны ингибирования не менее 4 мм. Среди всего ряда исследованных соединений, всего два образца только в единичных случаях проявляли способность формировать зону ингибирования роста фитопатогенов шириной не менее 3 мм. Другие препараты обладали более высокой активностью. Так, на данном предварительном этапе исследований можно сказать, что наиболее положительный эффект в отношении их антифитопатогенной активности проявляют тестируемые соединения, содержащие электронодонорный заместитель в ароматическом фрагменте гетероцикла, пространственно затрудненный фенольный фрагмент и триметиламмониевый или 2,3-диметилпиридиниевый фрагмент.

Синтетическая часть работы была осуществлена в рамках государственного задания (тема № 0217-2018-003).

Исследование биологической активности проведено в рамках государственного задания (тема № AAAA-A17-117102740098-8).

## Screening of promising bacterial strains against pests of Lepidoptera

Bondarchuk E.Yu., Asaturova A.M.

FSBI "All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection", Krasnodar, Russia

E-mail: alena\_fox95@mail.ru

**Key message.** In laboratory conditions, a screening of 27 new aboriginal strains of bacteria from the Bioresource collection of the Federal State Budgetary Scientific Institution VNIIBZR "State collection of entomocariphages and microorganisms" was carried out. As a result of the research, 6 new strains of bacteria with high and 2 strains with medium antagonistic activity were identified, which will be further considered for the next stage of research.

**Keywords:** biological plant protection, bacterial agents, bioinsecticides, *Cydia pomonella*

The apple moth (*Cydia pomonella*) is the most common pest in fruit orchards. Damaged fruits fall off prematurely, lose marketability and storage capacity. The search for effective biological agents is an important task of agrobiotechnology, directly related to the creation of biological products for controlling the number of harmful organisms [1, 2].

In laboratory conditions, screening of new aboriginal strains of bacteria from the Bioresource collection of the FGBNU VNIIBZR "State collection of entomocariphages and microorganisms" was carried out. As a test object at the initial stage of screening, larvae of the laboratory population of the wax moth (*Galleria mellonella* L.) were selected. The biological effectiveness was determined by the number of dead and surviving insects in each variant on the 3rd and 5th days after treatment [3].

A detailed examination of the results obtained made it possible to differentiate a number of strains by their insecticidal activity. Thus, 6 strains with a pronounced and 2 strains with an average entomopathogenic effect were isolated. Strains BZR 588, BZR 1159, BZR 936, BZR 206, BZR 920 and BZR 277 showed the maximum efficiency - the death of caterpillars on the 5th day ranged from 84 to 95.3%. It is important to note that these strains showed a high mortality rate of insects already on the 3rd day after treatment (from 72.1 to 95.3%), while strains BZR 336g and BZR 673, on the contrary, showed weak activity on the larvae of the honeycomb moth – 4 and 2.6% on the 3rd day; 4 and 7.2% on the 5th day, respectively.

So, as a result of the research, new strains of bacteria with high antagonistic activity against honeycomb moth (*Galleria mellonella* L.) were identified, which will be further considered for the next stage of research.

Isolation of pure cultures and screening of bacterial strains were carried out in accordance with State Order No. 075-00376-19-00 Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of research work on topic No. 0686-2019-0013 edges No. 19-416-233037 r\_mol\_a.

## Скрининг перспективных штаммов бактерий в отношении вредителей отряда Lepidoptera.

Бондарчук Е. Ю., Асатурова А. М.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений», Краснодар, Россия

**Аннотация.** В лабораторных условиях был проведен скрининг 27 новых аборигенных штаммов бактерий из Биоресурсной коллекции ФГБНУ ВНИИБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов». В результате исследований, было выявлено 6 новых штаммов бактерий с высокой и 2 штамма со средней антагонистической активностью, которые в дальнейшем будут рассматриваться для проведения следующего этапа исследований.

**Ключевые слова:** биологическая защита растений, бактериальные агенты, биоинсектициды, *Cydia pomonella*

Яблонная плодовая жорка (*Cydia pomonella*) – наиболее распространенный вредитель плодовых садов. Поврежденные плоды преждевременно опадают, теряют товарные качества и способность к хранению. Поиск эффективных биологических агентов – важная задача агроботехнологии, непосредственно связанная с созданием биопрепаратов для контроля численности вредных организмов [1, 2].

В лабораторных условиях был проведен скрининг новых аборигенных штаммов бактерий из Биоресурсной коллекции ФГБНУ ВНИИБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов». В качестве тест-объекта на начальном этапе скрининга были выбраны личинки лабораторной популяции вошиной моли (*Galleria mellonella* L.). Биологическую эффективность определяли по количеству погибших и выживших насекомых в каждом варианте на 3 и 5 сутки после обработки [3].

Детальное рассмотрение полученных результатов позволило дифференцировать ряд штаммов по инсектицидной активности. Таким образом, было выделено 6 штаммов с выраженным и 2 штамма со средним энтомопатогенным действием. Штаммы BZR 588, BZR 1159, BZR 936, BZR 206, BZR 920 и BZR 277 показали максимальную эффективность – гибель гусениц на 5 сутки составила от 84 до 95,3%. Важно отметить, что у данных штаммов уже на 3 сутки после обработки проявлялась высокая смертность насекомых (от 72,1 до 95,3%) Тогда как, штаммы BZR 336g и BZR 673, наоборот, проявили слабую активность на личинках вошиной моли – 4 и 2,6% на 3 сутки; 4 и 7,2 % на 5 сутки соответственно.

Итак, в результате исследований, были выявлены новые штаммы бактерий с высокой антагонистической активностью в отношении вошиной моли (*Galleria mellonella* L.), которые в дальнейшем будут рассматриваться для проведения следующего этапа исследований.

Выделение чистых культур и скрининг штаммов бактерий выполнены согласно Государственному заданию №075-00376-19-00 Министерство науки и высшего образования РФ в рамках НИР по теме № 0686-2019-0013, исследования инсектицидной активности штаммов выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ и администрации Краснодарского края № 19-416-233037 p\_mol\_a.

1. Daisley B. A. et al. Microbiota-mediated modulation of organophosphate insecticide toxicity by species-dependent interactions with *Lactobacilli* in a *Drosophila melanogaster* insect model // Appl. Environ. Microbiol. – 2018. – Т. 84. – №. 9. – С. e02820-17.
2. Штерншис М. В. Тенденции развития биотехнологии микробных средств защиты растений в России // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2012. №2 С-18.
3. Буров В.Н., Тютюрев С.Л., Сухорученко Г.И., Петрова Т.М. Методы оценки экологической безопасности пестицидов при использовании их в интегрированной защите растений. Методические указания. – СПб., 1995. – 14 с.

## The role of heterotrimeric G proteins in the control of the development of symbiosis of leguminous plants with nodule bacteria

Bovin A.D., Pavlova O.A., Kustova D.V., Leppyanen I.V., Dolgikh E.A.  
ARRIAM, Saint Petersburg, Russia  
E-mail: dol2helen@yahoo.com

**Key message.** In this work, we analyzed the localization and effect of suppression of gene expression of  $\beta$ -subunits of G-proteins on nodule formation. The possible interaction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits with a set of signal regulators *in vitro* was revealed.

**Keywords:** heterotrimeric G-proteins, nodulation, signaling pathways, legumes

Heterotrimeric G proteins are known regulators of animal signaling pathways, but evidence of the presence of G proteins in plants was obtained only a few years ago. The interest in studying heterotrimeric plant G-proteins as master regulators of signaling pathways is due to their interaction with phospholipases C and D, protein kinases, as well as the effect on reactive oxygen species formation and calcium metabolism in cells.

The aim of our work was to elucidate the role of heterotrimeric G proteins in the control of nodulation in leguminous plants – *Pisum sativum* and *Medicago truncatula*. To this end, the effect of RNA interference suppression of the expression of the *Gbeta1* and *Gbeta2* genes encoding the  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-subunits of the G protein in transgenic roots of *P. sativum* and *M. truncatula* on the development of symbiosis was evaluated. To identify possible targets of action in the cell, an analysis of the interaction of various  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -subunits of G proteins with new and known components of the signaling pathway activated by the plant reception of Nod-factor rhizobia signal molecules by co-immunoprecipitation. The localization of the expression of *Gbeta1* and *Gbeta2* genes in plant roots in response to inoculation using reporter constructs *pMtGbeta1::Tomato* and *pMtGbeta2::Tomato* containing the promoters of the corresponding genes was studied.

As a result, it was shown that suppression of *Gbeta1* gene expression in the roots of *P. sativum* and *M. truncatula* led to a significant decrease in nodule number compared to control plants transformed with the vector containing the glucuronidase gene (GUS control). Suppression of *Gbeta2* expression in the roots led to disturbances in the primordia formation and further development of nodules and lateral roots in *P. sativum* and *M. truncatula*. This effect may be associated with alterations in the synthesis and/or reception of auxins. The possible interaction of pea  $\alpha$ 2-subunit with the kinase domain of the receptor for Nod factors necessary for initiating the development of symbiosis was shown by co-immunoprecipitation. In addition, the interaction of the  $\beta$ 1-subunit of pea G protein with annexin 4, a possible regulator of the signaling pathway activated by Nod factors, was revealed.

The research was supported by RSF (project No. 16-16-10043П).

## Роль гетеротримерных G-белков в контроле развития симбиоза бобовых растений с клубеньковыми бактериями

Бовин А.Д., Павлова О.А., Кустова Д.В., Леппянен И.В., Долгих Е.А.  
ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** В данной работе изучены локализация и влияние подавления экспрессии генов  $\beta$ -субъединиц G-белков на клубенькообразование. Выявлено возможное взаимодействие  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц с рядом сигнальных регуляторов развития симбиоза.

**Ключевые слова:** гетеротримерные G-белки, клубенькообразование, сигнальные пути, бобовые растения

Гетеротримерные G-белки являются известными регуляторами сигнальных путей у животных, но только несколько лет назад были получены доказательства наличия G-белков у растений. Интерес к изучению гетеротримерных G-белков растений как мастер-регуляторов сигнальных путей обусловлен их взаимодействием с фосфолипазами C и D, протеинкиназами, а также влиянием на образование активных форм кислорода и кальциевый обмен в клетках.

Целью нашей работы явилось выяснение роли гетеротримерных G-белков в контроле процесса клубенькообразования у бобовых растений – *Pisum sativum* и *Medicago truncatula*. Для этого было оценено влияние подавления методом РНК-интерференции экспрессии генов *Gbeta1* и *Gbeta2*, кодирующих  $\beta$ 1 и  $\beta$ 2-субъединицы G-белка, в трансгенных корнях *P. sativum* и *M. truncatula* на развитие симбиоза. Для выявления возможных мишеней действия в клетке проведен анализ взаимодействия различных  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц G-белков с новыми и известными компонентами сигнального пути, активируемого при рецепции растениями сигнальных молекул ризобий Nod-факторов, методом ко-иммунопреципитации. Изучена локализация экспрессии генов *Gbeta1* и *Gbeta2* в корнях растений в ответ инокуляцию при помощи репортерных конструкций *pMtGbeta1::Tomato* и *pMtGbeta2::Tomato*, содержащих промоторы изучаемых генов.

В результате было показано, что подавление экспрессии гена *Gbeta1* в корнях *P. sativum* и *M. truncatula* привело к существенному снижению образования клубеньков по сравнению с контрольными растениями, трансформированными вектором с геном глюкуронидазы (*GUS* – контроль). Подавление экспрессии *Gbeta2* в корнях *P. sativum* и *M. truncatula* привело к нарушениям закладки примордиев и дальнейшего развития клубеньков и боковых корней у *P. sativum* и *M. truncatula*. Данный эффект может быть связан с изменением синтеза и/или рецепции ауксинов. Методом ко-иммунопреципитации было показано возможное взаимодействие  $\alpha$ 2-субъединицы гороха с киназным доменом рецептора к Nod-факторам, необходимого для инициации развития симбиоза. Помимо этого, выявлено взаимодействие  $\beta$ 1-субъединицы G-белка гороха с аннексином 4 – возможным регулятором сигнального пути, активируемого Nod-факторами.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (проект № 16-16-10043П).



## The effect of melatonin and IAA on the growth of *Arabidopsis thaliana* cotyledons seedlings in different spectral composition of the light

Boyko E.V., Golovatskaya I.F.

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

E-mail: CaterinaSoloveva@gmail.com

**Key message.** We studied the effect of melatonin and IAA on the growth of *Arabidopsis thaliana* cotyledons seedlings in red and blue light. The mutual influence of melatonin and IAA on the regulation of cotyledon growth under selective light was shown.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, auxin, melatonin, selective light, in vitro

Melatonin is a substance of indole nature, is present in almost all prokaryotic and eukaryotic organisms. Like animals, the precursor of melatonin (Mel) in plants is tryptophan, which serves as the precursor of indole-3-acetic acid (IAA). The available data indicate the multiple functions of Mel, which has the signal properties of a regulator of integral physiological processes and is a universal antistressor. Of particular importance in the life of plants is the light factor, characterized by qualitative and quantitative parameters. The regulatory role of light, to a greater extent, is determined by its spectral composition [1]. The functional role of Mel in the regulation of growth under selective light is not clear. In this regard, the aim of this study was to study the effect of Mel and IAA on the growth of *A. thaliana* cotyledons in red (RL) and blue (BL) light. The object of the study was wild-type *A. thaliana* Col plants and the *axr 1-3* mutant line with impaired transduction of the auxin signal. The plants were grown for 7 days under sterile conditions on a solid nutrient medium Murashige and Skoog, not containing (control) or containing 0.1 pM Mel, 1 nM IAA, 0.1 pM Mel + 1 nM IAA (experiment) on RL and BL ( $140 \pm 10 \mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}$ ).

As a result of the study, we found for both lines a greater stimulating effect of BL on the extension of the surface of the cotyledons compared with the action of RL. It was shown that 1 nM IAA had an inhibitory effect on the growth of wild-type cotyledons on BL. In turn, 0.1 pM Mel had a stimulating effect on RL and an inhibitory effect on BL in both lines. Great sensitivity to Mel was manifested in the wild type. With the combined action of factors on RL, IAA removed the stimulating effect of Mel, while on BL IAA reduced the inhibition caused by Mel. Thus, the mutual influence of melatonin and IAA on the regulation of cotyledon growth under selective light was shown.

## Влияние мелатонина и ИУК на рост семядолей проростков *Arabidopsis thaliana* на свету разного спектрального состава

Бойко Е.В., Головацкая И.Ф.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия

**Аннотация.** Исследовали влияние мелатонина и ИУК на рост семядолей проростков *Arabidopsis thaliana* на красном и синем свету. Было показано взаимное влияние мелатонина и ИУК в регуляции роста семядолей на селективном свету.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana*, ауксин, мелатонин, селективный свет, in vitro

Мелатонин – вещество индольной природы, присутствует практически во всех прокариотических и эукариотических организмах. Как и у животных, предшественником мелатонина (Мел) в растениях является триптофан, служащий предшественником индол-3-уксусной кислоты (ИУК). Имеющиеся данные свидетельствуют о множественных функциях Мел, который обладает сигнальными свойствами регулятора интегральных физиологических процессов и является универсальным антистрессором. Особое значение в жизнедеятельности растений играет световой фактор, характеризующийся качественными и количественными параметрами. Регуляторная роль света, в большей степени, определяется его спектральным составом [1]. Функциональная роль Мел в регуляции роста в условиях селективного света не ясна. В связи с этим целью данного исследования было изучение влияния Мел и ИУК на рост семядолей *A. thaliana* на красном (КС) и синем (СС) свету. Объектом исследования были растения *A. thaliana* дикого типа Col и мутантной линии *axr 1-3* с нарушенной трансдукцией сигнала ауксина. Выращивание растений осуществляли в течение 7 дней в стерильных условиях на твердой питательной среде Мурасиге и Скуга, не содержащей (контроль) или содержащей 0.1 пМ Мел, 1 нМ ИУК, 0.1 пМ Мел + 1 нМ ИУК (опыт) на КС и СС ( $140 \pm 10 \mu\text{моль} / \text{м}^2\text{с}$ ).

В результате проведенного исследования нами было установлено для обеих линий большее стимулирующее действие СС на растяжение поверхности семядолей по сравнению с действием КС. Показано, что 1 нМ ИУК оказывала ингибирующее действие на рост семядолей дикого типа на СС. В свою очередь 0.1 пМ Мел оказывала стимулирующий эффект на КС и ингибирующий на СС у обеих линий. Большая чувствительность к Мел проявлялась у дикого типа. При совместном действии факторов на КС ИУК снимала стимулирующий эффект Мел, тогда как на СС ИУК снижала вызванное Мел ингибирование. Таким образом показано взаимное влияние Мел и ИУК в регуляции роста семядолей на селективном свету.

## Effect of inoculation of the plant root system by the endophyte *Cylindrocarpon magnusianum* on plant performance when exposed to heavy metal salts

Bukharina I.L., Islamova N.A.

Udmurt State University, Izhevsk, Russia

E-mail: buharin@udmlink.ru

**Key message.** The effect of inoculation of *Cylindrocarpon magnusianum* on plants under the action of heavy metal salts was studied. Effective partnership of the fungus and plants was revealed in the conditions most extreme for the life of plants.

**Keywords:** *Cylindrocarpon magnusianum*; micromycetes; heavy metals; inoculation

In connection with the search for natural bioregulators and biocontrollers of plant resistance to extreme factors, it is of interest to study the role of root fungi of endophytes in the formation of resistance mechanisms in plants, including the formation of metal resistance, and in relation to particularly dangerous chemical elements for plants. One of the promising micromycetes in this regard is *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw.

We have studied the effect of inoculation by a culture of *C. magnusianum* fungus on the formation of adaptive reactions of plants to the action of heavy metal salts in the substrate (using the example of a test culture of tomato *Solanum lycopersicum*).

The experimental scheme included inoculation with a mushroom culture (control population) and mushroom populations previously adapted to different concentrations of heavy metal salts (TM). The inoculated plants were grown in control conditions and on substrates with the introduction of different concentrations of salts of heavy metals (zinc, copper, lead and chromium). Was evaluated the development of fungus infection in the root system of plants and estimation of plant resistance based on pocatella content of nitrates in leaves, biomass and the percentage of dry matter in the aerial part and root system of plants, sodержание photosynthetic pigments (chlorophyll *a* and *b*, carotenoids).

The results did not reveal a stimulating effect that increases the resistance of plants to the action of TM salts in the inoculation of plants by the control population of the fungus *C. magnusianum*. However, a significant effect was established when using TM-adapted mushroom populations.

Fungal infection in the roots of plants in all variants of the experiment was well developed.

It is particularly noted that when using non-biogenic chemical elements, adaptive reactions of plants associated with the content of photosynthetic pigments in leaves and the formation of plant biomass were most significantly manifested in the inoculation of plants by adapted populations of the fungus *C. magnusianum* and in further cultivation of plants on substrates with the addition of chromium and lead salts. This fact may indicate the most effective partnership between the *C. magnusianum* fungus and plants in conditions that are extreme for plant life.

This work was supported by the grant of the Russian Foundation for Basic Research "Postgraduate Student" No. 19-34-50037.

## Влияние инокуляции корневой системы растений эндофитом *Cylindrocarpon magnusianum* на показатели растений при воздействии солей тяжелых металлов

Бухарина И.Л., Исламова Н.А.

Удмуртский государственный университет, Ижевск, Россия

**Аннотация.** Изучено влияние инокуляции *Cylindrocarpon magnusianum* на растения при действии солей тяжелых металлов. Эффективное партнерство гриба и растений выявлено в условиях наиболее экстремальных для жизнедеятельности растений.

**Ключевые слова:** *Cylindrocarpon magnusianum*; микромицеты; тяжелые металлы; инокуляция

В связи с поиском природных биорегуляторов и биоконтроллеров устойчивости растений к экстремальным факторам интерес представляет изучение роли корневых грибов эндофитов в формировании механизмов устойчивости у растений, включая формирование металлрезистентности, причем в отношении особо опасных для растений химических элементов. Одним из перспективных микромицетов в этой связи является *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw.

Нами проведено изучение влияния инокуляции культурой гриба *C. magnusianum* на формирование адаптивных реакций растений к действию солей тяжелых металлов в субстрате (на примере тестовой культуры томата *Solanum lycopersicum*).

Схема эксперимента включала инокуляцию культурой гриба (контрольная популяция) и популяциями гриба, предварительно адаптированными к разным концентрациям солей тяжелых металлов (ТМ). Инокулированные растения выращивались в контрольных условиях и на субстратах с внесением разных концентраций солей тяжелых металлов (цинка, меди, свинца и хрома). Была проведена оценка развития грибной инфекции в корневой системе растений и оценка устойчивости растений на основе показателей содержания нитратов в листьях, биомассы и процентного содержания сухого вещества в надземной части и корневой системе растений, содержания фотосинтетических пигментов (хлорофиллы *a* и *b*, каротиноиды).

Результаты не выявили стимулирующего эффекта, повышающего устойчивость растений к действию солей ТМ, при инокуляции растений контрольной популяцией гриба *C. magnusianum*. Но значительный эффект установлен при использовании адаптированных к ТМ популяций гриба.

Грибная инфекция в корнях растений во всех вариантах опыта была хорошо развита.

Особо отмечено, что при использовании небиогенных химических элементов адаптивные реакции растений, связанные с содержанием фотосинтетических пигментов в листьях и формированием биомассы растений, наиболее значимо проявились при инокуляции растений адаптированными популяциями гриба *C. magnusianum* и при дальнейшем культивировании растений на субстратах с внесением солей хрома и свинца. Этот факт может свидетельствовать о наиболее эффективном партнерстве гриба *C. magnusianum* и растений в условиях экстремальных для жизнедеятельности растений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ "Аспирант" № 19-34-50037.

### Microbial preparations on the basis of endophytic bacteria for nutrition and protection of potatoes from diseases

Chebotar V.K.<sup>1</sup>, Zaplatkin A.N.<sup>1</sup>, Komarova O.V.<sup>1</sup>, Baganova M.E.<sup>1</sup>, Polukhin N.I.<sup>2</sup>, Balakina S.V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>FSBSI All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Siberian Research Institute of Plant Cultivation and Breeding – Branch of Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk region, Russia; <sup>3</sup>FSBSI Leningrad Research Institute of Agriculture "Belogorka", Leningrad region, Russia

E-mail: vladchebotar@rambler.ru

**Key message.** The microbiome of cultivated and wild potato species was studied, effective endophytic bacteria were isolated, and experimental samples of microbial preparations were developed. The effectiveness of microbial preparations based on *Bacillus thuringiensis* W65 and *Paenibacillus xylanexedens* N40 strains in the Leningrad and Novosibirsk regions on new potato varieties is shown.

**Keywords:** endophytes, microbial preparations, nutrition and plant protection

For potato breeding, it is important to use effective and environmentally safe microbial preparations that increase the productivity and resistance of plants to adverse environmental factors and diseases. For this purpose, the microbiome of cultivated and wild potato species was studied, effective endophytic bacteria were isolated, and experimental samples of microbial preparations were developed. Small-scale field experiments conducted in the Leningrad and Novosibirsk regions showed the effectiveness of using experimental samples of microbial preparations based on strains of *Bacillus thuringiensis* W65 and *Paenibacillus xylanexedens* N40 and the biofungicide Bisolbisan on new varieties of potatoes. In experiments in the Novosibirsk region, all tested preparations had a positive effect on the yield of potato tubers of Sambo, Tango and Reggae varieties. The highest yield increases in comparison with the control - by 16-35% were obtained on the Reggae variety, as well as with the biofungicide Bisolbisan and the preparation based on the N40 strain on the Tango variety – by 23-28%. In experiments in the Leningrad region, the largest increases in the tuber crop-by 19-24% - were obtained on the Rozovyi Charodei variety using microbial preparations based on *Bacillus thuringiensis* W65 and *Paenibacillus xylanexedens* N40 strains. By its effect on the yield of this variety, the use of preparations was at the level of chemical plant protection products. Microbial preparations had a positive effect on the formation of the crop of tubers of the medium-early Calibre variety. The yield in the variants with preparations was higher than in the control by 10.9-12.2%. Thus, the use of microbial preparations based on endophytic bacteria isolated from potato tubers can be an effective agricultural method for growing potatoes. The work was carried out with the financial support of the project "Development of potato breeding and seed production in the Russian Federation".

### Микробные препараты на основе эндофитных бактерий для питания и защиты картофеля от болезней

Чеботарь В.К.<sup>1</sup>, Заплаткин А.Н.<sup>1</sup>, Комарова О.В.<sup>1</sup>, Баганова М.Е.<sup>1</sup>, Полухин Н.И.<sup>2</sup>, Балакина С.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>СибНИИРС филиал ИЦиГ, Новосибирская область, Россия; <sup>3</sup>ФГБНУ «Ленинградский научно-исследовательский институт сельского хозяйства «Белогорка», Ленинградская область, Россия

**Аннотация.** Изучен микробиом культурных и диких видов картофеля, выделены эффективные эндофитные бактерии и созданы экспериментальные образцы микробных препаратов. Показана эффективность микробных препаратов на основе штаммов *Bacillus thuringiensis* W65 и *Paenibacillus xylanexedens* N40 в Ленинградской и Новосибирской областях на новых сортах картофеля.

**Ключевые слова:** эндофиты, микробные препараты, питание и защита растений

Для селекции картофеля актуальным является использование эффективных и экологически безопасных микробных препаратов, повышающих продуктивность и устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды и болезням. С этой целью изучен микробиом культурных и диких видов картофеля, выделены эффективные эндофитные бактерии и созданы экспериментальные образцы микробных препаратов. Полевые мелкоделяночные опыты, проведенные в Ленинградской и Новосибирской областях, показали эффективность применения экспериментальных образцов микробных препаратов на основе штаммов *Bacillus thuringiensis* W65 и *Paenibacillus xylanexedens* N40 и биофунгицида Бисолбисан на новых сортах картофеля. В опытах в Новосибирской области все испытываемые препараты оказали положительное влияние на урожай клубней картофеля сортов Самбо, Танго и Регги. Наибольшие прибавки урожая по сравнению с контролем - на 16-35% получены на сорте Регги, а также с препаратом Бисолбисан и препаратом на основе штамма N40 на сорте Танго – на 23-28%. В опытах в Ленинградской области наибольшие прибавки урожая клубней - на 19-24% получены на сорте Розовый Чародей при использовании микробных препаратов на основе штаммов *Bacillus thuringiensis* W65 и *Paenibacillus xylanexedens* N40. По своему действию на урожайность этого сорта применение препаратов было на уровне химических средств защиты растений. Положительное влияние микробные препараты оказали на формирование урожая клубней среднераннего сорта Калибр. Урожайность в вариантах с препаратами была выше, чем в контроле на 10,9-12,2%. Таким образом, использование микробных препаратов на основе эндофитных бактерий, выделенных из клубней картофеля, может быть эффективным агроприемом при выращивании картофеля.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации».



## Detection of strains of endophytic bacteria of the genus *Bacillus* with the most pronounced growth-stimulating and protective properties

Cherepanova E.A., Veselova S.V., Alekseev V.Yu., Maksimov I.V.  
Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Centre  
of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia.  
E-mail: k\_cherepanova@mail.ru

**Key message.** Treatment of wheat with endophytic bacteria increases plant growth and reduces the area of leaf infection, but the degree of manifestation of these properties depends on the bacterial strain.

**Keywords:** wheat, *Bacillus*, resistance, *Stagonospora nodorum*

Agriculture is increasingly using the ability of bacteria to directly inhibit the growth of phytopathogens, penetrate plant tissues without harming the latter and stimulate both growth and plant resistance to biotic and abiotic environmental factors. In this connection, the search for the most effective for plant growth and development of bacterial strains of wheat endosymbionts and study their ability to protect plants from pathogens is relevant.

The aim of the study was to study the influence of endophytic bacterial strains from the laboratory collection on germination energy and germination of seeds, growth of raw and dry biomass, as well as on the resistance of wheat to the causative agent of Septoria nodorum blotch - *Stagonospora nodorum* Berk. fungi.

Strains of *Bacillus* genus bacteria with pronounced fungistatic properties were selected for experiments from the laboratory collection: *B. subtilis* 26D (collection ARRIAM St.-Pb. Pushkin, №128), *B. subtilis* 11VM (ARRIAM №519), *B. thuringiensis* B-6066 (Russian National Collection of Industrial Microorganisms), and isolates bacteria *B. subtilis* Tas1 and *B. subtilis* Tas8-2, isolated from wheat, zoned in the Republic of Bashkortostan. In order to assess the impact of bacteria on wheat resistance to the causative agent of Septoria nodorum blotch, 7-day wheat germ leaves were inoculated with *St. nodorum* spores from the collection of the Plant Immunity Biochemistry Laboratory of IBG RAS were used.

Efficient concentrations of bacterial spore were selected to treat wheat seeds. It is interesting to note that effective concentrations of *B. subtilis* 11BM and *B. subtilis* Tas8-2 were twice lower than in other strains. Concentrations below effective concentrations were weaker in plant growth, and higher concentrations could even inhibit them. Treatment of seeds with bacterial strains and isolates in optimal concentrations increased seed germination by about 30-40 % of the control level. The greatest effect was given by strain *B. subtilis* 26D. The strain of *B. subtilis* 11BM and *B. subtilis* Tas1 were slightly weaker in stimulating seed germination. The treatment of wheat seeds with suspensions of bacterial spores contributed to the increase in the mass of wheat germplants, while the treatment of *B. subtilis* 26D, *B. subtilis* Tas1 and *B. thuringiensis* B-6066 had the strongest effect - in these germplants the dry mass exceeded the mass of untreated bacterial samples by 32 %.

During treatment of *B. subtilis* 11BM and Tas1 the most expressed resistance to the causative agent of Septoria nodorum blotch was shown, which was expressed in 4 times less area of wheat leaf infection in comparison with untreated control. Leaves treated with *B. thuringiensis* B-6066 showed the least resistance to *St. nodorum*. However, even with the last of these strains, the leaf infection area was twice less than that of untreated samples. Summarizing the data obtained, it can be concluded that the *B. subtilis* Tas1 isolate had the most pronounced both stimulating plant growth and sufficiently high protective properties against the pathogenic fungus.

The results of this work can have practical value and help to create environmentally friendly drugs that combine both growth-stimulating and increasing resistance to phytopathogens.

The research has been carried out using equipment from the Regional analytical Centre of collective usage "Agidel" and the

Unique scientific installation "Kodink" with partial financial support of the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) grant № 17-29-08014 (2018).

**Activation of the symbiosis of free nitrogen-fixing bacteria with plants by an additional influx of photosynthesis products to the roots**

Chikov V.I., Akhtyamova G.A., Khamidullina L.A.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia

E-mail: vichikov@bk.ru

**Key message.** An *in vivo* technology is proposed that enhances the export of assimilates from leaves to roots. The possibility of thus increasing the mass of the roots and the formation of additional nitrogen in the soil-plant system is shown.

**Keywords:** photosynthesis, regulation, root growth, microorganisms

Long-term studies of photosynthesis allowed the authors to identify the mechanism of regulation of this process at the level of the leaf and the whole plant. An extracellular enzyme, acid invertase, has proven to be a key regulatory element. When V. I. Chikov, G. A. Akhtyamova, S. N. the primary products of CO<sub>2</sub> absorption (organic acids) in chloroplasts do not completely turn into sugars, they enter the extracellular space and activate invertase, which hydrolyzes the transport product of photosynthesis – sucrose. The hydrolysis products in the apoplast increase the concentration of osmotic substances, which closes the stomata. As a result, the ratio of light and dark processes in chloroplasts becomes balanced. During these studies, complex compounds of metals (Cu and Zn) with ammonia (ammoniates) were found, which, after spraying the plants, alkalinizing the medium in the leaf apoplast, suppress invertase, which enhances photosynthesis and export of sugars from the leaf. It was shown that spraying plants with ammonia (10<sup>-4</sup> M) increases the yield and root mass, which is accompanied by the appearance of additional nitrogen in the soil-plant system. This additional nitrogen increases with a decrease in the amount of mineral nitrogen fertilizers introduced into the soil. The scheme is such that, under certain conditions, fertilizers can be dispensed with altogether. Options are proposed for developing methods for growing plants without fertilizers by increasing the role of microorganisms. Experiments were demonstrated on a standard modernized seeder SZS-3.6, which made it possible to double the number of shoots and the mass of the plant while reducing the amount of fertilizer by a factor of three.

**Активация симбиоза свободных азотфиксирующих бактерий с растениями путем дополнительного притока продуктов фотосинтеза к корням**

Чиков В.И., Ахтямова Г.А., Хамидуллина Л.А.

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН

**Аннотация.** Предлагается технология *in vivo*, которая увеличивает экспорт ассимилятов от листьев к корням. Показана возможность увеличения массы корней и образования дополнительного азота в системе почва-растение.

**Ключевые слова:** фотосинтез, регуляция, рост корней, микроорганизмы

Многолетние исследования фотосинтеза позволили авторам выявить механизм регуляции этого процесса на уровне листа и всего растения. Внеклеточный фермент, кислая инвертаза, оказался ключевым регуляторным элементом. Когда первичные продукты поглощения CO<sub>2</sub> (органические кислоты) в хлоропластах неполностью превращаются в сахара, они попадают во внеклеточное пространство и активируют инвертазу, которая гидролизует транспортный продукт фотосинтеза – сахарозу. Продукты гидролиза в апопласте увеличивают концентрацию осмотических веществ, которая закрывает устьица. В результате соотношение световых и темновых процессов в хлоропластах становится сбалансированным. В ходе этих исследований были обнаружены комплексные соединения металлов (Cu и Zn) с аммиаком (аммиакаты), которые после опрыскивания растений, подщелачивая среду в апопласте листьев, подавляют инвертазу, что усиливает фотосинтез и экспорт сахаров из листьев. Было показано, что опрыскивание растений аммиакатами (10<sup>-4</sup> M) увеличивает урожайность и корневую массу, что сопровождается появлением дополнительного азота в системе почва-растение. Этот дополнительный азот увеличивается с уменьшением количества минеральных азотных удобрений, вносимых в почву. Схема такова, что при определенных условиях можно полностью отказаться от удобрений. Предложены варианты разработки методов выращивания растений без удобрений за счет повышения роли микроорганизмов. Эксперименты были продемонстрированы на стандартной модернизированной сеялке СЗС-3.6, которая позволила удвоить количество побегов и массу растения при одновременном снижении количества удобрений в три раза.

Чиков В.И., Ахтямова Г.А., Баташева С.Н., Михайлов А.Л., Хамидуллина Л.А., Тимофеева О.А. Влияние блокирования гена апопластной инвертазы на фотосинтез в растениях томата // Физиология растений, 2015, том 62, № 1, с. 45–51.

Chikov V.I. The Participation of Apoplast Invertase in the Regulation of Photosynthesis by Stomatal Mechanism. Journal of Plant Sciences 2017; 5(5): 134-145 <http://www.sciencepublishinggroup.com/j/jps> doi: 10.11648/j.jps.20170505.12 ISSN: 2331-0723 (Print); ISSN: 2331-0731 (Online).

Чиков В.И., Ахтямова Г.А., Пахомова В.М. Противоречие между существующей агротехникой и эволюционным развитием растений должно быть устранено // Доклады ТСХА Вып. 291, (часть 11). Москва. Издат. РГАУ\_МСХА. 2019г. С.386- 391.

**Using *nod* genes control system to create rhizospheric microorganisms with regulated gene expression**

Chubukova O.V., Vershinina Z.R., Matnyazov R.T., Baymiev Al. Kh.

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,  
Ufa, Russia

E-mail: chubukova@bk.ru

**Key message.** Inducible vector containing the full-sized *nodD* gene and the promoter region of the *nod*-box under the control of which was cloned the *gfp* gene was constructed. Modified bacteria *R. galegae* in which the synthesis of GFP protein was activated by plant flavonoids were obtained.

**Keywords:** Rhizobia, *nod*-box, growth-promoting associations

Rhizobia are soil nodule bacteria that can to establish a nitrogen-fixing symbiosis with legumes plants. To date, rhizobia are widely used as biofertilizer in agriculture.

The aim of the work was to obtain strains of nodule bacteria with controlled inclusion of target genes, which are induced by plant root secretions.

Methods of molecular cloning were used to obtain genetic engineering constructs. The resulting vectors tested by PCR and DNA sequencing. Expression of the target gene was confirmed by Western blot. Fluorescent-tagged bacteria were observed using a BioZero Analyzer microscope (Keyence, Japan).

The *nod* genes in the rhizobia genomes formed are cassette and in *R. leguminosarum* the *nodD* genes are located adjacent to the *nod*-box promoter region and have different coding directions. The *nodD* protein is activated by plant flavonoids and then induce *nod*-box promoter. We amplified DNA fragment of *R. leguminosarum* containing the full-size *nodD* gene and the *nod*-box promoter. Then, the *gfp* reporter gene was cloned into the pTurboGFP vector under the control of the *nod*-box promoter. Further, the fragment containing the *nodD* + *nod*-box promoter + *gfp* region was cloned into the vector pJN105. The resulting construct pJN105nodDGFP was introduced into rhizobia *R. galegae* 0702 by transformation. The transformed and control strains of *R. galegae* were treated by the following plant flavonoids: apigenin, quercetin, taxifolin, genistein, hesperidin. Western blot analysis and fluorescence microscopy showed that each of these flavonoids induced the expression of the target gene with different levels, which led to the accumulation of GFP protein in the rhizobia cells. Further, on the basis of plasmid pJN105nodD, it is proposed to obtain various constructs for studying the conditions for activation of target genes. The ultimate goal of our research is to create a system for the specific inclusion of the synthesis of various growth-promoting and protective substances in rhizosphere microorganisms induced by plant root secretions.

This work was supported by the grant of the RFBR 18-34-20004 mol\_a\_ved.

**Использование Nod системы ризобий для создания ризосферных микроорганизмов с регулируемой экспрессией генов**

Чубукова О.В., Вершинина З.Л., Матнязов Р.Т., Баймиев Ал.Х.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия.

**Аннотация.** Создана регулируемая векторная конструкция, содержащая полноразмерный ген *nodD* и промоторный участок *nod*-box *R. leguminosarum*, под контролем которого был клонирован ген *gfp*. Были получены модифицированные бактерии *R. galegae*, в которых синтез GFP белка активировался растительными флавоноидами.

**Ключевые слова:** ризобии, *nod*-box, ростостимулирующие ассоциации

Ризобии – это почвенные клубеньковые бактерии, которые способны вступать в азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями. В настоящее время ризобии нашли широкое применение в качестве биоудобрений в сельском хозяйстве.

Целью работы являлось получение штаммов клубеньковых бактерий с регулируемым включением целевых генов, которое индуцируются корневыми выделениями растений.

Для получения генно-инженерных конструкций были использованы методы молекулярного клонирования. Полученные плазмиды проверяли ПЦР, секвенированием ДНК. Экспрессию целевого гена подтверждали вестерн-блот с антителами к GFP белку. Флуоресцентно окрашенные бактерии наблюдали с помощью микроскопа BioZero Analyzer (Keyence, Япония).

*Nod* гены в геномах ризобий расположены компактно, и у *R. leguminosarum* гены *nodD* расположены по соседству с промоторным участком *nod*-box и при этом имеют разное направление кодирования. Индуктором промотора *nod*-box является продукт гена *nodD*, активированный растительными флавоноидами. Нами был амплифицирован фрагмент ДНК *R. leguminosarum*, содержащий полноразмерный ген *nodD* и промотор *nod*-box. Затем в вектор pTurboGFP под контролем промотора *nod*-box был клонирован репортерный ген *gfp*. Далее, фрагмент, содержащий участок *nodD*+промотор *nod*-box+*gfp* был переклонирован в плазмиду широкого круга хозяев pJN105. Полученной конструкцией pJN105nodDGFP были трансформированы ризобии *R. galegae* 0702. Трансформированный и контрольный штаммы *R. galegae* были индуцированы следующими растительными флавоноидами: апигенин, кверцетин, таксифолин, генистеин, гесперидин. Вестерн-блот анализ и флуоресцентная микроскопия показали, что в той или иной степени каждый из указанных флавоноидов индуцировал экспрессию целевого гена, что приводило к накоплению в клетках ризобий GFP белка. Далее на основе плазмиды pJN105nodD предполагается получение различных конструкций для изучения условий активации целевых генов. Конечной целью наших исследований является создание системы специфического включения синтеза различных ростостимулирующих и защитных веществ у ризосферных микроорганизмов, индуцируемого корневыми выделениями растений.

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-34-20004 мол\_a\_вед.

### Studying of fertilization-independent embryo- and endospermogenesis in maize embryo sacs

Chumakov M.I., Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Mazilov S.I., Fadeev V.V., Gutorova O.V., Kolesova A.Yu., Moiseeva E.M.  
Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia  
E-mail: chumakovmi@gmail.com

**Annotation.** The literature and experimental analysis of maize embryo and endospermogenesis genes expression before and after pollination will be presented. Data on the CRISPR/Cas9 editing of maize embryo- and endospermogenesis genes are discussed.

**Keywords:** maize, CRISPR/Cas9, embryo- and endospermogenesis, gamete fusion

The molecular genetic mechanism of asexual reproduction by seeds (apomixis) in maize has not been studied yet, although it is known that the embryo and endosperm can develop without fertilization (fertilization-independent: *fis1*, *fie2* genes) in the ancestor of maize (*Trypsacum*) and, in some modern maize forms [1]. Knowledge of regulation of these processes can help to develop biotechnologies on this basis [2].

Purpose: Studying of the possible mechanisms of fertilization-independent embryo- and end endospermogenesis in maize embryo sacs.

The first part of the report presents the own data concerning expression of gamete interaction (*Zm\_gex2*) and membrane fusion (*Zm\_gsc1*) genes. We obtained for the first-time data on the DNA remodeling and endospermogenesis (*fie1*, *fie2*), genes expression in the parthenogenetic AT-3 maize embryo sac before and after pollination [1].

The second part of this report presents literature data on the genome editing (CRISPR/Cas9) method and our application to maize plants. For the first time, CRISPR/Cas9 vectors containing gRNA to the adhesion (*Zm\_gex2*) and fusion (*Zm\_gsc1*) genes of maize gametes were created. CRISPR/Cas9 constructs were introduced into the genome of KM maize line using in planta and in vitro methods. The insertion analysis for transformed plants using molecular genetic methods will be presented.

This work was carried out within the Program of Basic Research of the state academies of sciences for 2018-2020 (№ AAAA-A17-117102740101-5) and Russian Foundation for Basic Research grants (№18-29-14048mk; №20-016-00020a; №20-316-80020 mol-e-a).

### Исследование независимого от опыления эмбрио- и эндоспермогенеза в зародышевых мешках кукурузы

Чумаков М.И., Волохина И.В., Гусев Ю.С., Мазиллов В.И., Гуторова О.В., Колесова А.Ю., Фадеев В.В., Моисеева Е.М.  
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, 410049 Саратов, Россия

**Аннотация.** Дан литературный и экспериментальный анализ экспрессии генов эмбрио- и эндоспермогенеза кукурузы до и после опыления. Обсуждаются данные по CRISPR/Cas9-редактированию генов эмбрио- и эндоспермогенеза кукурузы

**Ключевые слова:** кукуруза, CRISPR/Cas9, эмбрио- и эндоспермогенез, слияние гамет

Молекулярно-генетический механизм бесполого размножения семенами (апомиксис) у кукурузы не изучен, хотя известно, что зародыш и эндосперм может развиваться без опыления (fertilization-independent seeds: *fis*, *fie* гены) у предка кукурузы трипсакума и у некоторых современных форм кукурузы имеются его проявления [1]. Знание закономерностей регуляции этих процессов может помочь развить биотехнологии на этой основе [2].

Целью исследования является исследование возможных механизмов независимого от опыления эмбрио- и эндоспермогенеза у кукурузы.

Во первой части доклада представлены литературные и собственные данные экспрессии генов, функционирующих на ранних этапах эмбрио- и эндоспермогенеза в зародышевых мешках кукурузы без опыления. В частности, генов, кодирующих белки адгезии и слияния мембран гамет, хроматин-моделирующие белки [1] и белки, контролирующие начало развития эндосперма (*Fie1*, *Fie2*).

Во второй части доклада представлены данные по CRISPR/Cas9-методу и практике его применения на кукурузе. Впервые созданы CRISPR/Cas9-векторы, содержащие гид-ПНК к генам адгезии (*Zm\_gex2*) и слияния (*Zm\_gsc1*) мембран гамет кукурузы. CRISPR/Cas9-конструкции введены в геном генетически маркированной кукурузы KM методами *in planta* и *in vitro*. Представлен анализ трансформированных растений на наличие вставок молекулярно-генетическими методами.

Работа выполнена по Программе фундаментальных научных исследований государственных академий наук (№ гос. регистрации AAAA-A17-117102740101-5) и при финансовой поддержке грантов РФФИ: №18-29-14048mk, №20-016-00020a (*Zm\_gex2*) и №20-316-80020mol-э-а (*Zm\_gsc1*).

1. Volokhina I., Gusev Y., Moiseeva Y., Fadeev V. Kolesova A., Gutorova O., Chumakov M. Expression of genes coding for chromatin-modifying enzymes in maize lines // Plant Gene. 2020. V.22. 100221.
2. Chumakov M.I. Matroclinic haploidy and gamete interaction in maize // Rus. J. Genetics 2018. V.54. (10): 1137–1141.

## Influence of chloride salinity on primary photosynthetic processes in potato leaves

Danilova E.D., Kolomeichuk L.V., Efimova M.V.

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

E-mail: nusy.l.d@gmail.com

**Key message.** We investigated the effect of 125 mM NaCl on the potato leaves photosynthetic parameters (the content of chlorophylls a, b, and carotenoids; photochemical activity of photosystem II).

**Keywords:** *Solanum tuberosum* L., Chloride salinity, Photosystem II, Photochemical activity

Soil salinization is one of the main adverse abiotic factors that reduce crop productivity. Potato is the fourth food crop in the world after rice, wheat and corn. Wild *Solanum* species are relatively resistant to salinity, while modern varieties that are the product of long-term breeding are much less salt tolerant. The effective functioning of the assimilation apparatus is one of the most important indicators of plant state.

The experiments were conducted on potato (*Solanum tuberosum* L.) plants, cv. Lugovskoi (identifier 8301891). Plants were regenerated in vitro from apical meristem and cultivated on half strength MS agar medium for 30 days [1]. After 14 days of adaptation to liquid medium plants were transferred either to the medium with 125 mM NaCl. As a control, was used a 0.5 MS culture medium without the addition of NaCl. The effective concentrations of NaCl were taken from a previous study [2]. Photosynthetic parameters were determined in the leaves of potato seedlings 6 days after the beginning of the NaCl treatment. The photochemical activity of plants was measured a JUNIOR-PAM fluorimeter (Walz, Germany).

The content of chlorophylls a, b and carotenoids showed a significant response to salt stress: 2-2.5 times lower than the control values.

The maximum quantum yield of photosystem 2 (PS 2) (Fv/Fm) under control conditions corresponded to the Fv / Fm values characteristic of other plants not subjected to stress [3]. Under the salt stress conditions, the Fv/Fm decreased 2 times. A similar trend was observed for the effective quantum yield (Y (II)) and electron transport rate (ETR), which under salinization conditions decreased by 40% relative to the control.

The described above results indicate a high sensitivity of the potato plants photosynthetic apparatus to chloride salinity.

The reported study was funded by RFBR, project number 19-34-90051.

## Влияние хлоридного засоления на первичные фотосинтетические процессы в листьях картофеля

Данилова Е.Д., Коломейчук Л.В., Ефимова М.В.

Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

**Аннотация.** Исследовано действие 125 mM NaCl на фотосинтетические показатели (содержание хлорофиллов а, b, и каротиноидов; фотохимическую активность фотосистемы II) листьев картофеля среднеспелого сорта Луговской.

**Ключевые слова:** *Solanum tuberosum* L., хлоридное засоление, фотосистема II, фотохимическая активность

Засоление почв является одним из основных неблагоприятных абиотических факторов снижающих продуктивность сельскохозяйственных растений. Картофель – четвертая продовольственная культура в мире после риса, пшеницы и кукурузы. Растения картофеля диких видов относительно устойчивы к засолению, однако современные сорта, являющиеся продуктом долговременной селекции, значительно более подвержены действию соли. Важным показателем состояния всего растительного организма является эффективное функционирование ассимиляционного аппарата.

Исследования проводились на картофеле (*Solanum tuberosum* L.) с. Луговской (идентификатор 8301891). Оздоровленные растения-регенеранты получали методом микроклонального размножения in vitro и культивировали на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга с половинным составом микро- и макроэлементов (0,5 МС) в течение 30 сут [1]. После 2-недельного роста растений на гидропонной установке в среде 0,5 МС растения переносили на ту же самую среду с добавлением 125 mM NaCl. В качестве контрольного варианта использовали питательную среду 0,5 МС без добавления NaCl. Действующая концентрация NaCl была выбрана на основании предыдущих исследований [2]. Фотосинтетические показатели определяли в листьях проростков картофеля через 6 дней после начала обработки NaCl. Для измерения фотохимической активности ассимиляционного аппарата использовали флуориметр JUNIOR-PAM (Walz, Германия).

Содержание основных видов фотосинтетических пигментов – хлорофиллов а, b и каротиноидов снижалось в 2-2.5 раза в ответ на солевой стресс.

Максимальный квантовый выход фотосистемы 2 (ФС 2) (Fv/Fm) в контрольных условиях соответствовал величинам Fv/Fm, характерным для других растений, не подвергнутых стрессовым воздействиям [3]. В условиях солевого стресса происходило снижение значения показателя Fv/Fm примерно в два раза. Аналогичная тенденция отмечена для величин эффективного квантового выхода (Y(II)) и скорости электронного транспорта (ETR), которые в условиях засоления снижались на 40% относительно контроля.

Представленные данные свидетельствуют о высокой чувствительности фотосинтетического аппарата растений картофеля к хлоридному засолению.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90051.

1. Kolomeichuk L. V., Efimova M. V., Zlobin I. E., Kreslavski V. D., Murgan O. K., Kovtun I. S., Khripach V. A., Kuznetsov V. I., Allakhverdiev S. I. 24-Epibrassinolide alleviates the toxic effects of NaCl on photosynthetic processes in potato plants // Photosynthesis Research. 2020. – Vol. 146. – P. 151-163.

2. Данилова Е.Д., Медведева Ю.В., Ефимова М.В. Влияние хлоридного засоления на ростовые и физиологические процессы растений *Solanum tuberosum* L. среднеспелых сортов // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2018. № 44. С. 158–171.

3. Angelini G., Ragni P., Esposito D., Giardi P., Pompili M.L., Moscardelli R., Giardi M.T. A device to study the effect of space radiation on photosynthetic organisms // Physics in Medicine. 2001. № 17. PP. 267-268.



### Study of common wheat lines with genetic material *Aegilops speltoides* for leaf rust resistance

Davoyan E.R., Davoyan R.O., Zubanova Y.S., Mikov D.S., Boldakov D.M.

National Center of Grain named after P.P. Lukyanenko, Krasnodar, Russia

E-mail [davayan@rambler.ru](mailto:davayan@rambler.ru)

**Key message.** The results of evaluating introgressive lines by resistance to leaf rust and the presence of molecular markers in them linked to the known resistance genes *Lr28*, *Lr35*, *Lr51*, *Lr10*, *Lr26*, *Lr34* are presented.

**Keywords:** *Ae. speltoides*; Leaf rust; *Lr*-genes; introgressive lines; molecular markers

The gene pool of the species *Ae. speltoides* Tausch ( $2n = 2x = 14$ ) genome (SS) has a significant reserve for disease resistance, in particular for leaf rust (*Puccinia triticina* Erikss.), which is one of the most widespread and harmful wheat diseases. Currently, it is known about the transfer of leaf rust resistance genes *Lr28*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr51*, *Lr47*, *Lr66* from this species to common wheat. Based on the application of chromosome engineering methods, the authors created a number of cytologically stable common wheat lines with introgressions from *Ae. speltoides*, which are characterized by high disease resistance, high protein content and other valuable traits (Davoyan et al., 2009). These lines are thought to carry the leaf rust genes transmitted by *Ae. speltoides* transferred from Avrodes, as well as genes *Lr10*, *Lr26*, *Lr34* transmitted from recipient varieties Krasnodar 99, Kavkaz, Aurora, respectively.

The object of the study was 26 lines of common wheat obtained with the participation of the synthetic form Avrodes (ABS). Infection and assessment of resistance to leaf rust was carried out in the adult stage in the field. Identification of *Lr* genes was carried out using PCR with primers marking the genes *Lr28*, *Lr35*, *Lr51*, *Lr47*, *Lr66*.

The synthetic form Avrodes exhibits high level of resistance to leaf rust (reaction type 1-). Disease resistance in the studied lines varied from high with a reaction type of 1 – (in lines 151, 247, 391, 397, 594, 597, 608, 610, 680, 787, 1189, 1261) and 1 (in lines 157, 235, 248, 363, 393, 636) to moderate - reaction type 2 (lines 153, 253, 609, 865) and susceptible reaction type 3,4 (211, 351, 357, 604). Previously, in our studies, it was found that Avrodes does not carry *Lr47* and *Lr66* genes in its genome (Davoyan et al., 2012), and therefore the studied material was not screened for the presence of molecular markers linked to them. Marker BCD260F1/35R2 linked to the *Lr35* gene was not detected. Marker CSS421570 linked to the *Lr28* gene was identified in the synthetic form of Avrodes and line 608. Line 597 revealed a marker linked to the *Lr51* gene. Lines 151, 153, and 609 carry a marker linked to the 1RS.1BL translocation, which contains the *Lr26* gene. Molecular markers linked to the *Lr10* and *Lr34* genes are identified in lines 247, 351, 604 and 157, 211, 253, respectively. The desired markers were not detected in lines 248, 363, 594, 680, 787, 357, and 865. Lines carrying both single resistance genes and their combinations were selected. The combination of the *Lr26+Lr51* genes was identified in lines 1189, 1261 with the high level of resistance to disease. A combination of the *Lr10* and *Lr34* genes was found in lines 391, 393, 397, 610, 636. In line 608, the *Lr34* gene was combined with the *Lr28* gene. A line 235 with a combination of genes (*Lr10+Lr26+Lr34*) was selected. The presence of the *Lr28*, *Lr51* genes in the studied lines suggests the presence of genetic material from *Ae. speltoides* in them. Resistance to leaf rust in line 597 can be controlled by the single presence of the *Lr51* gene, in lines 1189, 1261 as a result of its combination with the *Lr26* gene. In line 608, resistance is due to the presence of the *Lr28* gene in combination with *Lr26*, and in line 235 due to a combination of 3 genes. Resistance to leaf rust in lines 391, 393, 397, 610, 636 may be due to the presence of a combination of two genes *Lr10* and *Lr34* at the bottom, and in the case of line 235, pyramids of three genes. Resistance to leaf rust in lines 248, 363, 594, 680, 787, 865, created with the participation of Avrodes, in which markers linked to the *Lr28*, *Lr35*, *Lr51*, *Lr10*, *Lr26*, and *Lr34* genes were not detected can be controlled by another gene(s) other than those.

Davoyan, R.O. Transfer of disease resistance from wild relatives of common wheat using synthetic forms / R.O. Davoyan, I.V. Bebyakina, O.R. Davoyan et al. // Tr. in applied botany genetics and selection. 2009. -T. 166. S. 519-523

Davoyan, E.R. Identification of leaf rust resistance genes in *Aegilops* species, synthetic forms and introgressive lines of common wheat / E.R. Davoyan, R.O. Davoyan, I.V. Bebyakina, O.R. Davoyan, Yu.S. Zubanova, A.N. Zinchenko, A.M. Kravchenko // Vavilov. journal genetics and selection. 2012. -T. 16. No. 1. S. 116–122.



**Use of haploid technologies in breeding of common wheat of national center of grain named after P.P. Lukyanenko**

*Davoyan R.O., Zinchenko A.S., Davoyan E.R., Bebyakina I.V., Mikov D.S., Zubanova Yu.S., Boldakov D.M.,  
Basov V.I., Zelenskaya A.A.*

National Center of Grain named after P.P. Lukyanenko, Krasnodar, Russia

*E-mail: davoyanro@mail.ru*

**Key message.** *In order to obtain doubled haploids (DH) homozygous lines of common wheat in National Center of Grain named after P.P. Lukyanenko (NCG) the methods of selective elimination of chromosomes of maize in genome of intergenal hybrid embryos and anther culture are used. During the 2016-2019 years more than 1,500 diploid lines of 26 varieties of winter common wheat were produced.*

**Keywords:** *wheat, maize, anther culture, haploid plant, doubled haploids line*

Progress in the breeding of such an important crop as wheat is closely linked to the use of biotechnological techniques and in particular haploid technologies. Their use significantly expands the possibilities of traditional breeding and greatly accelerates the creation of new varieties. For production of doubled haploid lines of common wheat in NCG the methods of selective elimination of chromosomes of maize in genome of intergenerational hybrid embryos and anther culture are used. The first method is used in greenhouse conditions, the second complements the first and is used partly in field, partly in greenhouse. Until recently, we used the anther culture method to produce doubled haploids wheat lines. In order to optimize the creation of the technology of mass production of haploid wheat plants by the method of selective elimination of maize chromosomes in the genome of intergenerational hybrid embryos, 12 lines, 2 varieties and three hybrids of NCG maize breeding were studied. Effective haploid producers of line SM7 and Krasnodarskaya 935/86 inducing high formation of up to 26.8% haploid embryos from crossing with varieties of common wheat were selected. The work was done to optimize nutrient media and conditions for the cultivation of haploid embryos derived from the crossing of common wheat with maize and the regeneration of haploids derived from anther culture. Overall, using both methods for the three years (2016-2019) more than 1500 diploid lines from 26 varieties of winter common wheat selected by the NCG were produced. Thirty-eight DH lines obtained from 3 varieties were evaluated by the parameters of spike productivity (length of the main spike, number of flowers in the spike, number of grains from the spikes, weight of grain from the spike). There is a significant difference in the lines between each other and the varieties on the basis of which they are derived

**Developmental programs for lateral root and symbiotic nodule organogenesis: evolution of similarities and differences**

Demchenko K.N., Kiryushkin A.S., Ilina E.L., Guseva E.D.

Komarov Botanical Institute, Saint Petersburg, Russia

E-mail: demchenko@binran.ru

**Key message.** In order to understand the relationship between genetic programs for the development of different types of lateral roots and symbiotic nodules, a comparative analysis of promoter activity of LOB-DOMAIN PROTEIN family genes was carried out.

**Keywords:** root system, symbiotic nodule, squash, lateral root, root branching evolution

These previous studies indicate that a number of parallels can be drawn between nodule and lateral root development, but their modes of initiation differ significantly. For instance, development of actinorhizal nodules and some pea mutants (cochleata, etc.) shows certain similarity of genetic programs of initiation of these organs and lateral root. We directly compared lateral root and nodule development with high spatial and temporal resolution to identify the commonalities and differences that underlie their development. We demonstrate that lateral roots and nodules share overlapping developmental programs that converge on the formation and interpretation of an auxin maximum. This is exemplified by our finding that auxinresponsive LOB-DOMAIN PROTEIN 16 (LBD16) is required for formation of both nodule and lateral root primordia. In some pea mutants (cochleata, etc.) shows certain similarity of genetic programs of initiation of these organs and lateral root. Side roots occur in most plants above the elongation zone, but there is a group of families whose species form lateral roots directly in the parental meristem. The key factor in both types of lateral root initiation is the auxin. Nodules initiate as lateral root organs in response to the perception of rhizobial bacteria at the root surface. Rhizobial nodulation (Nod) factors activate symbiosis signaling in root epidermal cells, which in turn activates cytokinin signaling in the root cortex and pericycle. Previously was demonstrated that despite differential induction, lateral roots and nodules share overlapping developmental programs, with mutants in LOB-DOMAIN PROTEIN 16 (LBD16) showing equivalent defects in nodule and lateral root initiation (Schiessl et al., 2019). To better understanding the relatedness between nodule and lateral root development, we undertook a comparative analysis of these two root developmental programs. Phylogenetic analysis, as well as analysis of the expression levels of LBD genes in response to exogenous auxin, revealed orthologs of the LBD16 and LBD18 Arabidopsis genes in cucumber and squash. The last two species form the lateral root primordia in the parental root meristem. The pattern of LBD genes expression in different types of lateral root initiation in plants that differ in the place of its initiation, as well as in the initiation of symbiotic nodules, was analyzed. Differences in the promoter activity of LBD16 and LBD18 genes were identified, and their possible targets are discussed. Our research has allowed us to propose an evolutionary scheme for the participation of LBD family proteins in the regulation of initiation and development of lateral organs -symbiotic nodules and lateral roots. This research was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant no. 19-04-01079\_a).

**Генетические программы развития бокового корня и симбиотического клубенька: эволюция сходств и различий**

Демченко К.Н., Кирюшкин А.С., Ильина Е.Л., Гусева Е.Д.

Ботанический институт им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Для понимания взаимосвязи генетических программ развития различных типов боковых корней и симбиотических клубеньков, был проведен сравнительный анализ тканевого распределения активности генов семейства LOB-DOMAIN PROTEIN.

**Ключевые слова:** корневые системы, симбиотические клубеньки, огурец, боковой корень, эволюция ветвления

Изучение развития актиноризных клубеньков, а также ризобияльных клубеньков с недетерминированным ростом у некоторых мутантов гороха (cochleata и др.) показывает определенное сходство генетических программ инициации этих органов и бокового корня. Боковые корни возникают у большинства растений выше зоны растяжения, однако существует группа семейств, виды которых формируют примордии бокового корня непосредственно в меристеме родительского. Ключевым фактором при обоих типах инициации бокового корня является ауксин. В свою очередь, симбиотические клубеньки иницируются сходно с боковыми корнями выше зоны растяжения, но в ответ на восприятие ризобияльных бактерий на поверхности корня. Ризобияльные Nod-факторы рецептируются клетками ризодермы, что, в свою очередь, активизирует трансдукцию, опосредованного цитокинином, сигнала в коре корня и перицикле. Ранее было показано, что, несмотря на различия в инициации боковых корней и клубеньков, они имеют перекрывающиеся программы развития. Так у мутантов по гену LOB-DOMAIN PROTEIN 16 (LBD16) обнаруживаются эквивалентные дефекты в инициации конкреций и боковых корней (Schiessl et al., 2019). Для понимания взаимосвязи корневой и клубеньковой программ развития, был проведен сравнительный анализ этих двух генетических программ. Проведённый филогенетический анализ, а также анализ уровней экспрессии генов семейства LBD в ответ на экзогенный ауксин, позволил выявить ортологи генов LBD16 и LBD18 Arabidopsis у огурца и кабачка. Два последних вида формируют примордии бокового корня в меристеме. Нами был проанализирован паттерн экспрессии генов LOB при различных типах инициации бокового корня у растений, различающихся местом его инициации, а также при инициации симбиотических клубеньков. Выявлены различия в распределении активности генов LBD16 и LBD18, обсуждаются их возможные мишени. Исследования позволили предложить эволюционную схему участия белков семейства LBD в регуляции инициации и развития боковых органов корня – симбиотических клубеньков и боковых корней.

Исследования поддержаны грантом РФФИ 19-04-01079\_a.

### Search of phyto-toxicity microorganisms for weeds

Didovich S.V., Pas' A.N., Alekseenko O.P.

FSBSI "Research Institute of Agriculture of Crimea", Simferopol, Crimea

E-mail: sv-alex.68@mail.ru

**Key message.** Phyto-toxic strains for *Ambrosia artemisiifolia*, *Amaranthus retroflexus*, *Cirsium arvense* have been identified. The intensity of the lesion exceeded the control by 5-70 times ( $p < [0.0001-0.007]$ ), depending on the strain and the location of the stomata.

**Keywords:** phyto-toxic active strains, *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Amaranthus retroflexus* L., *Ambrosia artemisiifolia* L.

The problem of weed control in agrocenoses of Russia is relevant due to the loss of yield crops in the range of 15-18%, and for row crops 50% or more. Microbial preparations are safe for ecosystems. They are an alternative to chemical herbicides. Biotechnologies for growing agricultural crops must be developed. This is according with the Federal Law of the Russian Federation No. 280-FL "On organic products" from January 1, 2020.

The purpose of our work is to search of phyto-toxic active microorganisms for weeds of agrocenoses such as *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Amaranthus retroflexus* L., *Ambrosia artemisiifolia* L. and further use in bio-technology of plant protection.

Strains of microorganisms from the Crimean Collection of Microorganisms of FSBSI "Research Institute of Agriculture of Crimea" (<http://www.ckp-rf.ru/usu/507484/>), the Algal Collection of Soil Science Institute (ACSSI) of the Institute of Physicochemical and Biological Problems of Soil Science RAS (<http://acssi.org/index.php/catalogue>), the Collection of FSBSI "All-Russian Research Institute for Plant Protection" of "State Collection of Microorganisms Pathogenic to Plants and their Pests" (<http://www.ckp-rf.ru/usu/200616/>) and new strains, isolated in 2018-2019 were used in the study. The phytotoxicity of 22 strains of heterotrophic and phototrophic microorganisms and their preparative forms were evaluated in a laboratory experiment with use a bio-sample on the leaves of weeds *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Amaranthus retroflexus* L., *Ambrosia artemisiifolia* L. Treatment was performed with a suspension of microorganisms in a dose of  $10^5$  cells or 10 ml of culture filtrate /  $\text{cm}^2$  of leaf disk or die-cutting, taking into account the location of stomata. Experiments were repeated four times. The intensity of the lesion was determined visually with use a five-point system. Phyto-toxic active strain *Stagonosporopsis heliopsisidis* 32.8 was a control on ragweed, water was a control on other weeds.

Five phytotoxic strains for *Ambrosia artemisiifolia* L., two strains for *Amaranthus retroflexus* L. and three strains for *Cirsium arvense* (L.) Scop. were identified as a result of research with use the conservative a posteriori Duncan criterion. According to the intensity of the lesion, these strains significantly exceeded the control by 5-70 times ( $p < [0.0001-0.007]$ ), depending on the preparation form and location of the stomata.

The reported study was funded by the State Assignment of Russian Academy of Sciences No. 0834-2019-0003 and RFBR according to the research project No. 18-016-00184 A.

### Поиск фитотоксичных микроорганизмов для сорных растений

Дидович С.В., Пась А.Н., Алексеенко О.П.

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», Симферополь, Крым

**Аннотация.** Выявлены фитотоксичные штаммы для *Ambrosia artemisiifolia*, *Amaranthus retroflexus*, *Cirsium arvense*. Интенсивность поражения превышала контроль в 5-70 раз ( $p < [0,0001-0,007]$ ) в зависимости от штамма и расположения устьиц.

**Ключевые слова:** фитотоксически активный штамм, *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Amaranthus retroflexus* L., *Ambrosia artemisiifolia* L.

Проблема борьбы с сорной растительностью в агроценозах России актуальна из-за потерь урожая зерновых культур в пределах 15-18%, а для пропашных культур 50% и более. Необходимо разрабатывать альтернативные химическим гербицидам безопасные для экосистем микробные препараты и биотехнологии выращивания агрокультур, что согласуется с принятием Федерального закона РФ №280-ФЗ «Об органической продукции», вступившим в силу с 1 января 2020 года.

Целью нашей работы стало проведение поиска фитотоксически активных микроорганизмов для сорных растений агроценозов (*Cirsium arvense* (L.) Scop., *Amaranthus retroflexus* L., *Ambrosia artemisiifolia* L.) и дальнейшего использования в биотехнологии защиты растений.

В исследовании использовали штаммы микроорганизмов из Крымской коллекции микроорганизмов ФГБУН «НИИСХ Крыма» (<http://www.ckp-rf.ru/usu/507484/>), Альгологической коллекции ИФХиБПП РАН (<http://acssi.org>), коллекции ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (<http://www.ckp-rf.ru/usu/200616/>) и новые штаммы, выделенные в 2018-2019 гг. Фитотоксичность 22 штаммов гетеротрофных и фототрофных микроорганизмов и их препаративных форм оценивали в лабораторном опыте методом биопробы на листьях сорных растений *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Amaranthus retroflexus* L., *Ambrosia artemisiifolia* L. Обработку проводили суспензией микроорганизмов в дозе  $10^5$  клеток либо 10 мкл культурального фильтрата) /  $\text{cm}^2$  листового диска или высечки с учетом расположения устьиц в четырех повторениях. Интенсивность поражения определяли визуально по пятибалльной системе. Контролем на амброзии был фитотоксически активный штамм *Stagonosporopsis heliopsisidis* 32.8, на других сорных растениях – вода.

В результате исследования при статистической оценке с помощью консервативного апостериорного критерия Дункана выявлены пять фитотоксичных штаммов для *Ambrosia artemisiifolia* L., два штамма для *Amaranthus retroflexus* L. и три штамма для *Cirsium arvense* (L.) Scop., которые по интенсивности поражения достоверно превышали контроль в 5-70 раз ( $p < [0,0001-0,007]$ ) в зависимости от их препаративной формы и расположения устьиц.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ №18-016-00184 «А» и Госзадания №0834-2019-0003.



***Pectobacterium atrosepticum* plasmid pPA21A is an important determinant of plant-bacterium pathosystem development**

Diubo Yu.<sup>1</sup>, Nikolaichik Ye.<sup>2</sup>

Belarusian State University, Minsk, Belarus

E-mail: yuliyadiubo@gmail.com

**Key message.** *Pectobacterium atrosepticum* strain 21A can cause a strong hypersensitive reaction in *Nicotiana tabacum*. The pPA21A plasmid was found to be responsible for this phenotype. The plasmid genes involved are been identified.

**Keywords:** plasmid-dependent virulence, *Pectobacterium atrosepticum*, bacterium-plant interaction

*P. atrosepticum* is an economically significant plant pathogen. It causes soft rot disease of potato tubers and blackleg of the stems. Most *P. atrosepticum* strains can not cause a hypersensitive reaction in *N. tabacum*, but the 21A strain can. It is also more virulent than other *P. atrosepticum* strains from our collection – SCRI1043 and PB72. Strain 21A chromosome has 98,7% and 99,9% identity to SCRI1043 and PB72 chromosomes. The major difference between the genomes of these strains is the pPA21A plasmid present in the 21A strain. Since plasmid involvement in the control of *Pectobacterium* sp. virulence wasn't studied so far, in this work we try to determine if the pPA21A plasmid is responsible for the unique properties of strain 21A.

The main purpose of the study is the characterization of plasmid pPA21A and the identification of its role in bacterium-plant interaction.

Deletion variants of plasmid pPA21A were constructed by the conventional molecular biology methods. Sirtuin gene and gene of phospholipase D were cloned in the high copy number vector pK18. Testing the properties of the deletion variants of pPA21A was performed with regular microbiology methods. Plant-bacterial interactions were tested by the infiltration of bacterial suspension into *Nicotiana tabacum* leaves and by injection of the suspensions into potato tubers followed by weighting rotten tuber tissues.

To simplify control of pPA21A presence, a gentamycin resistance gene was added to the plasmid and all further manipulations were performed with pPA21A::Gm.

Conjugative transfer of pPA21A::Gm into plasmid-free strains SCRI1043 and PB72 made these two strains much better inducers of hypersensitive reaction (HR) and also improved their ability to macerate potato tubers. Analysis of pPA21A nucleotide sequence revealed three loci that could be involved in the interaction with plants: a *vir*-cluster of the type IV secretion system genes and genes coding for a phospholipase D (*pld*) and a sirtuin-like protein (*sir*). To check which of the three loci is responsible for the HR-inducing phenotype, we have constructed deletions of pPA21A::Gm and also cloned the *pld* and *sir* genes using a high copy number plasmid. Virulence tests performed with *P. atrosepticum* strains carrying the deletion derivatives of pPA21A have so far shown that (i) *vir* cluster is required for conjugative transfer of pPA21A, but doesn't contribute to virulence directly and (ii) either the *pld* or the *sir* gene is the determinant responsible for HR induction. To identify HR-inducing plasmid determinant more precisely, we are currently characterising *P. atrosepticum* strains with single *sir* or *pld* genes introduced on a multicopy plasmid and will present the results at the conference.

## The role of homeodomain-containing transcription factors in the control of organogenesis of nitrogen fixing nodules

Dolgikh A.V.<sup>1,2</sup>, Dolgikh E.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology (ARRIAM), Saint Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Saint-Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

E-mail: [sqshadol@gmail.com](mailto:sqshadol@gmail.com)

**Key message.** Interconnection between key transcription factors of symbiosis regulation and the homeodomain-containing transcription factors KNOXs and BELs in the development of nodules in pea was investigated.

**Keywords:** legume-rhizobial symbiosis, organogenesis, homeodomain-containing transcription factors.

The development of legume-rhizobial symbiosis results in formation of specific organs on the roots of plants which are called "nitrogen fixing nodules". This process is strictly controlled by specific transcription factors and is closely linked to the phytohormonal regulation. IPD3/CYCLOPS and NIN transcription factors play the most important role in the process of nodule development. It was previously shown that *Pisum sativum* mutants in the *ipd3/cyclops* gene form Fix<sup>-</sup> nodules, while mutants in the *nin* gene were absolutely unable to form nodules (Nod<sup>-</sup> phenotype). Nevertheless, the mechanism of interconnection between IPD3/CYCLOPS, NIN and other components of signalling pathway as well as phytohormones, which are involved in nodules organogenesis regulation has remained unclear.

Our previous experiments showed that cytokinin level was dramatically reduced in *ipd3/cyclops* mutants and expression level of genes encoding KNOX and BEL-like (BELL) transcription factors involved in cytokinin biosynthesis regulation were also significantly decreased. In the promoter of *KNOX3* gene we have found sequence which is similar to so-called "cyc-box" - specific site for recognition by IPD3/CECLOPS transcription factor. In current work we have examined possibility of IPD3/CYCLOPS interaction with *pKNOX3::GUS* promotor by means of temporal co-expression of these constructs in leaves of *Nicotiana benthamiana*. The opportunity of direct interaction between recombinant protein IPD3/CYCLOPS and regulatory sequences in promotor have also been studied using method of surface plasmon resonance with biosensor Proteon XPR36. We have also found significantly reduced expression level of *BELL1* and *BELL3* genes in *nin* mutants and moreover expression level of gene encoding OVATE transcription factor which may potentially interact with KNOXs and BELs was also decreased. Based on these data, possible scheme of transcription factors and phytohormones interaction during nodule organogenesis was proposed.

This work was supported by a grant of the Russian Science Foundation 16-16-10043.

## Участие гомеодомен-содержащих транскрипционных факторов в контроле органогенеза азотфиксирующих клубеньков бобовых растений

Долгих А.В.<sup>1,2</sup>, Долгих Е.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Исследовано взаимодействие между основными транскрипционными факторами регуляции симбиоза и гомеодомен-содержащими KNOX и BELL транскрипционными факторами в контроле органогенеза клубенька.

**Ключевые слова:** бобово-ризобийный симбиоз, органогенез, гомеодомен-содержащие транскрипционные факторы.

Развитие симбиоза бобовых растений с бактериями пор. *Rhizobiales* приводит к формированию на корнях растения специального органа — азотфиксирующего клубенька. Этот процесс контролируется специфическими транскрипционными факторами и тесно связан с действием фитогормонов. Важнейшую роль в процессах развития клубенька у бобовых играют транскрипционные факторы IPD3/CYCLOPS и NIN. Ранее было показано, что мутанты по гену *ipd3/cyclops* у гороха *Pisum sativum* L. формируют клубеньки, не способные к азотфиксации (Fix<sup>-</sup>), а мутанты по гену *nin* полностью теряют способность к формированию клубеньков (Nod<sup>-</sup> фенотип). Тем не менее, до сих пор остается неясным, каким образом осуществляется взаимодействие между IPD3/CYCLOPS, NIN и другими компонентами сигнального пути, а также фитогормонами, вовлеченными в регуляцию программы органогенеза клубенька.

Выполненные нами ранее исследования показали, что у мутантов по гену *ipd3/cyclops* гороха значительно снижено количество цитокининов в клубеньках, а также существенно подавлен уровень экспрессии генов, кодирующих гомеодомен - содержащие транскрипционные факторы KNOX и BEL-like (BELL), которые необходимы для регуляции биосинтеза цитокининов. В промоторе гена *KNOX3* нами был найден участок, схожий с последовательностью «cyc-box» - специфичным сайтом посадки транскрипционного фактора IPD3/CYCLOPS. В настоящей работе нами была исследована возможность связывания IPD3/CYCLOPS с промотором *pKNOX3::GUS* при временной ко-экспрессии генетических конструкций в листьях табака *Nicotiana benthamiana*, а также исследовано непосредственное взаимодействие рекомбинантного белка IPD3/CYCLOPS с регуляторными последовательностями промотора с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса на биосенсоре Proteon XPR36. Нами было показано значительное снижение экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы BELL1 и BELL3, у мутантов гороха по гену *nin*, а также снижение в уровне экспрессии гена, кодирующего транскрипционный фактор OVATE, для гомологов которого показана возможность взаимодействия с KNOX и BELL транскрипционными факторами. На основании полученных данных предлагается возможная схема взаимодействия транскрипционных факторов и фитогормонов при клубенькообразовании.

Работа поддержана грантом РФФ 16-16-10043П.

### **The influence of farming systems and microbial preparations on the structure of the microbocenosis of the rhizosphere of *Triticum aestivum* L.**

*Egovtseva A.Yu., Melnichuk T.N., Abdurashitov S.F.*

Federal State Budget Scientific Institution “Research Institute of Agriculture of Crimea”, Simferopol', Crimea  
E-mail: *eau82@mail.ru*

**Key message.** *The use of microbial preparations contributed to a change in the taxonomic structure of winter wheat rhizosphere microbiome was established. A more significant effect of microbial preparations was noted under no-till technology on the structure of the microbiome than with the traditional farming system.*

**Keywords:** *microbiom, Triticum aestivum L., rhizosphere, complex of microbial preparations, farming systems*

Recently, there has been growing interest in the use of complex biological products, which simultaneously include the properties of biological fertilizers and fungicides, which makes it possible to solve many problems of biological plant protection and improve the quality of agricultural products, as well as improve the condition of soils and their fertility. The influence of no-till technology on soil fertility, its properties, and crop productivity requires study and is a very urgent task and helps to increase the sustainability of agroecosystems and preserve the environment. The microbiome of the plant rhizosphere is a living ecosystem and therefore is very plastic, responding to changes in various factors and being a bio-indicator of the state of soil biocenosis. The aim of our work was to establish the influence of the complex of microbial preparations (CMP) and farming systems (no-till and the traditional system) on the taxonomic structure of the microbiome of the rhizosphere of *Triticum aestivum* L. of southern chernozem in the conditions of the Steppe of Crimea. In the research process, modern approaches to studying the taxonomic structure of the rhizosphere microbiome using high-throughput sequencing of 16SrRNA gene libraries were used. A metagenomic analysis of the rhizosphere showed that inoculation with microbial preparations in combination with direct seeding leads to a 2.5-fold increase compared to the control (1.02%) of the presence of the genus *Flavobacterium*. Representatives of this genus are able, along with many functions, to produce a broad-spectrum antibiotic on phytopathogens. The share of *Rubrobacter*, which is an indicator of extreme conditions, decreased by more than 2 times compared with the version without treatment of the CMP (2.90%). A more significant effect of microbial preparations under no-till conditions on the structure of the microbiome is noted than with the traditional farming system.

### **Влияние систем земледелия и микробных препаратов на структуру микробценоза ризосферы *Triticum aestivum* L.**

*Еговцева А.Ю., Мельничук Т.Н., Абдурашитов С.Ф.*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», Симферополь, Крым

**Аннотация.** *Установлено, что применение микробных препаратов способствовало изменению таксономической структуры микробиома ризосферы пшеницы озимой. Отмечено более существенное влияние комплекса микробных препаратов в условиях no-till на структуру микробиома, чем при традиционной системе земледелия.*

**Ключевые слова:** *микробиом, Triticum aestivum L., ризосфера, комплекс микробных препаратов, системы земледелия*

В последнее время возрос интерес к применению биопрепаратов комплексного действия, одновременно включающих свойства биоудобрений и фунгицидов, что дает возможность решать многие проблемы биологической защиты растений и повышать качество сельскохозяйственной продукции, а также улучшать состояние почв и их плодородие. Влияние технологии no-till на плодородие почвы, ее свойства, на урожайность сельскохозяйственных культур требует изучения и является весьма актуальной задачей, что способствует повышению устойчивости агроэкосистем и сохранению окружающей среды. Микробиом ризосферы растений является живой экосистемой и поэтому является очень пластичной, реагируя на изменения различных факторов и являясь биоиндикатором состояния почвенного биоценоза. Целью нашей работы было установить влияние комплекса микробных препаратов (КМП) и систем земледелия (no-till и традиционная система) на таксономическую структуру микробиома чернозема южного ризосферы *Triticum aestivum* L. в условиях Степи Крыма. В процессе исследований использованы современные подходы изучения таксономической структуры ризосферного микробиома с использованием высокопроизводительного секвенирования библиотек гена 16SpPHK. Метагеномный анализ ризосферы на представленность родов показал, что инокуляция микробными препаратами в сочетании с прямым посевом ведет к увеличению в 2,5 раза по сравнению с контролем (1,02 %) доли присутствия рода *Flavobacterium*, представители которого способны наряду с множеством функций продуцировать антибиотик широкого спектра действия на фитопатогены. Доля *Rubrobacter*, являющаяся индикатором экстремальных условий, снижалась более чем в 2 раза по сравнению с вариантом без обработки КМП (2,90 %). Отмечено более существенное влияние микробных препаратов в условиях no-till на структуру микробиома, чем при традиционной системе земледелия.

### RNAi-mutants of *Sorghum bicolor* (L.) Moench with improved digestibility of kafirins

Elkonin L.A., Panin V.M., Kenzhegulov O.A., Sarsenova S.Kh.

Agricultural Research Institute of South-East Region, Saratov

E-mail: lelkonin@gmail.com

**Key message.** RNAi-mutant with improved kafirin digestibility was obtained in commercial cv. of grain sorghum Avans. In the cv. Zheltozernoe 10, functionally marker-free transgenic plants with improved kafirin digestibility were identified.

**Keywords:** *Sorghum bicolor* (L.) Moench, transgenic plants, *Agrobacterium*-mediated genetic transformation, gamma-kafirin, RNA silencing

Modification of the composition of grain storage proteins is an intensively developing area of plant biotechnology, which is of particular importance for sorghum – high-yielding drought tolerant crop. Compared with other cereals, the majority of sorghum cultivars and hybrids are characterized by reduced nutritional value that is caused by a low content of essential amino acids in the seed storage proteins (kafirins), and resistance of kafirins to protease digestion. Suppressing the synthesis of individual kafirin subclasses can be an effective approach to solve this problem, since it leads to a rebalancing of the kernel proteome, and to the synthesis of other proteins with a higher content of essential amino acids, and to the changes in the ultrastructure of protein bodies that become more sensitive to proteolytic digestion. Our studies are aimed at creating sorghum lines with a suppressed synthesis of  $\gamma$ -kafirin, the most resistant to protease digestion, which is located at a periphery of protein bodies and prevents the digestion of other kafirins. To solve this problem, we conducted experiments on the introduction of a genetic construct capable of RNA silencing of the  $\gamma$ -kafirin gene, into the genomes of the grain sorghum cultivars Zheltozernoye 10 and Avans through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. In these experiments, we used the *A. tumefaciens* strain GV3101/pNRKAF that contained in the T-DNA region the *bar* gene under the control of *nos*-promoter and the genetic construct for RNA-silencing consisting of inverted fragments of the  $\gamma$ -kafirin gene separated by the ubiquitin-intron sequence [1]. Immature embryos were pre-cultured for 3 days, then they were inoculated with the agrobacterial suspension, which was grown, first, in YEP medium (10 h, 28 °C, 200 rpm), and then in AB medium with acetosyringone (20 hours, 23 °C, 60 rpm). Co-cultivation (4 days, 23 °C) was carried out on a filter paper moistened with M11 medium [1]. The same medium was used at the resting (7 days, 28 °C) and selection stages. In Avans variety, 19 plants ( $T_0$  generation) were regenerated from transformed calli after two cycles of selection on the M11 medium with ammonium glufosinate (2.5 mg/l). In one plant, #1-1, PCR analysis showed amplification of the target sequences of the *nos*-promoter and *ubi*-intron. The transformation frequency was 1.4%, which corresponds to the literature data on application of GV3101 strain in experiments on *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of sorghum. A PCR analysis of the  $T_1$  progeny obtained from this plant confirmed the inheritance of the introduced genetic construct. Analysis of digestibility of endosperm proteins by pepsin treatment followed by SDS-PAGE and digital processing the electrophoretic spectra showed a significantly higher digestibility of kafirins in the mutant compared to the original non-transgenic cultivar and non-transgenic regenerants (93% against 57-62%). Analysis of the endosperm texture of transgenic kernels showed the complete disappearance of the vitreous endosperm, which was to be expected in the case of expression of the introduced genetic construct. It is noteworthy that the vitreous endosperm in the kernels of Avans has a dark color, indicating the presence of tannins, which reduce the nutritional value of the grain. Thus, two factors – the removal of the vitreous endosperm containing tannins, and the improvement of the digestibility of kafirins – indicate a potentially higher nutritional value of the mutant grain, compared with the grain of the original variety Avans. In the cv. Zheltozernoe 10, an analysis of the digestibility of endosperm proteins in  $T_4$  and  $T_5$  progeny of transgenic plants, which we obtained earlier [1], showed that the introduced genetic construct continues to function, increasing the digestibility of kafirins, compared to the original non-transgenic line. Remarkably, PCR analysis with primers to the *nos*-promoter that governs the expression of the *bar* gene, showed its absence in majority of the studied plants, although amplification of the target sequence of *ubi*-intron was observed. Therefore, these transgenic plants with improved digestibility of kafirins are functionally marker-free. This finding would greatly facilitate their introduction into agricultural production. This work was partially supported by the Russian Foundation for Basic Research, grant No. 19-016-00117.

[1] Elkonin L.A., Italianskaya J.V., Domanina I.V. *et al.* Transgenic sorghum with improved digestibility of storage proteins obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation // Russ. J. Plant Physiol., 2016, 63, p. 678–689.



### Inhibition of the biosynthesis of polyketide mycotoxins by microbial metabolites

Erokhin D.V., Mikityuk O.D., Shcherbakova L.A., Dzhavakhiya V.G.

All-Russian Research Institute of Phytopathology, Bolshie Vyazemy, Russia

E-mail: erokhin.denis.v@gmail.com

**Key message.** 6-Demethylmevinoliin, a secondary metabolite of *Penicillium citrinum*, is able to efficiently inhibit the biosynthesis of two polypeptide mycotoxins, aflatoxin B1 and zearalenone, by 92 and 78% of the control, respectively.

**Keywords:** mycotoxins, polyketide biosynthesis, 6-demethylmevinolin, zearalenone, aflatoxin B1

Contamination of plant materials with mycotoxins produced by some saprophytic and phytopathogenic fungi is a serious problem of food and agricultural industries. In some regions of Russia, the level of grain contamination with mycotoxins reaches 45–65%. Fungicides are inefficient in the case of resistant strains and may also contaminate agricultural products. Therefore, inhibition of the mycotoxin biosynthesis by non-toxic natural compounds of the plant or microbial origin (especially the last ones, in the view of a large-scale industrial production) can be a promising solution. We perform the search and study of potential natural inhibitors of the mycotoxin biosynthesis for many years. The most promising and efficient compound we found is 6-demethylmevinolin (6-DMM), a secondary metabolite of *Penicillium citrinum*. This compound is able to significantly (92% of the control) inhibit the biosynthesis of aflatoxin B1 even in low concentrations (1 µg/mL), which almost do not suppress the growth of a toxin-producing *Aspergillus flavus*. A high efficiency of 6-DMM was confirmed *in vitro* and also for the treatment of wheat, corn, and rice grain with the further inoculation with a toxigenic *A. flavus* strain. Recent experiments with zearalenone (another mycotoxin produced by *Fusarium culmorum*) showed that 6-DMM (50 µg/mL) is also able to significantly (up to 78% of the control) inhibit the biosynthesis of this polyketide toxin that indirectly confirms a hypothesis that this compound may block some early stages of the polyketide biosynthetic pathway, as well as shows a high potential of the 6-DMM use to prevent contamination of agricultural products with polyketide mycotoxins of different origin.

The study of the 6-DMM activity in relation to zearalenone was supported by the Russian Science Foundation (project RSF 19-76-10031). Results on the effect of 6-DMM on the aflatoxin B1 biosynthesis were obtained within the framework of the earlier completed project RSF 14-16-00150.

### Ингибирование биосинтеза поликетидных микотоксинов микробными метаболитами

Ерохин Д.В., Микитюк О.Д., Щербакова Л.А., Джавахия В.Г.

Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Большие Вяземы, Россия

**Аннотация.** Метаболит гриба *Penicillium citrinum* 6-деметилмевинолин, оказался способен эффективно блокировать биосинтез двух поликетидных микотоксинов, афлатоксина В1 и зеараленона (на 92 и 78% от контроля, соответственно).

**Ключевые слова:** микотоксины, биосинтез поликетидов, 6-деметилмевинолин, зеараленон, афлатоксин

Контаминация сельскохозяйственной продукции микотоксинами, вырабатываемыми некоторыми сапрофитными и фитопатогенными грибами, представляет значительную проблему для пищевой и сельскохозяйственной индустрии. В ряде регионов России степень загрязнения зерновой продукции микотоксинами достигает 45–65%. Применение фунгицидов малоэффективно в случае устойчивых штаммов и приводит к контаминации продукции самими пестицидами. Перспективным вариантом решения проблемы может быть подавление биосинтеза микотоксинов в грибах-продуцентах при помощи нетоксичных природных соединений растительного или микробного происхождения, причем последние предпочтительнее с точки зрения возможности их промышленной наработки в больших объемах. В течение ряда лет мы проводим поиск и исследование потенциальных ингибиторов биосинтеза микотоксинов природного происхождения. Наиболее эффективным соединением оказался 6-деметилмевинолин (6-ДММ), вторичный метаболит гриба *Penicillium citrinum*, способный значительно (на 92% от контроля) подавлять биосинтез афлатоксина В1 даже в невысоких концентрациях (1 мкг/мл), практически не влияющих на рост продуцента токсина *Aspergillus flavus*. Высокая эффективность 6-ДММ была подтверждена не только *in vitro*, но также и при обработке им зерна пшеницы, кукурузы и риса с последующим искусственным заражением токсигенным штаммом *A. flavus*. Недавние эксперименты, проведенные с еще одним микотоксином – зеараленоном (продуцент – *Fusarium culmorum*), показали, что 6-ДММ способен существенно (на 78% от контроля при концентрации 50 мкг/мл) подавлять биосинтез и этого поликетидного токсина, что косвенно подтверждает гипотезу о том, что данное соединение может блокировать ранние стадии поликетидного пути биосинтеза, и свидетельствует о перспективности и высоком потенциале применения 6-ДММ для профилактики загрязнения растительной продукции поликетидными микотоксинами различного происхождения.

Исследование активности 6-ДММ в отношении зеараленона выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект РНФ 19-76-10031). Результаты по влиянию 6-ДММ на биосинтез афлатоксина В1 были получены в рамках ранее завершеного проекта РНФ 14-16-00150.



### Genomic analysis of *Bacillus pumilus* phytopathogenic strain 11-1-1

Evdokimova O.V., Semenchukova E.A., Valentovich L.N.

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

E-mail: evdokimovalesia@gmail.com

**Key message.** Pathogenicity studies with *Bacillus pumilus* bacteria showed that they could cause disease symptoms of the tested plants. Genome one of the most aggressive strains was sequenced for understanding on the pathogenesis.

**Keywords:** *Bacillus pumilus*, phytopathogen, PCR-based genotyping, genome sequencing

Environmental bacteria *Bacillus pumilus* have been occasionally identified as a pathogen of plant. A number of enzymes with the potential to harm plant cells have been found from this bacterium but the mechanism of pathogenesis of *B. pumilus* is currently unknown. The genomic information of pathogenic strains of *B. pumilus* will be important for understanding on the pathogenesis. Aim of this study is analysis of phytopathogenic *B. pumilus* strain genome to identify gene candidates with functions in the interaction between bacterial pathogens and plants.

Pathogenicity of strain was tested by inoculation with suspension of bacterium into the parenchyma of test plants at approximately 10<sup>8</sup>CFU/ml. PCR-based genotyping was done using the RAPD primer 1254 and REP primers ERIC1, BOX and GTG<sub>5</sub>. Whole-genome sequencing *B. pumilus* was performed using Illumina MiSeq.

We investigated 34 strains of *B. pumilus* isolated in Belarus including 28 strains isolated from affected cucumber, tomato, potato tubers, flax plants, 5 soil strains and 1 strain from chicken feces. Preliminary pathogenicity studies demonstrated that many strains could cause plant infection symptoms after injection with bacterial suspension. Seven most aggressive strains induced rot of potato tubers (cultivars Zhuravinka and Briz) as well as necrosis of bean plant leaves. Surprisingly, BIM B-171 isolated from soil was among these strains. We used RAPD- and REP-PCR to study the genome diversity of *B. pumilus* strains. Results indicated that pathogenic strains 38.2, 39.2, T1, 11-1-1 have identical genomic fingerprint in all PCR-typing methods, the rest of pathogenic strains 61.2, 63-3-1, BIM B-171 have considerable genetic heterogeneity. The *B. pumilus* strain 11-1-1 isolated from Mogilev region of Belarus from rotten potato tuber was selected for whole-genome sequencing. Totaling 740 600 reads (2×300 bp) were obtained after quality trimming and filtering and used for *de novo* assembling with SPAdes 3.13. The final assembly was 3,85 Mbp in length and consisted of 51 contigs with maximum size 530 090 bp. Gene prediction and functional annotation are performed at this moment. Analysis result will be reported on conference.

This work was supported by The Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant B19-110).

**Coinoculation effect of potato microclones by rhizosphere bacteria under osmotic stress in vitro**Evseeva N.V.<sup>1</sup>, Denisova A.Yu.<sup>2</sup>, Burygin G.L.<sup>1,2</sup>, Pozdnyakova N.N.<sup>1</sup>, Tkachenko O.V.<sup>2</sup><sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia;<sup>2</sup>Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Saratov, Russia

E-mail: evseeva\_n@ibppm.ru

**Key message.** Inoculation of potato plants with a mixing culture of *A. brasilense* Sp245 and *O. cytisi* IPA7.2 under osmotic stress in vitro promoted an increase in catalase activity in plant leaves.

**Keywords:** in vitro plant cell and tissue culture, potato, *Azospirillum brasilense* Sp245, *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2, osmotic stress

For bacterial inoculation of cultivated plants, more and more attention is paid to associations of microorganisms from different taxa, which could complement each other and have growth-stimulating and adaptive effects on plants.

The purpose of this work was to study the effect of a mixing culture of *Azospirillum brasilense* Sp245 and *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 on the physiological and biochemical parameters of potato microclones under conditions of osmotic stress in vitro. Microplants of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Nevsky from the collection of in vitro potato microclones of the Saratov State Agrarian University were used. As inoculants, two bacterial strains from the Collection of Rhizosphere Microorganisms of the Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, were used: *A. brasilense* Sp245 – low salt tolerance and *O. cytisi* IPA7.2 – halotolerant strains. The bacteria were placed on a liquid Murashige-Skoog (MS) medium for plant growth at a concentration of 10<sup>6</sup> cells/ml. Osmotic stress was created by adding polyethylene glycol (FW 6000) to the MS medium at a concentration of 25 g/l, which corresponded to the osmotic pressure in the growing medium –0.3 MPa. The physiological and morphological parameters of plants, the content of malondialdehyde (MDA), peroxidase and catalase enzymes in leaves were evaluated on the 7th day of stress action and on the 7th day of reparation.

The positive effect of bacterization on the physiological and morphological parameters of plants was established only under optimal conditions. It was shown that the activity of peroxidase, as one of the antioxidant proteins, sharply increased in both bacterized and control plants under stress. Bacterization also promoted an increase in catalase in plant leaves under stress and reparation. The content of MDA, as an indicator of oxidative stress, also increased in the leaves of both inoculated and non-inoculated variants. However, during the reparation of bacterized plants, in contrast to the control under stress, the MDA content was equal to its content in the leaves of plants without stress.

Thus, bacterization of potato plants by a mixing culture of *A. brasilense* Sp245 and *O. cytisi* IPA7.2 promoted a decrease in the level of oxidative processes under stress in plants due to an increase in catalase activity.

This work was supported by the RFBR grant No. 19-016-00116.

**Эффект коинокуляции микроклонов картофеля ризосферными бактериями при осмотическом стрессе in vitro**Evseeva N.V.<sup>1</sup>, Denisova A.Yu.<sup>2</sup>, Бурьгин Г.Л.<sup>1,2</sup>, Позднякова Н.Н.<sup>1</sup>, Ткаченко О.В.<sup>2</sup><sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия; <sup>2</sup>Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И.Вавилова, Саратов, Россия

**Аннотация.** Инокуляция растений картофеля совместной культурой бактерий *A. brasilense* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 при осмотическом стрессе in vitro способствовала повышению активности каталазы в листьях растений.

**Ключевые слова:** культура клеток и тканей растений in vitro, картофель, *Azospirillum brasilense* Sp245, *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2, осмотический стресс

Для бактериальной инокуляции культурных растений все больше внимания уделяется ассоциациям микроорганизмов из разных таксонов, которые могли бы дополнить друг друга и оказать ростстимулирующий и адаптационный эффекты на растения.

Целью данной работы было изучить влияние смешанной культуры бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 на физиолого-биохимические параметры микроклонов картофеля в условиях осмотического стресса in vitro. Были использованы микрорастения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Невский из коллекции микроклонов картофеля in vitro ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. В качестве инокулянтов были использованы 2 штамма бактерий из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН: *A. brasilense* Sp245 – слабосолеустойчивый и *O. cytisi* IPA7.2 – галотолерантный штаммы. Бактерии добавляли в среду Мурасиге-Скуга (МС) для выращивания растений в концентрации 10<sup>6</sup> кл/мл. Осмотический стресс создавали путем добавления в среду МС полиэтиленгликоля (М.м. 6000) в концентрации 25 г/л, что соответствовало осмотическому давлению в среде выращивания –0,3 МПа. Оценивали физиолого-морфологические параметры растений, содержание малонового диальдегида (МДА), ферментов пероксидазы и каталазы в листьях на 7 сутки действия стресса и на 7 сутки репарации.

Установлен положительный эффект бактеризации на физиолого-морфологические параметры растений только в оптимальных условиях. Показано, что активность пероксидазы, как одного из антиоксидантных белков, резко повышалось как у бактеризованных, так и контрольных растений при стрессе. Бактеризация также способствовала повышению каталазы в листьях растений при стрессе и репарации. Содержание МДА, как показателя окислительного стресса, также увеличивалось в листьях как инокулированных, так и неинокулированных вариантов. Но при репарации бактеризованных растений, в отличие от контрольных при стрессе, содержание МДА оказалось равным содержанию его в листьях растений без стресса.

Таким образом, бактеризация растений картофеля совместной культурой бактерий *A. brasilense* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 способствовала снижению уровня окислительных процессов при стрессе в растениях за счет повышения активности каталазы.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-016-00116.

### Agrobacterial transformation of maize by *in planta* and *in vitro* methods: problems and decisions

Fadeev V.V., Mazilov S.I., Ulyanov A.V., Gusev Yu.S., Chumakov M.I.

Institute of biochemistry and physiology of plants and microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

E-mail: vvf2593@gmail.com

**Annotation.** Problems of agrobacterial transformation of maize by methods *in planta* and *in vitro* are described. Experimental data on optimization of regeneration from transformed embryogenic maize callus of the KM line are presented.

**Keywords:** maize, Agrobacterium-mediated transformation, regeneration, embryogenic callus

Relevance: currently, the Agrobacterium-mediated plant transformation method is widely used in modern biotechnology, including the CRISPR/Cas system.

Purpose: Regeneration the maize KM line plants from the immature embryo.

Results: The main problem with the agrobacterial transformation of maize by *in planta* method are the seasonality of maize flowering and temperature requirements. The effectiveness of maize transformation by the *in planta* method is also affected by the use of various agrobacterial strains and maize lines, the procedure for applying of agrobacterial cell-pollen suspension to the maize pistil filaments [1].

In the case of agrobacterial transformation of maize by *in vitro* method, one of the problems is to obtain an embryogenic callus from 10-12-day-old embryos. Not all maize genotypes regenerate well from callus cultures [2]. For each type of regenerated plant, it is necessary to select the environment for cultivation. For monocotyledonous plants, regeneration is complicated by a low morphogenic potential.

Experimental data showed that for optimal regeneration from the embryogenic maize callus, it is necessary to add 1 mg/l of 2,4-D and 15 g/l of sucrose to the Murashige-Skoog (MS) medium. With such changes, regeneration was 2 times more intense, compared to the literature described MS media with a content of 1.5 mg/l of 2,4-D and 25 g/l or 30 g/l of sucrose. For rooting regenerants of maize for 3 weeks before planting into the soil, a gradual decrease in the content of sucrose was carried out, which contributed to the formation of adventitious roots. Experiments have shown that the optimal conditions for regeneration and growth were: illumination of 3000-4000 Lux with a 16-hour photoperiod, the temperature is 23-25 °C.

The work was carried out under the program of fundamental scientific research of the state academies of Sciences for 2020 (№ AAAA-A17-117102740101-5) and with the financial support of grants from RFBR-a №20-016-00020 and RFBR-mol-e-a № 20-316-80020.

### Проблемы агробактериальной трансформации кукурузы методами *in planta*, *in vitro*

Фадеев В.В., Мазиллов С.И., Ульянов А.В., Гусев Ю.С., Чумаков М.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

**Аннотация.** Описаны проблемы агробактериальной трансформации кукурузы методами *in planta*, *in vitro*. Приведены экспериментальные данные оптимизации регенерации трансформированного эмбрионного каллуса кукурузы линии КМ.

**Ключевые слова:** кукуруза, агробактериальная трансформация, регенерация, эмбрионный каллус

Метод агробактериальной трансформации растений широко используется в современной биотехнологии. В том числе в одном из перспективных современных методов геномного редактирования (CRISPR/Cas9).

Целью исследования является описание проблем агробактериальной трансформации кукурузы методами *in planta*, *in vitro*, а также оптимизация регенерации из трансформированного эмбрионного каллуса кукурузы линии КМ.

Главными проблемами агробактериальной трансформации кукурузы методом *in planta* являются: сезонность цветения кукурузы, трудность соблюдения оптимальной температуры. Эффективность трансформации зависит от использования различных штаммов агробактерий, линий кукурузы, способа и порядка нанесения суспензии агробактериальных клеток и пыльцы на пестичные нити [1].

При агробактериальной трансформации кукурузы методом *in vitro*, одной из проблем является трудность получение эмбрионного каллуса из 10-12 дневных зародышей. Не все генотипы кукурузы хорошо регенерируют из каллуса [2]. Экспериментальные данные показали, что для оптимальной регенерации из эмбрионного каллуса кукурузы линии КМ необходимо добавить в среду Мурасиге-Скуга (МС) 1 мг/л 2,4-D и 15 г/л сахарозы. При таких изменениях регенерация происходила в 2 раза интенсивнее, в сравнении с литературно описанными средами МС с содержанием 1,5 мг/л 2,4-D и 25 г/л либо 30 г/л сахарозы. Для укоренения регенерантов на протяжении 3 недель до высаживания в почву, проводили постепенное снижение содержания сахарозы, что способствовало образованию придаточных корней. Подобраны оптимальные условия для регенерации и выращивания: освещённость 3000-4000 люкс, 16 часовой фотопериод, температура 23-25 °C

Работа выполнена по программе фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2020 г. (№ гос. регистрации AAAA-A17-117102740101-5) и при финансовой поддержке грантов РФФИа №20-016-00020 и РФФИ-мол-э-а № 20-316-80020.

1. Чумаков М.И., Рожок Н.А., Великов В.А., Тырнов В.С., Волохина И.В. Генетика. 2006. Т. 42, №8. С 1083-1088.
2. O'Kennedy M., Lotter-Stark H., Dube N. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 2011. 710. 343-54.

**The effect of oil pollution on the activity of physiological and biochemical processes in *Triticum aestivum* L. and the number of rhizospheric microbiota**

Farkhudinov R.G., Grigoriadi A.S., Sotnikova Yu.M.

Bashkir State University, Ufa, Russia

E-mail: nysha111@yandex.ru

**Key message.** The article presents the results of a study of the effect of oil pollution on the biochemical and morphometric parameters of the plant *Triticum aestivum* L., as well as a change in the number of rhizospheric microorganisms capable of degradation of petroleum hydrocarbons. It was shown that under the influence of pollution in plants increased the activity of redox enzymes. A significant increase in hydrocarbon-oxidizing bacteria and fungi was recorded in the rhizosphere

**Keywords:** *Triticum aestivum* L., rhizospheric microorganisms, oil pollution

The most typical anthropogenous factors of soil pollution are oil and refinery products. They have negative effect on vascular plants. Phytoremediation, using the combined metabolic potential of microorganisms and plants, plays a special role in cleaning the soil of toxicants. This method is currently gaining popularity.

The aim of the study was to study the effect of oil pollution on *Triticum aestivum* L. and microorganisms living in the plant rhizosphere. Plants were grown in oil-contaminated soil (pollutant concentration was 1, 3 and 6%). The response of plants to stress was determined by a number of morphometric and biochemical parameters, such as plant length, enzymes, pigments. The number of various ecological groups of microorganisms in the rhizosphere of plants was also estimated. Soil samples were taken from the rhizosphere of 10- and 20-day-old plants. The number of microorganisms was determined by seeding on different nutrient media. The spectrophotometric method was used to determine the biochemical parameters of plants.

It was shown, that certain changes have been found in the plants which have been grown up in polluted soil in the linear sizes of roots and elevated part of plants. For example, if in the control variant of experience the length of an elevated part of wheat in the age of 20 day made 26,05 cm and in the variant with concentration of oil of 3 % the length of a plant was only 15,91 cm. When the oil content in the soil was 6% plant seeds grew much later than in other test variants. Seed germination was 70% below control. This fact confirms the opinion that the use of the phytoremediation method is justified only when the pollutant concentration in the soil is not more than 5%.

Oil pollution effect on plants caused significant changes in the functional condition of plants. Different concentrations of oil caused significant increase in peroxidase activity both in leaves (2,5-3 times), and in roots (1,5-2 times). Polyphenol oxidase activity in leaves irrespective of the concentration of oil increased by 1,3-1,6 times compared to the control plants.

The number of microorganisms of various physiological groups in the rhizosphere of wheat changed during the growing of plants. In the first 10 days, the total number of heterotrophic microorganisms in the rhizosphere of wheat decreased several times under the influence of oil pollution. After 20 days, this parameter increased several times (2-5), however, high (6%) oil concentrations inhibited the value of this indicator. Obviously, by this time the concentration of toxic light fractions of the pollutant was reduced, or the products of the breakdown of oil could be used by them as a source of nutrition and energy.

Oil pollution of the soil stimulated the development of a population of microorganisms - oil destructors. The number of hydrocarbon-oxidizing microorganisms (HOM) in the rhizosphere of wheat increased by one or two orders of magnitude in all samples already in the first 10 days of wheat plant growth. A study of the species composition of HOM showed that most bacteria belonged to the genus *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Arthrobacter*.

Throughout the experiment, oil pollution contributed to an increase in the number of microscopic fungi. In the rhizosphere of wheat, more than half of the isolated fungi had hydrocarbon-oxidizing activity. Representatives of two genera *Aspergillus* and *Penicillium* predominated in soil samples.

Thus, oil pollution stimulated the growth of hydrocarbon-oxidizing bacteria and microscopic fungi in the rhizosphere of *Triticum aestivum* L. It can be assumed that they make a certain contribution to the process of rhizodegradation of oil in the soil. At the same time, oxidation-reduction processes carried out by peroxidases and polyphenol oxidases were activated in the leaves and roots of plants under the influence of pollution.

**Bioremediation potential of a halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* EG1QL3: exopolysaccharide production, crude oil degradation, and heavy metal tolerance**Fedonenko Y.P.<sup>1</sup>, Ibrahim I.M.<sup>2</sup>, Sigida E.N.<sup>1</sup>, Safronova V.I.<sup>3</sup>, Kokoulin M.S.<sup>4</sup>, Muratova A.Y.<sup>1</sup>, Konnova S.A.<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia; <sup>2</sup>Fayoum University, Fayoum, Egypt; <sup>3</sup>All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia; <sup>4</sup>G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia; <sup>5</sup>Chernyshevsky Saratov State University, Saratov, Russia

E-mail: fedonenko\_yu@ibppm.ru

**Key message.** Based on biochemical and phylogenetic analyses, isolated from a salt sample from Lake Qarun (Egypt) a halophilic strain EG1QL3 was identified as *Chromohalobacter salexigens*. The abilities of EG1QL3 to produce an extracellular polysaccharide, degrade oil, and resist to heavy metals were revealed.

**Keywords:** *Chromohalobacter salexigens*, extracellular polysaccharide, crude oil degradation, heavy metal tolerance

Hypersaline environments of natural and artificial origin, such as saline lakes, salt marshes, and solar evaporation ponds, are used widely for the production of salt, potash, and soda. A side effect of the industrial use of such environments is their pollution by oil compounds. To survive under unfavorable conditions, halophilic bacteria produce large quantities of protective extracellular biopolymers, with the predominance of proteins and exopolysaccharides (EPS).

A halophilic bacterial strain, EG1QL3, was isolated from a salt sample from Lake Qarun, Fayoum Province, Egypt. Morphological, physiological, biochemical, and phylogenetic analyses indicated that the strain belongs to the species *Chromohalobacter salexigens*. Strain EG1QL3 produced an EPS, with production peaking (14 g L<sup>-1</sup>) during growth on S-G medium containing 3% (w/v) sucrose and 15% (w/v) NaCl at 25 °C (pH 8.0). For identifying the optimal conditions for EPS production, *C. salexigens* EG1QL3 was grown at various temperatures, pH values, and salt concentration. The composition of and the ratio between carbon sources was also varied. The EPS was precipitated from the culture broth with cold ethanol and was purified by gel filtration and anion-exchange chromatography. The molecular mass of the EPS was 1.1–0.7×10<sup>5</sup> Da. Diffuse reflectance infrared Fourier transform and nuclear magnetic resonance spectra showed that the EPS was a linear β-(2→6)-linked fructan (levan). The EPS demonstrated emulsifying activity (E<sub>24</sub>,%) against kerosene (15.6±0.5%), and sunflower oil (38.5±0.7%). Furthermore, the prepared emulsions were stable for 7 days at 25 °C.

Strain *C. salexigens* EG1QL3 was able to utilize crude oil as the sole carbon source within 12 days causing it to coagulate. The best oil degradation values by *C. salexigens* EG1QL3 (30%) were in the presence of 2.5 M NaCl. The minimum inhibitory concentrations of heavy metals for strain EG1QL3 were 1.5 for Zn(II) and 2.0 mM for each of Cd(II), Pb(II), Ni(II), and Cu(II). *C. salexigens* EG1QL3 expressed plant growth attributes. The strain grew on nitrogen-free medium, which indicated the presence of nitrogen-fixing ability, and produced siderophores during growth on CAS agar.

In present work, we characterized the structure of the strain's EPS and optimized conditions for its production. Strain *C. salexigens* EG1QL3 was found to be promising for use in the cleanup of saline environments contaminated with oil hydrocarbons and heavy metals.

**Ion transporters in the root nodule of *Medicago truncatula*: potassium transporters**

Fedorova E.E., Trifonova N.A.

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia

E-mail elenafedorova06@mail.ru

**Key message.** The transporter proteins were mistargeted and partly depleted from plasma membrane of mature infected cells, this phenomenon may contribute to the potassium loss by symbiosomes during their development and senescence.

**Keywords:** root nodule, legume/Rhizobium symbiosis, membrane potassium transporters.

The root nodule is a temporary short-lived organ, an ecological niche in the plant tissue for nitrogen-fixing bacteria of the rhizobium genus. Based on the data on high sensitivity of root nodules to ionic stresses (Coba de la Peña et al., 2010, Noori et al., 2016) we hypothesized that infected nodule cells may have physiological defects in maintaining ion balance. Ionic status, in turn, depends on the expression and localization of membrane ion transporters. A preliminary analysis of ion's distribution in the symbiosomes and vacuoles of infected cells, performed by energy dispersive spectrometry with X-ray microanalysis and scanning microscopy, showed that infected cells lose potassium during ontogenesis. In order to identify the causes of this phenomenon, a study was conducted of two key plant-based potassium carriers with opposite potassium transfer vectors: inwardly rectifying potassium transporter MtAKT1 and Outward Rectifier potassium channel MtSKOR.

Both transporters were expressed in the meristem, zone of active nitrogen fixation, and in senescence zone. In uninfected cells, MtAKT and MtSKOR were localized on the cytoplasmic membrane. In mature infected cells, the localization of proteins was impaired. We observed a partial loss of transporters from cytoplasmic membrane. The MtSKOR protein was redirected to the symbiosome membrane. The relocation of this transporter while maintaining the transport vector, can contribute to the potassium loss from symbiosomes. The flaws of the localization of membrane transporters may be one of the reasons for the decrease in the potassium availability for the symbiosomes and vacuoles of infected cells during their ontogenesis.

The work is supported by the Russian Science Foundation (project №19-04-00570A).

**Ионные транспортеры в корневом клубеньке *Medicago truncatula*: переносчики калия.**

Федорова Е.Э., Трифонова Н.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

**Аннотация.** Нарушение локализации белков ионных транспортеров в инфицированных клетках клубенька может приводить к уменьшению доступности калия для симбиосом.

**Ключевые слова:** корневой клубенек, бобово-ризобийный симбиоз, мембранные транспортеры калия.

Корневой клубенек является временным короткоживущим органом, экологической нишей в растительной ткани для азотфиксирующих бактерий рода ризобиум. Основываясь на данных о высокой чувствительности корневого клубенька к ионным стрессам (Coba de la Peña et al., 2010, Noori et al., 2016) мы предположили, что инфицированные клетки клубенька могут иметь физиологические дефекты в поддержании ионного баланса. Ионный статус, в свою очередь, зависит от экспрессии и локализации мембранных переносчиков ионов. Предварительный анализ содержания ионов в симбиосомах и вакуолях инфицированных клеток, выполненный с использованием энергодисперсионной спектроскопии с рентгеновским микроанализом и сканирующей микроскопии показал, что инфицированные клетки в процессе онтогенеза теряют калий (Fedorova et al., 2020 (in press)). С целью выявления причин этого явления было проведено исследование двух ключевых растительных переносчика калия с противоположными векторами переноса калия: канал входящего направления MtAKT и канал выходящего направления MtSKOR.

Экспрессия переносчиков в клубеньке отмечена в зоне меристемы, зоне активной азотфиксации и в зоне старения. В неинфицированных клетках MtAKT и MtSKOR были локализованы на цитоплазматической мембране. В зрелых инфицированных клетках локализация белков была нарушена, была отмечена частичная потеря переносчиков цитоплазматической мембраной. Происходило перенаправление белка MtSKOR к симбиосомной мембране, что, при сохранении вектора транспорта, может способствовать выносу калия из симбиосом. Нарушение локализации мембранных переносчиков может быть одной из причин уменьшения содержания калия в симбиосомах и вакуолях инфицированных клеток.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-04-00570A).

Coba de la Peña T, Redondo FJ, Manrique E, Lucas MM, Pueyo JJ. 2010. Nitrogen fixation persists under conditions of salt stress in transgenic *Medicago truncatula* plants expressing a cyanobacterial flavodoxin. Plant Biotechnol. J. 8, 954-965.

Noori F, Etesami H, Zarini HN, Khoshkholgh-Sima NA, Salekdeh GH, Alishahi F. 2018. Mining alfalfa (*Medicago sativa* L.) nodules for salinity tolerant non-rhizobial bacteria to improve growth of alfalfa under salinity stress. Ecotoxicology and Environmental Safety 162, 129-138.

### **Influence of bacteria of the genus *Azospirillum* on sugar beet productivity**

*Fedorova O.A., Bezler N.V.*

Federal State Budgetary Scientific Institution "The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar",  
Voronezh region, Ramonsky district, Russia  
E-mail: fed-olga78@mail.ru

**Key message.** *Spraying of sugar beet plants with nitrogen-fixing strains of bacteria of the genus *Azospirillum* promotes activation of sugar beet growth and increase of its productivity.*

**Keywords:** *sugar beet, strains, *Azospirillum*, productivity.*

Bacteria of the genus *Azospirillum* are known as PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) because of ability to form associations with plants and to influence positively on their growth and development [1]. To study bacteria of the genus *Azospirillum* under specific conditions of sugar beet cultivation is urgent because of works on this problem being absent.

Aim of the present work is to study influence of nitrogen-fixing strains of *Azospirillum* on sugar beet productivity.

Object of the investigations are bacteria of *Azospirillum* sp. 184 and *Azospirillum* sp. 190 isolated from root surface and rhizosphere of grain crops (wheat, barley). Sugar beet hybrids RMS 120, RMS 121 and 17036 have been grown in a crop rotation with the following crop alternation: fallow – winter wheat – sugar beet – barley. Suspensions of the cultures have been applied by spraying during the period of crop closing (a titer of viable bacterial cells being 10<sup>8</sup> CFU/ml). Control is the variant without treatment with a bacterial suspension. There have been determined sugar beet yield by weight method, sugar content of beet roots using an automatic production line VENEMA, and sugar yield by calculation method. Results of the conducted field experiments have shown that the studied strains have a positive influence on sugar beet growth, development and productivity. Thus, as the data analysis has shown, the influence extent depends on a ploidy of plants. The best results of sugar beet growth, development and productivity are registered in plants of the tetraploid line 17036. Introduction of the strains *Azospirillum* sp. 184 and *Azospirillum* sp. 190 has increased sugar beet yield by 11.8 and 7.5 t/ha, and sugar content of beet roots by 0.91 and 0.3 %, accordingly. At the same time, application of the strain cell suspensions has resulted in decrease of yield in the triploid hybrid RMS 121. This fact motivates the necessity of further investigations to reveal the most effective strains and optimal bacterial titer of the genus *Azospirillum* for each hybrid depending on its ploidy.

### **Влияние бактерий рода *Azospirillum* на продуктивность сахарной свеклы**

*Федорова О.А., Безлер Н.В.*

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А. Л. Мазлумова»,  
Воронежская область, Рамонский район, Россия

**Аннотация.** *Опрыскивание растений сахарной свеклы азотфиксирующими штаммами бактерий рода *Azospirillum* способствует активации роста сахарной свеклы и повышению ее продуктивности.*

**Ключевые слова.** *Сахарная свекла, штаммы, *Azospirillum*, продуктивность.*

Бактерии рода *Azospirillum* благодаря способности вступать в ассоциации с растениями и оказывать благотворное влияние на их рост и развитие известны как PGPR (ризобактерии, стимулирующие рост и развитие растений) [1]. Актуальность изучения бактерий рода *Azospirillum* в специфических условиях выращивания сахарной свеклы определяется отсутствием разработок по данной проблеме.

Цель настоящей работы - изучить влияние азотфиксирующих штаммов азоспирилл на продуктивность сахарной свеклы.

Объект исследований - бактерии *Azospirillum* sp. 184 и *Azospirillum* sp. 190, выделенные с поверхности корней и ризосферы злаковых растений (пшеница, ячмень). Выращивали гибриды сахарной свеклы РМС 120, РМС 121, 17036, в севообороте со следующим чередованием культур: пар – озимая пшеница – сахарная свекла – ячмень. Суспензии культур вносили опрыскивателем в период смыкания посевов в рядке (титр жизнеспособных бактериальных клеток 10<sup>8</sup> КОЕ/мл). Контроль – без обработки бактериальной суспензией. Урожайность сахарной свеклы учитывали весовым методом, сахаристость корнеплодов определяли на автоматической поточной линии VENEMA, сбор сахара – расчетным методом. Результаты проведенных полевых исследований показали, что исследуемые штаммы оказывают положительное действие на рост, развитие и продуктивность сахарной свеклы. При этом степень влияния, как показал анализ полученных данных, зависит от плоидности растений. Наилучшие результаты по росту, развитию и урожайности сахарной свеклы были отмечены у растений тетраплоидной линии 17036. Интродукция штаммов *Azospirillum* sp. 184 и *Azospirillum* sp. 190 повысила урожайность сахарной свеклы на 11,8 и 7,5 т/га, сахаристость корнеплодов – 0,91 и 0,3%, соответственно. В то же время, внесение клеточной суспензии штаммов вызвало снижение урожайности сахарной свеклы у триплоидного гибрида РМС 121. Этот факт определяет необходимость дальнейших исследований по выявлению наиболее эффективных штаммов и оптимальных титров бактерий рода *Azospirillum* для каждого гибрида в зависимости от плоидности.

Михайловская Н.А. Азоспириллы и их влияние на злаковые культуры // Почвоведение и агрохимия. – №2. – 2015. – С. 167-174.



## The role of auxin-producing bacteria in the formation of a growth response in wheat plants under herbicidal stress

Feoktistova A.V., Timergalin M.D., Rameev T.V., Chetverikov S.P.

Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: chelab007@yandex.ru

**Key message.** The paper presents the results of the effect of treatment with bacteria on the growth and hormonal balance of wheat plants with simultaneous exposure to the herbicide Chistalan. It is shown that herbicide stress is leveled by bacteria.

**Keywords:** plant hormones, chlorophyll, herbicidal stress, wheat, rhizosphere bacteria

Crop production in our time is not possible without the use of herbicides, which are necessary for obtaining good crop yields. However, their use has a negative impact on cultivated plants, causing them herbicidal stress. More and more interest has recently been given to the search for candidates that can reduce the toxic effect of herbicides on the cultivated crop. The most attractive in agriculture is the use of rhizosphere bacteria that can produce phytohormones (auxins) and have a growth-stimulating effect on plants under stress.

The research was carried out in laboratory conditions on a light site, the objects were plants of wheat (*Triticum aestivum* L.) of the Kinelskaya Yubileynaya variety. The herbicide Chistalan extra was used in the work at a working concentration of 05 ml/l and a suspension of bacteria *Pseudomonas koreensis* IB-4 (azolen) and *Pseudomonas* sp. DA1.2. Wheat seedlings were planted in vessels with soil-sand mixture, processing was carried out after 2 weeks, by spraying in the following combinations: water (control), Chistalan, Chistalan with *P. koreensis* IB-4 and Chistalan with strain DA1.2. A 1 day after treatment, samples were taken for hormones, 3 days later - for chlorophyll, and 14 days later, plant growth was evaluated.

Treatment of plants with herbicide resulted in suppression of wheat plant growth and reduction of chlorophylls a, b. A significant increase in the content of IAA in the shoots of these plants was also found, which could be related to the ability of 2,4D to influence the metabolism of IAA. The accumulation of ABA in the roots and shoots of these plants contributed to inhibition of growth. However, joint treatment with bacteria led to a decrease in the negative effect of the herbicide, which consisted in increasing the content of chlorophylls and in the accumulation of raw mass by plants. Under the action of bacteria, the content of IAA and ABA decreased, which could contribute to the leveling of stress in response to the introduction of the herbicide. Thus, we have shown that auxin-producing bacteria *Pseudomonas* sp. DA1.2, both *P. koreensis* IB-4 can be used as an "antidote" under herbicidal stress.

The study was carried out within the framework of the Ministry of education and science of Russia № 075-00326-19-00 on the topic № ААААА-А19-119021390081-1.

## Роль ауксинпродуцирующих бактерий в формировании ростового ответа у растений пшеницы в условиях гербицидного стресса.

Феоктистова А.В., Тимергалин М.Д., Рамеев Т.В., Четвериков С.П.

Уфимский Институт биологии - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа, Россия

**Аннотация.** В работе представлены результаты влияния обработки бактериями на рост и гормональный баланс растений пшеницы при одновременном воздействии на них гербицидом чисталан. Показано нивелирование гербицидного стресса под действием бактерий.

**Ключевые слова:** гормоны растений, хлорофилл, гербицидный стресс, пшеница, ризосферные бактерии

Растениеводство в наше время не представляется возможным без использования гербицидов, которые необходимы для получения хороших урожаев культур. Однако, их применение негативно сказывается и на культурных растениях, вызывая у них так называемый гербицидный стресс. Все больший интерес в последнее время отводится поиску антидотов, способных снижать токсическое действие гербицидов на обрабатываемую сельскохозяйственную культуру. Наиболее привлекательным в сельском хозяйстве становится использование ризосферных бактерий, способных продуцировать фитогормоны (ауксины) и оказывать рост стимулирующее действие на растения в условиях стресса.

Исследования проводили в лабораторных условиях на светоплощадке, объектами служили растения мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Кинельская Юбилейная. В работе использовали гербицид чисталан экстра в рабочей концентрации 05 мл/л и суспензию штаммов бактерий *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 (азолен) и *Pseudomonas* sp. ДА1.2 с титром 10<sup>8</sup> КОЕ/мл. Проростки пшеницы сажали в сосуды с почво-песочной смесью, обработку проводили через 2 недели опрыскиванием в следующих вариантах: вода (контроль), чисталан, чисталан с *P. koreensis* ИБ-4 и чисталан со штаммом ДА1.2. Через сутки после обработки брали пробы на гормоны, через 3 суток – на хлорофилл и через 14 суток оценивали рост растений.

Обработка растений гербицидом привела к подавлению роста растений пшеницы и к снижению хлорофиллов а, b. Также было обнаружено значительное увеличение содержания ИУК в побегах этих растений, что могло быть связано со способностью 2,4Д влиять на метаболизм ИУК. Накопление АБК в корнях и побегах этих растений способствовало торможению роста. Однако совместная обработка с бактериями приводила к снижению негативного действия гербицида, которое заключалось в повышении содержания хлорофиллов и в накоплении сырой массы растениями. Под действием бактерий снижалось содержание ИУК и АБК, что могло способствовать нивелированию стресса в ответ на внесение гербицида.

Таким образом, нами показано, что ауксинпродуцирующие штаммы бактерий *Pseudomonas* sp. ДА1.2 и *P. koreensis* ИБ-4 могут быть использованы в качестве «антидота» в условиях гербицидного стресса.

Исследование выполнено в рамках ГЗ Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А19-119021390081-1.

**The development of cyanobacteria and fungi of the genus *Fusarium* in mono- and polycultures**Fokina A.I.<sup>1</sup>, Domracheva L.I.<sup>2</sup>, Kovina A.L.<sup>2</sup>, Skugoreva S.G.<sup>1,3</sup><sup>1</sup>Vyatka State University, Kirov, Russia; <sup>2</sup>Vyatka State Agricultural Academy, Kirov, Russia; <sup>3</sup>Institute of Biology, FIC Komi Scientific Center, Ural Branch of RAS, Syktyvkar, Russia

E-mail: annushka-fokina@mail.ru

**Key message.** Under the influence of the cyanobacteria (CB) of *Fischerella muscicola*, growth of *F. culmorum*, *F. oxysporum*, and *F. poae* was inhibited by 80, 95, and 25%, respectively. The number and length of CB strands in biofilm conditions increases by 2–4 times.

**Keywords:** cyanobacteria, antifusarium effect, biofilms

Many cyanobacteria (CB) have a pronounced antimicrobial activity against pathogens. Of great importance is the study of the possibilities of cyanobacterial metabolites to inhibit and inhibit the development of phytopathogenic fungi *p. Fusarium*, which are one of the most malicious pathogens of mycoses of agricultural and ornamental crops. Of interest are *Fischerella muscicola* CB, for which an increased growth rate in culture, high antagonistic activity, and the ability to synthesize a variety of biologically active substances have been proved. In experiments conducted with CB *Fischerella muscicola*, it was shown that, under the influence of its metabolites, growth of *F. culmorum*, *F. oxysporum*, and *F. poae* was inhibited by 80, 95, and 25%, respectively, when micromycetes were grown in solid nutrient medium.

The ability to form biofilms (BP) is an integral part of the life cycle of most microorganisms to facilitate the joint development of ecological niches.

In our work, we studied the features of the formation of cyanobacterial biofilms based on *F. muscicola* in a monoculture and as part of binary and triple associations with *Nostoc muscorum* and *N. paludosum*. The development of *Fischerella* in a monoculture significantly lags behind binary and triple associations both in the number of cells and in the length of cyanobacterial filaments. A measure of the intensity of development of cyanobacteria in biofilms was their number ( $10^7$  cells/cm<sup>2</sup>) and thread length (m/cm<sup>2</sup>). It has been proved that the “quorum sensing” characteristic of natural multi-species films is also inherent in artificially constructed associations, providing them with increased growth and development of phototrophic partners. So, the number of *Fischerella muscicola* CB in the monoculture was  $(4.05 \pm 0.69) \cdot 10^7$  cells/cm<sup>2</sup>; under the conditions of a consortium with other types of CBs, this indicator increased two to four times. Similarly, the values of the length of the threads changed.

**Развитие цианобактерий и грибов рода *Fusarium* в моно- и поликультурах**Фокина А.И.<sup>1</sup>, Домрачева Л.И.<sup>2</sup>, Ковина А.Л.<sup>2</sup>, Скугорева С.Г.<sup>1,3</sup><sup>1</sup>Вятский государственный университет, Киров, Россия; <sup>2</sup>Вятская государственная сельскохозяйственная академия, Киров, Россия; <sup>3</sup>Институт биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

**Аннотация.** Под влиянием цианобактерии (ЦБ) *Fischerella muscicola* происходило ингибирование роста *F. culmorum*, *F. oxysporum* и *F. poae* на 80, 95 и 25% соответственно. Численность и длина нитей ЦБ в условиях биопленок возрастает в 2–4 раза.

**Ключевые слова:** цианобактерии, антифузариозный эффект, биопленки

Многие цианобактерии (ЦБ) обладают ярко выраженной антимикробной активностью в отношении патогенов. Большое значение имеет изучение возможностей цианобактериальных метаболитов угнетать и подавлять развитие фитопатогенных грибов р. *Fusarium*, которые являются одними из самых злостных возбудителей микозов сельскохозяйственных и декоративных культур. Интерес представляют ЦБ *Fischerella muscicola*, для которой доказана повышенная скорость роста в культуре, высокая антагонистическая активность и способность к синтезу разнообразных биологически активных веществ. В опытах, проведенных с ЦБ *Fischerella muscicola*, показано, что под влиянием её метаболитов происходило ингибирование роста *F. culmorum*, *F. oxysporum* и *F. poae* на 80, 95 и 25% соответственно при выращивании микромицетов на плотной питательной среде.

Способность к формированию биопленок (БП) – составная часть жизненного цикла большинства микроорганизмов для облегчения совместного освоения экологических ниш.

В нашей работе были изучены особенности формирования цианобактериальных биопленок на основе *F. muscicola* в монокультуре и в составе бинарных и тройных ассоциаций с *Nostoc muscorum* и *N. paludosum*. Развитие фишереллы в монокультуре существенно отстает от бинарных и тройных ассоциаций как по численности клеток, так и по длине цианобактериальных нитей. Мерой интенсивности развития цианобактерий в биопленках служила их численность ( $10^7$  кл./см<sup>2</sup>) и длина нитей (м/см<sup>2</sup>). Доказано, «чувство кворума» (quorum sensing), характерное для природных многовидовых пленок, присуще и искусственно сконструированным ассоциациям, обеспечивая им активизацию роста и развития фототрофных партнеров. Так численность ЦБ *Fischerella muscicola* в монокультуре составила  $(4.05 \pm 0.69) \cdot 10^7$  кл./см<sup>2</sup>, в условиях консорциума с другими видами ЦБ данный показатель повышался в два–четыре раза. Аналогичным образом изменялись значения длины нитей.

### Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: applied aspects

Fokina N.A., Uryadova G.T., Karpunina L.V.

Saratov State Agrarian University named after N. I. Vavilov, Saratov, Russia

E-mail: fockina.nadejda@yandex.ru

**Key message.** Exopolysaccharides *Lactococcus lactis* B-1662 and, to a greater extent, *Streptococcus thermophilus* have a healing effect on burns in rats. The exopolysaccharide *Streptococcus thermophilus* also has a prebiotic effect in the poultry body.

**Keywords:** exopolysaccharides, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, rats, broiler chickens

In recent years, due to the increasing use of bacterial polysaccharides in various sectors of the national economy (medicine, pharmacology, veterinary medicine, etc.), considerable attention has been paid to the study of the effect of these biopolymers on physiological reactions in animals.

The aim of the work was to study the effect of exopolysaccharides of lactic acid bacteria *L. lactis* B-1662 and *S. thermophilus* on the healing of burns in rats, as well as the effect of *S. thermophilus* EPS on morphological and microbiological parameters in poultry. Burn was modeled on female white rats under ether anesthesia in the inter-scapular space [2]. Bacterial EPS were applied immediately after applying the burn and then until the end of the experiment for 28 days daily. Healing was judged by measuring the area of overgrowth of wounds. Hubbard cross F-15 egg production broiler chickens were given an oral solution of *S. thermophilus* EPS 2 times a week for the first month of life, based on a concentration of 0.06 g per 1 kg of poultry weight. The body weight of chickens was determined, as well as the total microbial number and the number of lactic acid bacteria in the excrement [1]. It was shown that in rats treated with EPS *L. lactis* B-1662 and *S. thermophilus*, the reduction of the burn area was observed for 3 and 1 days, respectively, and the final healing of the degree IIIa burn occurred by 23 days with complete restoration of the skin and hair cover, while in the control the recovery process was completed on 28 days. It was found that the introduction of *S. thermophilus* F-15 EPS into the feed of Hubbard cross broiler chickens contributed to an increase in their body weight by 8.2% by two months of age and an increase in lactic acid bacteria after 4 months of poultry growth by 4.2 times compared to the control.

Thus, the ability of *L. lactis* b-1662 and *S. thermophilus* EPS to heal wounds of animals (rats) and increase the body weight of chickens and lactic acid bacteria in their future can be used in medicine and veterinary medicine, agriculture.

### Экзополисахариды молочнокислых бактерий: прикладные аспекты

Фокина Н.А., Урядова Г.Т., Карпунина Л.В.

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Саратов, Россия

**Аннотация.** Экзополисахариды *Lactococcus lactis* B-1662 и *Streptococcus thermophilus* обладают заживляющим эффектом в отношении ожогов у крыс. Экзополисахарид *Streptococcus thermophilus* оказывает пребиотическое действие в организме птицы.

**Ключевые слова:** экзополисахариды, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, крысы, цыплята-бройлеры

В последние годы в связи с все большим применением бактериальных полисахаридов в различных отраслях народного хозяйства (медицине, фармакологии, ветеринарии и др.) значительное внимание уделяется изучению влияния этих биополимеров на физиологические реакции в организме животных.

Целью работы являлось изучение действия экзополисахаридов молочнокислых бактерий *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus* на заживление ожогов у крыс, а также влияние ЭПС *S. thermophilus* на морфологические и микробиологические показатели у птицы. Ожог моделировали на самках белых крыс под эфирным наркозом на межлопаточном пространстве [2]. Бактериальные ЭПС наносили сразу же после нанесения ожога и далее до конца эксперимента в течение 28 суток ежедневно. О заживлении судили путем измерения площади застания ран. Цыплятам - бройлерам кросса Хаббард ИЗА Ф-15 яичной продуктивности перорально вводили раствор ЭПС *S. thermophilus* 2 раза в неделю в течение первого месяца жизни, исходя из концентрации 0,06 г на 1 кг массы птицы. Определяли массу тела цыплят, а также, в экскрементах, общее микробное число и количество молочнокислых бактерий [1]. Было показано, что у крыс, леченых ЭПС *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus* сокращение площади ожога наблюдали уже на 3 и 1 сутки соответственно, а окончательное заживление ожога степени IIIa наступало к 23 суткам с полным восстановлением кожно-шерстного покрова, в то время как в контроле процесс восстановления завершился на 28 сутки. Установлено, что введение в корм цыплят-бройлеров кросса Хаббард ИЗА Ф-15 ЭПС *S. thermophilus* способствовало увеличению их массы тела к двухмесячному возрасту на 8,2% и повышению молочнокислых бактерий через 4 месяца роста птицы в 4,2 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, способность ЭПС *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus* к заживлению ран животных (крыс) и увеличению массы тела цыплят и молочнокислых бактерий у них в перспективе может найти применение в медицине и ветеринарии, сельском хозяйстве.

1. Лабинская, А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская. – М.: Медицина, 1978. – 394 с.
2. Пономарь Н.С. Влияние препарата ионизированного серебра на репаративную регенерацию кожи и подлежащих тканей при моделировании термических и химических ожогов у крыс / Н.С. Пономарь // Биомедицина. – 2012. – №1. – С. 143–148.

**Industrial cultivation of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* strain Dar**Frank Y.A.<sup>1,2</sup>, Antsiferov D.V.<sup>1</sup>, Glukhova L.B.<sup>1,2</sup>, Ivassenko D.A.<sup>1</sup>, Ivassenko D.A.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>LLC «Darwin», Tomsk, Russia; <sup>2</sup>Laboratory of Industrial Microbiology, Biological Institute, Tomsk State University, Tomsk, Russia  
E-mail: bio.darwin@mail.com

**Key message.** The work is focused on the selection of an appropriate substrate for solid-state fermentation using *B. bassiana* with the aim of a biopesticide production. The highest number of conidia was yielded during cultivation on polished rice moistened with water in a ratio of 1:1.5 and 1:2.

**Keywords:** *Beauveria bassiana*, solid-state fermentation, conidia, substrate, moisture content

Entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin is used worldwide for production of biological preparations for control of agricultural and forest insect pests (Faria and Wraight, 2007). Solid-state fermentation with conidia as a terminal product has several advantages compared to blastospores production by submerged liquid fermentation (Pham et al., 2010). In this regard, the development of technology for solid-state cultivation of *B. bassiana* is required.

The aim of the work was to select a substrate for solid-state fermentation using an industrial entomopathogenic strain *B. bassiana* Dar (VKM F-4851D). The following preliminary steamed substrates were tested in the experiment: (1) wheat seeds, (2) polished rice, (3) soybean seeds, (4) and (5) whole and chopped peas, (6) rapeseed meal. The moisture content of the substrate varied – the ratio substrate and water ranged from 1:0.5 to 1:2. The productivity of *B. bassiana* Dar was determined microscopically by the number of conidia in the prepared water swabs (the volume of water relative to the weight of the dry substrate 5: 1).

After 21 days of cultivation at 26 °C, the highest amount of aerial conidia was produced on steamed polished rice at the maximum moisture content (1:1.5 and 1:2). The number of conidia in these variants did not statistically differ and amounted to  $6.2 \cdot 10^7$  and  $6.8 \cdot 10^7$  per 1 ml, correspondingly. The highest number of conidia after cultivation of the fungus on rapeseed meal and on peas did not exceed  $2.5 \cdot 10^7$  and  $6.3 \cdot 10^6$  / ml with a water content of 1:1.5 and 1:1, respectively. The results of the *B. bassiana* Dar cultivation on wheat seeds and soybean seeds did not meet the criteria for industrial cultivation.

Thus, steamed polished rice serves as an optimal substrate for solid-state fermentation using *B. bassiana* Dar. To ensure productivity, substrate moisture is important.

**Промышленное культивирование энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* штамм Dar**Франк Ю.А.<sup>1,2</sup>, Анциферов Д.В.<sup>1</sup>, Глухова Л.Б.<sup>1,2</sup>, Ивасенко Д.А.<sup>1</sup>, Ивасенко Д.А.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Общество с ограниченной ответственностью «Дарвин», Томск, Россия; <sup>2</sup>Лаборатория промышленной микробиологии, Биологический институт, Томский государственный университет, Томск, Россия

**Аннотация.** Работа посвящена подбору субстрата для твердофазного культивирования *B. bassiana* с целью производства биопрепарата. Максимальная продукция конидий отмечена при культивировании на шлифованном рисе с добавлением воды в соотношении 1:1.5 и 1:2.

**Ключевые слова:** *Beauveria bassiana*, твердофазное культивирование, конидии, субстрат, влажность

Энтомопатогенный гриб *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin используют во всем мире при производстве биопестицидов для борьбы с сельскохозяйственными вредителями и вредителями леса (Faria and Wraight, 2007). Твердофазное культивирование гриба с получением конидий как конечного продукта имеет ряд преимуществ перед глубинным культивированием с получением бластоспор (Pham et al., 2010). В связи с этим актуальна разработка технологии твердофазного культивирования *B. bassiana*.

Цель работы состояла в подборе субстрата для твердофазного культивирования промышленного энтомопатогенного штамма *B. bassiana* Dar (VKM F-4851D). В эксперименте тестировали следующие субстраты, прошедшие стерилизацию насыщенным паром: (1) семена пшеницы, (2) шлифованный рис, (3) семена сои, (4) и (5) цельный и колотый горох, (6) шрот рапса. Влажность субстрата варьировала, соотношение субстрата и воды составляло в разных вариантах от 1:0.5 до 1:2. Продуктивность *B. bassiana* Dar определяли микроскопически по количеству конидий в приготовленных смывах (объем воды по отношению к весу сухого субстрата 5:1).

После 21 суток культивирования при 26 °C наибольшая продуктивность штамма Dar отмечена на шлифованном рисе в вариантах максимальной влажности субстрата (1:1.5 и 1:2). Количество конидий в смывах в данных вариантах статистически не отличалось и составило  $6.2 \cdot 10^7$  и  $6.8 \cdot 10^7$  на 1 мл, соответственно. Максимальное количество конидий в смывах при культивировании гриба на шроте рапса и на горохе не превышало  $2.5 \cdot 10^7$  и  $6.3 \cdot 10^6$ /мл при содержании воды 1:1.5 и 1:1, соответственно. Результаты культивирования продуцента на семенах пшеницы и сои не удовлетворяли критериям промышленного культивирования.

Таким образом, шлифованный рис служит оптимальным субстратом для твердофазного культивирования *B. bassiana* Dar. Для обеспечения продуктивности важна влажность субстрата.

1. Faria M.R., Wraight S.P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43, 237–256.
2. Pham T.A., Kim J.J., Kim, K. (2010) Optimization of solid-state fermentation for improved conidia production of *Beauveria bassiana* as a mycoinsecticide. *Mycobiology*, 38, 137–143.

### Physiological properties of extracts from plants subjected to cold stress

Furs O.V., Zakharchenko N.S., Dyachenko O.V., Buryanov Ya.I., Shchevchuk T.V.

Pushchino Branch, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

E-mail: znata\_2008@mail.ru

**Key message.** The biological activity of extracts from aloe and kalanchoe plants subjected to cold stress increases compared to extracts not subjected to cold stress.

**Keywords:** biological activity, extracts, low positive temperature, aloe, kalanchoe

The development of effective plant regeneration methods is an important area of modern biotechnology. Among the promising objects for biotechnology are kalanchoe (*Kalanchoe pinnata*) and aloe (*Aloe arborescens*) plants. Kalanchoe and aloe drugs with a wide range of biological activity are appreciated by modern medicine. Complex compounds contained in water extracts kalanchoe and aloe has a stimulating effect on the regeneration of animal tissue.

The aim of our work was to study the effect of kalanchoe and aloe extracts on the regeneration and calli-formation of kalanchoe plants, rapeseed (*Brassica napus*), tomatoes (*Lucopersicon esculentum* Mill.), ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*). The extract preparation included the following procedures: 1) leaves were washed with water and dried; 2) the leaves were incubated in the dark for 7 days at 4°C and then crushed in a laboratory blender; 3) the obtained mass was centrifuged at 4°C, precipitate was removed; 4) the supernatant was heated in a water bath for 2 h at 70°C to inactivate endogenous peptidases; (5) finally, the extract was sterilized using Millipore TYPE HAWP membrane filters.

The resulting extract was added to the MS nutrient medium in the amount of 1 ml per 100 ml of medium. Hormones were used for plant regeneration: for rapeseed 6-benzylaminopurin (BAP) 4 mg/L, naphthaleneacetic acid (NAA) – 2 mg/L, abscisic acid (ABA) – 3 mg/l; for kalanchoe - BAP 1 mg/L, NAA – 0.1 mg/L; for tomato – 1 mg/l kinetin, 1 mg/l indole-3-acetic acid (IAA); for the calli formation of ice plant – 0.2 mg/l of kinetin, 1 mg/l 2.4 dichlorophenoxyacetic acid (2.4D).

It was shown that the regeneration of kalanchoe on the medium with the addition of the described extracts was increased by 8-10 times compared to control 1 (treated without extract) and 3-4 times compared to control 2 (treated with extract without cold treatment); rapeseed regeneration increased 4-5 times and 2-3 times respectively; induced rhizogenesis and calli-formation of tomatoes 5-6 and 2-3 times; rhizogenesis and root formation of ice plant 3 and 2 times. These data show the stimulating effect of aloe and kalanchoe extracts on regeneration and induction of plant rhizogenesis.

The study was supported by the grants RFFI № 19.08.00375, № 18-08-00752, № 19-08-00299

### Физиологические свойства экстрактов из растений, подвергнутых холодовому стрессу

Фурс О.В., Захарченко Н.С., Дьяченко О.В., Бурьянов Я.И., Шевчук Т.В.

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия

**Аннотация.** Биологическая активность экстрактов из растений алоэ и каланхоэ, подвергнутых холодовому стрессу, увеличивается по сравнению с экстрактами не подвергнутых холодовому стрессу.

**Ключевые слова:** биологическая активность, экстракты, низкая положительная температура, алоэ, каланхоэ

Разработка эффективных методов регенерации растений является актуальной областью современной биотехнологии. Среди перспективных для биотехнологии объектов привлекают внимание растения каланхоэ (*Kalanchoe pinnata*) и алоэ (*Aloe arborescens*). Препараты каланхоэ и алоэ с широким спектром биологической активности находят применение в медицине. Комплекс соединений, содержащихся в водных экстрактах (соке) каланхоэ и алоэ оказывает стимулирующее действие на регенерацию тканей животных.

Целью нашей работы было исследование влияния экстрактов каланхоэ и алоэ на регенерацию и каллусообразование растений каланхоэ, рапса (*Brassica napus*), томатов (*Lucopersicon esculentum* Mill.), хрустальной травки (*Mesembryanthemum crystallinum*). Метод выделения экстракта включает следующие этапы: 1) срезанные листья каланхоэ или алоэ промывали водой и подсушивали; 2) листья выдерживали 7 суток в темноте при 4°C и затем размельчали в лабораторном блендере; 3) полученную массу центрифугировали при 4°C, осадок удаляли; 4) супернатант прогревали в термостате при 70°C 2 часа; 5) экстракт стерилизовали с помощью мембранных фильтров Millipore TYPE HAWP. Полученный экстракт добавляли в питательную среду МС в количестве 1 мл на 100 мл среды. Для регенерации растений использовали гормоны: для рапса – 6-бензиламинопурина (БАП) - 4 мг/л, нафтилуксусная кислота (НУК) – 2 мг/л, абсцизовая кислота (АБК) – 3 мг/л; для каланхоэ - БАП 1 мг/л, НУК – 0,1 мг/л; для томата – 1 мг/л кинетин, 1 мг/л индолилуксусная кислота (ИУК); для каллусообразования хрустальной травки – 0.2 мг/л кинетин, 1 мг/л дихлорфеноксиуксусной кислоты (2.4Д).

В результате проведенных исследований было показано, что регенерация каланхоэ на среде с добавлением описанных экстрактов увеличивалась в 8-10 раз по сравнению с контролем 1 (среда без экстракта) и в 3-4 раза по сравнению с контролем 2 (среда с экстрактом без холодовой обработки); регенерация рапса увеличивалась в 4-5 раз и в 2-3 раза соответственно; индукция ризогенеза и каллусообразование томатов в 5-6 и 2-3 раза; ризогенез и корнеобразование хрустальной травки в 3 и 2 раза. Эти данные свидетельствуют о стимулирующем эффекте экстрактов алоэ и каланхоэ на регенерацию и индукцию ризогенеза растений.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 19.08.00375, № 18-08-00752, № 19-08-00299.

### Microbiological quality of grain cultivated in the North Caucasus region

Gagkaeva T.Yu.<sup>1</sup>, Gavrilova O.P.<sup>1</sup>, Orina A.S.<sup>1</sup>, Burkin A.A.<sup>2</sup>, Khusaynov Kh.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Institute of Plant Protection (VIZR), St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup>All-Russian Research Institute for Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology, Moscow, Russia; <sup>3</sup>Chechen Research Institute of Agriculture, Grozny, Gikalo village, Russia  
E-mail: t.gagkaeva@mail.ru

**Key message.** The wheat and barley grain harvested in North Caucasus in 2019 were mostly infected by *Alternaria* (to 93%) and *Fusarium* (to 14%) fungi. The risk of contamination of grain with mycotoxins was shown.

**Keywords:** fungi, *Alternaria*, *Fusarium*, DNA, mycotoxins

Widespread groups of *Alternaria* and *Fusarium* fungi contaminate grain and other crops. *Alternaria* fungi are usually not causing apparent harm to host, but some *Alternaria* species can produce mycotoxins, among which alternariol (AOH) is widely present in agricultural products. The most important mycotoxins in cereals are deoxynivalenol (DON), T-2 toxin and zearalenone (ZEA) produced by *Fusarium* fungi. The mycotoxin production of fungi depends on climatic and geographical factors. The influence of natural environmental conditions in some areas of North Caucasus region on the fungal infection and contamination with mycotoxins of cereals is poorly studied.

The aim of study was to evaluate the microbiological quality and to examine amounts of the mycotoxins in grain grown in the North Caucasus region.

Total twenty wheat and three barley grain samples harvested in 2019 were analyzed. They were originated from Chechen Republic (n=19), Republic of Ingushetia (n=3) and Republic of Dagestan (n=1). This territory is characterized by diverse ecosystems and, according to this, 8 samples in the dry steppe, 5 in the steppe, 8 in the forest steppe and two in the mountain forest were cultivated.

The percentage of infected grains was evaluated by mycological method. The DNA content of the group of *Fusarium* species producing trichothecene mycotoxins (Tri-*Fusarium*) and the DNA content of the *Alternaria* section *Alternaria* fungi was determined using quantitative PCR. The amount of mycotoxins in the grain were analysed by the certified test-systems for the ELISA according to the protocol of manufacturer (VNIIVSGE, Russia).

*Alternaria* and *Fusarium* fungi were the most abundant genera in the mycobiota associated with grain. The infection grain by *Alternaria* species varied in the range of 55–93%. The proportion of the species section *Alternaria* (94%) prevailed over section *Infectoriae* (6%). The maximum *Fusarium* infection of the grain reached to 14% in wheat from the dry steppe zone. Arid conditions of the growing season 2019 resulted in lower infection with *F. graminearum*, which is typical pathogen in the North Caucasus region. This species was identified in 30% of samples with a range of infection of 1–6%. The main importance of observation of the study was identification of *F. langsethiae*, which is strong producer of T-2 toxin, in 13% of grain samples grown in the Chechen Republic, where this species was not previously described. The other producer of this mycotoxin – *F. sporotrichioides* was revealed in 22% samples.

DNA of *Alternaria* fungi was detected in all grain samples in the range of  $4.3 \times 10^{-3}$ – $7.5 \times 10^{-2}$ % of the total DNA without any differences in the amounts between the ecosystems. DNA of Tri-*Fusarium* fungi were detected in 7 samples, the amounts of fungal biomass ranged from  $3.1 \times 10^{-3}$  to  $2.9 \times 10^{-2}$ % of the total DNA.

Mycotoxin AOH was detected in 65% of samples in the amounts of 11–675 ppb. Among the analysed samples only the grain originated from the steppe and dry steppe zones was free from AOH. DON was detected in one wheat grain sample from the forest-steppe in the amount of 40 ppb. ZEN was found in three wheat samples from the steppe and forest-steppe zones, in amounts 10–40 ppb. The occurrence of T-2 toxin was revealed in 26% of the samples. The contamination by this mycotoxin varied from 7 to 650 ppb. The maximum of T-2 toxin was detected in barley grain from the dry steppe zone, and it exceeded the permitted level for this mycotoxin in Russia in 6.5 times.

Positive correlations of the percentage of infected grains with *Alternaria* fungi with the amount of DNA of *Alternaria* section *Alternaria* ( $r=0.47$ ,  $p<0.05$ ) as well as with content of AOH ( $r=0.46$ ,  $p<0.05$ ) were established. Also, the positive correlation between the amount of Tri-*Fusarium* DNA and both DON and ZEN amounts ( $r=0.88$  and  $r=0.79$ ,  $p<0.05$ ) was revealed. Moreover, the positive correlation between the amounts of these two mycotoxins and the infection of grain with *F. graminearum* that producer of DON and ZEN ( $r=0.64$  and  $r=0.56$ ,  $p<0.05$ ) was found. A relationship between occurrence of *Fusarium* species producing T-2 toxin and amounts of this mycotoxin in grain was not detected.

This study has shown that even in a dry growing season there is a risk that grain may become contaminated with mycotoxins, in particular toxins of *Alternaria* and *Fusarium* species, which do not require high humidity. At the same time, the presence of pathogenic *F. graminearum* in the grain suggests, that in growing seasons with sufficient moisture, a contamination of grain by DON and ZEN can be significantly above the maximum permitted levels of these mycotoxins.

The study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 19-76-30005).

### SSR analysis of pea (*Pisum sativum* L.) cultivars and lines

Gainullina K.P.

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia; Bashkir Research Institute of Agriculture – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia  
E-mail: karina28021985@yandex.ru

**Key message.** The analysis of molecular genetic diversity of pea cultivars by microsatellites was conducted. A high level of polymorphism of SSR loci which allows using them for identification of the studied cultivars and lines was revealed

**Keywords:** pea, cultivar, microsatellite markers, genetic polymorphism

The study of genetic polymorphism of cultivars and lines of pea (*Pisum sativum* L.) from the world VIR genetic resources gene bank is an important task of modern science and the basis for the preservation of the gene pool of this valuable high-protein agricultural crop. Microsatellite markers that are characterized by high level of polymorphism, wide genomic distribution, and co-dominant inheritance have been used successfully to study genetic diversity. So, the aim of research was to study of molecular genetic polymorphism of microsatellite loci of pea in conditions of the pre-Ural steppe of the Republic of Bashkortostan. Molecular genetic study of 40 pea cultivar samples of different ecological and geographical origin was carried out by using PCR with 7 microsatellite markers, obtained from the genomic library of microsatellites (AgroGene®, France). Pea seeds were sprouted in Petri dishes. DNA was isolated from 5-7 days-old seedlings using the kit «Genomic DNA Purification Kit» («Thermo Fisher Scientific», Lithuania). Amplification products were separated in 10% polyacrylamide gel. All microsatellites used in the work gave good electrophoretic profiles. It was amplified a number of alleles per locus varying from 2 (AB53) to 9 (AD355). Total number of alleles was 36 and an average number of alleles per locus was 5.1. The polymorphism information content (PIC) varied from 0.43 for locus AA255 to 0.82 for locus AA355, with an average value of 0.63. The set of SSR-markers used in the work allowed separating each of studied pea genotypes. Genetic distances computed have been used to draw dendrogram showing the distribution of genotypes according to their genetic relationship. The genotypes combined in common clusters shared similar origin, morphological and economically valuable traits. In general, the obtained results suggest that microsatellite markers are an effective tool for identification of genotypes and assessment of genetic diversity in pea.

### SSR-анализ сортов и линий гороха посевного (*Pisum sativum* L.)

Гайнуллина К.П.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия; Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

**Аннотация.** Проведен анализ молекулярно-генетического разнообразия сортообразцов гороха по микросателлитам. Выявлен высокий уровень полиморфизма SSR-локусов, позволяющий использовать их для идентификации изученных сортов и линий.

**Ключевые слова:** горох, сорт, микросателлитные маркеры, генетический полиморфизм

Изучение генетического полиморфизма сортов и линий гороха посевного (*Pisum sativum* L.) из мировой коллекции генетических ресурсов ВИР является важной задачей современной науки и лежит в основе сохранения генофонда этой ценной высокобелковой сельскохозяйственной культуры. Для изучения генетического разнообразия с успехом применяются микросателлитные маркеры, отличающиеся высоким уровнем полиморфизма, широким распространением в геномах и кодоминантным типом наследования. Целью работы было изучение молекулярно-генетического полиморфизма микросателлитных локусов коллекционного материала гороха посевного в условиях Предуральской степной зоны Республики Башкортостан. Молекулярно-генетический анализ 40 сортообразцов гороха посевного различного эколого-географического происхождения проводили методом ПЦР с использованием 7 микросателлитных маркеров из геномной библиотеки микросателлитов (AgroGene®, Франция). Семена гороха проращивали на чашках Петри. ДНК выделяли из 5-7 дневных проростков с помощью набора «Genomic DNA Purification Kit» («Thermo Fisher Scientific», Литва). Продукты амплификации разделяли в 10% полиакриламидном геле. Все использованные в работе микросателлиты давали четкие электрофоретические профили. Число амплифицированных аллелей на локус варьировало от 2 (AB53) до 9 (AD355). В общей сложности было выявлено 36 аллелей, в среднем 5,1 аллелей на локус. Индекс полиморфизма варьировал от 0,43 для локуса AA255 до 0,82 для локуса AA355, в среднем составляя 0,63. Совокупность использованных в работе SSR-маркеров позволила однозначно идентифицировать каждый из изученных генотипов гороха. Вычисленные генетические расстояния были использованы для составления дендрограммы, демонстрирующей распределение генотипов в соответствии с их генетической близостью. Генотипы, объединенные в общие кластеры, были схожи по происхождению и некоторым морфологическим и хозяйственно-ценным признакам. В целом полученные результаты свидетельствуют о том, что микросателлитные маркеры являются эффективным инструментом для идентификации генотипов и оценки генетического разнообразия гороха посевного.

## Application of biotechnology methods for mass propagation of garden plants

Galdina T.E.

Voronezh State Forestry University named after G.F. Morozov ", Voronezh, Russia

E-mail: tatyana\_galdina@mail.ru

**Key message.** The use of biotechnological methods for the rapid propagation of plants is currently acquiring the greatest importance in gardening. The article presents the results of micro propagation of roses.

**Keywords:** groundcover roses, micropropagation, in vitro, survival rate, adaptation

In modern conditions of the steadily increasing anthropogenic load on the natural environment and abrupt climate changes, it becomes urgent to develop new approaches to solving the problems of obtaining high-quality planting material for landscaping urban areas.

The purpose of our work was to study the features of the use of micro propagation for the multiplying of The Pilgrim, Comtesse Du Barry, Ashram, Cherry Brandy, Wedding Piano roses, which are popular in gardening.

The material for micropropagation was provided by OOO Gagarinsky Selection and Production Center. In the course of the work done, 534 explants of five groups of roses were planted on nutrient media.

During the work, an active release of phenolic compounds was observed, which inhibit the growth and development of the plant. With regard to infection, only slightly more than half of the introduced explants isolated internal infection on nutrient medium during the first days of cultivation. Greater infection manifested itself at the stage of kidney development.

Cultivation on solid nutrient medium with an antibiotic for 3 days gave a small positive result. In 25% of these explants, the infection disappeared. True, there was a change in the color of the medium from pink to brick color.

The onset of kidney development was observed on days 5–7 of explants cultivation. At this stage, a technology has been developed that made it possible to reduce the likelihood of yellowing of leaves and their litter.

To maintain and multiply roses, as well as for root formation in a test-tube culture, the optimal composition of the medium was experimentally determined, which gave the best result. At the adaptation stage, humus and vermiculite were the most important components of the soil mixture. The high content of phosphorus and potassium in the soil has a beneficial effect on increasing the adaptive ability of microplants.

As a result of the experimental work with roses, it was found that the success of micropropagation depends on a number of factors, the observance of which makes it possible to achieve mass replication of widely used varieties. However, the use of micropropagation methods in nurseries requires high-quality specialists, which will make it possible to widely apply biotechnology methods in nurseries.

## Применение методов биотехнологии для массового размножения декоративных растений

Галдина Т.Е.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова», Воронеж, Россия

**Аннотация.** Применение методов биотехнологии для массового размножения растений в настоящее время приобретает наибольшее значение в декоративном растениеводстве. В статье приведены результаты микроклонального размножения роз.

**Ключевые слова:** почвопокровные розы, микроклонирование, in vitro, приживаемость, адаптация

В современных условиях неуклонно возрастающей антропогенной нагрузки на природную среду и резких изменений климата становится актуальной разработка новых подходов к решению проблем получения высококачественного посадочного материала для озеленения урбанизированных территорий.

Целью нашей работы явилось изучение особенности применения микроклонального размножения для размножения популярных в декоративном садоводстве роз The Pilgrim, Comtesse Du Barry, Ashram, Cherry Brandy, Wedding Piano.

Материал для микроклонального размножения был предоставлен ООО «Селекционно-производственный центр Гагаринский». В ходе проделанной работы на питательные среды было посажено 534 экспланта пяти групп роз.

На протяжении хода работы наблюдало активное выделение фенольных соединений, тормозящих рост и развитие растения. Что касается инфицированности, то только чуть больше половины введенных эксплантов выделяли внутреннюю инфекцию в среду в первые дни культивирования. Большая инфицированность проявилась на стадии развития почки.

Культивирование на твердой питательной среде с антибиотиком в течение 3-х суток дало небольшой положительный результат. У 25% таких эксплантов инфекция исчезла. Правда, наблюдалось изменение цвета среды от розовых оттенков до кирпичного цвета.

Начало развития почек наблюдали на 5–7 день культивирования эксплантов. На этом этапе отработана технология, позволившая снизить вероятность пожелтения листьев и их опад.

Для поддержания и мультипликации роз, а также для корнеобразования в пробирочной культуре экспериментальным путем определили оптимальный состав среды, который дал наилучший результат. На стадии адаптации наиболее важным компонентом почвенной смеси послужил перегной и вермикулита. Высокое содержание фосфора и калия в почвегрунте благоприятно сказывается на повышении адаптационных способностей микрорастений.

В результате проведенной экспериментальной работы с розами было установлено, что успех микроклонального размножения зависит ряда факторов, соблюдение которых позволяет добиться массового тиражирования широко используемых сортов. Однако, применение методов микроклонального размножения в питомниках, требует высококачественных специалистов, что позволит широко применять методы биотехнологии в декоративных питомниках.

1. Toth K., Naapala T., Hohtola A. Alleviation of browning in oak explants by chemical pretreatments // *Biologia Plantarum*. – 1994.- Vol. 36, № 4.- P. 511-517.

2. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений: Учебник. – Изд. 2-е. СПб.: Изд-во С.-Петербург. Ун-та, 2010. – 240 с.

3. Поздняков И.А. Особенности микроклонального размножения шиповника и декоративных сортов рода *Rosa* L.: диссертация ... кандидата сельскохозяйственных наук: Москва, 2007. 220 с.



**Influence of chicken manure derived biochar on soil quality and wheat and barley growth**

Galieva G.Sh., Galitskaya P.Yu., Selivanovskaya S.Yu., Kuryntseva P.A.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

E-mail: goolnaz@rambler.ru

**Key message.** Effects of two types of biochar made of chicken manure (at 300 and 700 peak temperatures) on soil biogenic elements content, microbial characteristics as well as barley and wheat growth were investigated.

**Keywords:** biochar, crops, microbial community of soils, respiration activity, Biolog EcoPlate

Biochar which is a product of biomass possesses a range of unique properties such as buffering potential, high porosity and low decomposition rate which is important for carbon sequestration. Since biochar prepared from chicken manure additionally contains high amounts of N, P and K, it may stimulate plant growth and soil microflora, however little is known about this type of biochar and about pyrolysis regime influence on it. In the present study, effect of biochar prepared from chicken manure in the process of slow pyrolysis at two peak temperatures (3000C (B300) and 7000C (B700)) on the two crops (wheat and barley) was investigated in a greenhouse experiment during 28 days. It was revealed, that both biochars' addition in a dose of 1% led to increase of the N, P, K contents in the soils: 1,3, 11,5, 1,6 and 1,4, 7, 1,8 fold for B300 and B700, correspondingly. Despite on the higher biogenic elements content, plants biomass with addition of B300 variant was lower than that with addition of B700: 84% and 110% from control for wheat and 210% and 250% from control for barley, correspondingly. This is may be due to toxic compounds content in the B300 that were decomposed by higher temperatures. Bacterial 16S rRNA gene copy numbers on the 28th day of the experiment were estimated to be 1.68-3.09 10<sup>6</sup> g<sup>-1</sup> soil and did not depend on the plant species or biochar addition. For fungal ITS gene copy number, significant difference was revealed for B700 biochar and barley (~10 fold increase). Metabolic activity (as revealed by Biolog Ecoplate) as well as respiration and enzyme activity of microbial community was statistically equal in all the samples at the end of the experiment, however, significantly differed from control in its duration for B300 variant, especially for wheat.

**Влияние различного биочара из куриного помета на качество почв и рост яровой пшеницы и ячменя**

Галиева Г.Ш., Галицкая П.А., Селивановская С.Ю., Курынцева П.А.

Казанский федеральный университет, Казань, Россия

**Аннотация.** Исследование определило большее влияние биочара на биомассу ячменя и на почвенные ферментативные активности, а вид выращиваемой культуры на почвенную респираторную активность и степень утилизации углеродных субстратов.

**Ключевые слова:** биочар, культуры, почвенные микробные сообщества, респираторная активность, Biolog EcoPlate

Биочар является продуктом пиролиза биомассы, обладающего рядом уникальных свойств, таких как высокая пористость, высокий буферный потенциал, а также низкая скорость разложения, обеспечивающая секвестрацию углерода. Кроме указанных свойств, биочар полученный из куриного помета, обладает значительным количеством биогенных элементов - N, P и K, что может стимулировать рост растений и микробиоту при его внесении в почву. Однако данный тип биочара и влияние режима пиролиза на его свойства недостаточно изучены. В данной работе исследовано влияние биочара из куриного помета, полученного в процессе медленного пиролиза при двух пиковых температурах (300<sup>o</sup>C (B300) и 700<sup>o</sup>C (B700)), на качество почвы, микробные сообщества и рост двух злаковых культур (яровая пшеница и ячмень) в тепличном эксперименте в течение 28 дней. В динамике оценено содержание биогенных элементов, численность бактерий и микромицетов, метаболическая активность почвенного микробного сообщества методом Biolog EcoPlate, почвенная респираторная активность, активности почвенных ферментатов с использованием флуорогенных субстратов, численность почвенных бактерий и грибов, методом 16S rRNA и морфометрические данные растений. Показано, что внесение биочара в почву в дозе 1% привело к увеличению содержания N, P, K в почве: в 1,3, 16,5, 1,7 и 1,3, 7, 1,7 раз для B300 и B700, соответственно. Несмотря на более низкое содержание биогенных элементов, биочар B700 оказал большее стимулирующее действие на рост растений: биомасса ячменя составила 250% от контроля по сравнению с 210% для варианта B300, а пшеницы – 110% по сравнению с 84%. Это может быть связано с содержанием токсичных соединений в B300, которые разлагались при более высоких температурах. Показано отсутствие зависимости численности бактерий от вида обработки и культуры (значения определены на уровне 1,68-3,09 копий генов\*г<sup>-1</sup> почвы). Численность грибов значительно отличалась для биочара B700 и ячменя (увеличение примерно в 10 раз). Метаболическая активность, респираторная и ферментативная активности микробного сообщества почв под обеими культурами, обработанных обоими вариантами биочара, были сопоставимы с таковыми в контроле в конце эксперимента, однако в его течение отличались от контроля, особенно в варианте B300 под пшеницей.

### SNP analysis of common wheat baking qualities

Galimova A.A., Zaikina E.A., Kuluev B.R.

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,  
Ufa, Russia

E-mail: aiz.galimova@yandex.ru

**Key message.** The allelic states of waxy genes in genomes A, B and D were studied by genome-specific primers in cultivars and lines of common wheat of the pre-Ural steppe. The studied cultivars and lines revealed differences in genotypes for genome A.

**Keywords:** *Triticum aestivum*, baking quality, SNP markers, functional markers, waxy genes

Most of the common wheat harvest, one of the main food crops, is represented by grains 3, 4 and 5 quality classes, which in most cases are not suitable for the use in the food industry due to the very low baking qualities of the obtained flour. It is known that a high content of amylose in endosperm starch makes a significant contribution to the formation of high baking qualities of common wheat grains. The aim of our work was to study the allelic state of waxy genes encoding granule-bound starch synthase, a key enzyme in the synthesis of endosperm amylose, in common wheat varieties of the pre-Ural steppe. In the work we used winter and spring cultivars and lines of common wheat, bred and/or being in breeding work at the Chishminsky breeding center of BRIA UFRC RAS. Plant DNA was isolated by salt extraction method. Allelic states of waxy genes were studied by PCR analysis using Wx-7A-F1/R1a, Wx-4A-F2/R2, Wx-7D-F3/R3a primers. Amplification results were detected by horizontal electrophoresis in 1% agarose gel. The allohexaploid nature of common wheat causes the presence of three isoforms of the Waxy protein (Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1), which are encoded by the homeologous genes *wx-A1*, *wx-B1*, *wx-D1*. These genes have functionally significant alleles encoding active Wx proteins and null alleles that block Wx protein synthesis. The starch of waxy mutant wheat, which has null alleles for all three waxy genes, lacks amylose (it consists entirely of amylopectin), which leads to low baking qualities. We selected genome-specific primers to identify the functional alleles and null alleles of the waxy gene for each of the genomes A, B, and D. Each of the waxy genes has several alleles; the allele encoding the synthesis of the full-sized functional Waxy protein is commonly defined as the allele *a*; the null allele, in which there is no synthesis of the Waxy functional protein, is defined as the *b* allele. According to preliminary data, the tested cultivars and lines of common wheat carry alleles *a* in B and D genomes, which determine the production of the functional Waxy protein. For genome A, it was found that 40.6% of the studied cultivars and lines carry the allele *a*, and the remaining cultivars carry the null allele *b*.

### SNP-анализ хлебопекарных качеств мягкой пшеницы

Галимова А.А., Заикина Е.А., Кулуев Б.Р.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

**Аннотация.** Исследованы аллельные состояния генов *waxy* в субгеномах A, B и D геном-специфичными праймерами у сортов и линий мягкой пшеницы Предуральской степной зоны. У исследуемых сортов и линий выявлены различия генотипов по субгеному A.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum*, хлебопекарные качества, SNP-маркеры, функциональные маркеры, *waxy*-гены

Большая часть урожая мягкой пшеницы – одной из основных продовольственных культур, представлена зерном 3, 4 и 5 классов качества, которые в большинстве своем не пригодны для использования в пищевой промышленности из-за очень низких хлебопекарных качеств получаемой муки. Известно, что значительный вклад в формирование хороших хлебопекарных качеств зерна мягкой пшеницы вносит высокое содержание амилозы в составе крахмала эндосперма. Целью нашей работы стало исследование аллельного состояния генов *waxy*, кодирующих грануло-связанную крахмальную синтазу – ключевого фермента синтеза амилозы эндосперма, у сортов мягкой пшеницы Предуральской степной зоны. В работе использовали озимые и яровые сорта и линии мягкой пшеницы, выведенных и/или находящихся в селекционной работе в Чишминском селекционном центре БНИИСХ УФИЦ РАН. Растительную ДНК выделяли методом солевой экстракции. Исследования аллельных состояний генов *waxy* проведены посредством ПЦР-анализа с использованием праймеров Wx-7A-F1/R1a, Wx-4A-F2/R2, Wx-7D-F3/R3a. Результаты амплификации выявляли горизонтальным электрофорезом в 1% агарозном геле. Аллогексаплоидная природа мягкой пшеницы обуславливает наличие трех изоформ Waxy белка (Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1), которые кодируются гомеологичными генами *wx-A1*, *wx-B1*, *wx-D1*. Данные гены имеют функционально значимые аллели, кодирующие активные Wx-белки, и нуль-аллели, блокирующие синтез Wx-белка. В составе крахмала *waxy*-мутантных пшениц, имеющих нуль-аллели по всем трем *waxy*-генам, отсутствует амилоза (он полностью состоит из амилопектина), что и обуславливает низкие хлебопекарные качества. Нами подобраны геном-специфичные праймеры для идентификации функциональных аллелей и нуль-аллелей гена *waxy* для каждого из субгеномов A, B и D. Каждый из генов *waxy* имеет несколько аллелей, принято, что аллель, кодирующий синтез полноразмерного функционального белка Waxy, обозначается как аллель *a*; нуль-аллель, при котором синтез функционального белка Waxy отсутствует, обозначают как аллель *b*. По нашим предварительным данным, исследуемые сортообразцы мягкой пшеницы по субгеномам B и D несут аллели *a*, обуславливающие наработку функционального белка Waxy. Для субгенома A было выявлено, что 40,6% исследуемых сортов и линий несут аллель *a*, а остальные сорта несут нуль-аллель *b*.

**The formation of productivity and stress resistance of leguminous plants in association with endophytic bacteria, which complemented the deficient properties of plant-host genotype**

Garipova S.R.<sup>1,4</sup>, Markova O.V.<sup>1</sup>, Irgalina R.Sh.<sup>2</sup>, Garifullina D.V.<sup>2</sup>, Khairullin R.M.<sup>3</sup>, Lastochkina O.V.<sup>3,4</sup>, Pusenkova L.I.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bashkir State University, Ufa, Russia; <sup>2</sup>Bashkir State Agricultural University, Ufa, Russia; <sup>3</sup>Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia; <sup>4</sup>Bashkir Research Institute of Agriculture – Subdivision of Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: garipovasvetlana@gmail.com

**Key message.** The strong and weak properties of peas and beans cultivars were identified in field experiments. The best productivity of inoculated plants was due to the resistance to biotic and abiotic stress induced by endophytic bacteria.

**Keywords:** cultivar-specific combinations, resistance to root rots and leaf diseases, plant architecture improvement, symbiotic activity

Endophytic bacteria are the normal microbiome of a health plant, affecting its physiological status. Plant growth promoting and exhibiting antagonistic activity to phytopathogens nonrhizobial endophytic bacteria of root nodules are of particular interest (Garipova et al., 2017a), since they are assumed to coexist in neutral relations with rhizobia (Garipova et al., 2017b), can take part in biocontrol reactions to prevent the plant from diseases and maintain its symbiotic activity. However, it is reported that inoculation of plants with useful strains of endophytic bacteria may have not significant effect on plant productivity in the field (Lally et al., 2017).

The purpose of the work was the investigation of the influence of inoculation of peas and beans cultivars with selected strains of endophytic bacteria on plant productivity in contrast agroclimatic conditions of South Urals.

Research methods included the production crops and small-scale field experiments of 2003–2018. The plant growth characteristics, nodule-forming activity, root rots and leaf diseases, crop structure elements were tested.

Results. In field experiment the limiting properties of each studied pea and bean cultivars were identified. The pea cultivar Chishminsky 95 had a high symbiotic activity, but was susceptible to root rot and characterized by moderate degree of drought tolerance. Bean cultivar Ufimskaya was rather-ripe, resistant to drought and to diseases. Bean cultivar Zolotistaya was adaptive to drought, but later ripens and was susceptible to diseases. Bean cultivar Elsa belonged to the intensive type cultivar: it formed a high yield under favorable environmental conditions but low yield under drought, it was resistant to leaf lesions, but susceptible to root rot.

Seed inoculation of pea cultivar Chishminsky 95 with a combination of selected strains *Serratia* sp. Ent16 + *R. leguminosarum* Rh16 resulted in increase averaged 16% over three years compared to uninoculated control. This was accompanied by decrease in the incidence of root rot from moderate degree to low degree and maintaining high symbiotic activity. The positive effect of this combination on pea seed yield was established in production crops – the yield increase was 13 % in compare of uninoculated control. In response to the inoculation of bean plants with the best selected strains of endophytic bacteria, the different cultivars showed an individual strategy for improving productivity. Inoculated plants of Ufimskaya cultivar increased the yield of inoculated plants in compare of control due to the improvement of size and branching of the roots and enlarged biomass. Inoculated plants of Zolotistaya cultivar accelerated the ripening. The inoculated Elsa plants characterized by the intensified branching of shoots and increased the number of seeds per plant. The best couples of symbionts for beans were: Ufimskaya cultivar – *R. leguminosarum* SG13 strain, Zolotistaya cultivar – *B. subtilis* SG12 + *R. leguminosarum* SG13 strains, Elsa cultivar – *R. leguminosarum* 2630 (model strain). Analysis of statistically insignificant and ineffective inoculation results showed that such cases have occurred if bacteria were used: a) in favorable environmental conditions, b) with an adaptive to limited conditions plant genotype, c) when the biological was applied in supra-optimal doses. The optimal doses of bacteria were different in interaction with specific plant genotype.

Conclusion: Endophytic bacteria exert a multidirectional effect on the growth and development of plants, supplementing those properties that increase its resistance to diseases and adaptation to environmental conditions. An individual selection of endophytic bacteria strains is required for specific plant cultivars.

1. Garipova S.R., Markova O.V., Garifullina D.V., Ivanchina N.V., Khairullin R.M. Regional collection of bacterial endophytes of bean plants as a basis for the creation of biological products // *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo centra RUN*. 2017. No 3-1. P. 56-58.
2. Garipova S.R., Garifullina S.R., Baimiev A.Kh., Khairullin R.M. Intermicrobial relationships of pea nodule symbiont *Serratia* sp. Ent16 and its colonization of the host endorhizosphere // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2017. V. 53. No 3. P. 338-345.
3. Lally R.D., Galbally P., Moreira A.S., Spink J., Ryan D., Germaine K.J., Doeling D.N. Application of endophytic *Pseudomonas fluorescens* and a bacterial consortium to *Brassica napus* can increase plant height and biomass under greenhouse and field conditions // *Front. Plant Sci.* 2017. 8. P. 2193.

### Application of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* in compositions with salicylic acid to improve wheat stress tolerance

Garshina D.<sup>1,2</sup>, Ibragimov A.<sup>3</sup>, Lastochkina O.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia; <sup>2</sup>Bashkir Research Institute of Agriculture - Subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia; <sup>3</sup>Bashkir State University, Ufa, Russia

E-mail: dariya.greatfire@mail.ru

**Key message.** Maximum growth-stimulating and protective effect of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* 10-4 on wheat plants under normal and drought stress conditions reached when its applied in composition with salicylic acid were discovered.

**Keywords:** drought stress, tolerance, wheat, endophytic bacterium *Bacillus subtilis* 10-4, salicylic acid

Wheat is a valuable food crop with great importance in ensuring food security worldwide. by Crop losses (up to 50-82%) from biotic and abiotic stresses are a serious danger. Beneficial endophytic bacteria *Bacillus subtilis* are considered as biotic strategy for plant protection. Of interest is the use of *B. subtilis* in composition with other natural growth regulators. The purpose of this work was to study the effect of endophytic *B. subtilis* 10-4 in composition with signal molecule salicylic acid (SA) on growth processes, oxidative and osmotic status of wheat under normal drought stress conditions. The experiments were conducted on *Triticum aestivum* L. seedlings (cultivar Omskaya-35) during the first two weeks of ontogenesis. Before sowing, the seeds were treated (1 hour) in a suspension of *B. subtilis* 10-4 (10<sup>5</sup> CFU/ml), SA (0.05 mM), *B. subtilis*+SA or water (control) and germinated at 20-22 °C (16-hour day light). 3 days old seedlings were transplanted into 12% PEG-6000 (test) or water (control), and in different time intervals growth and biochemical parameters were evaluated. It was revealed that treatment with *B. subtilis* 10-4, SA and *B. subtilis* 10-4+SA under normal growth conditions increased the length of the roots and shoots (up to 15-25%) with maximum effect when used strain 10-4+SA. Drought stress significantly inhibited the growth of roots, shoots and the accumulation of fresh and dry biomass. Treatment with *B. subtilis* 10-4, SA and *B. subtilis* 10-4+SA reduced (to varying degrees) the negative impact of drought on the same growth parameters with the maximum positive effect (reduction to 50%) when *B. subtilis* 10-4 was used in composition with SA. It was revealed that treatment with *B. subtilis* 10-4, SA, and especially *B. subtilis* 10-4+SA reduced drought-induced accumulation of malondialdehyde (MDA) and proline, which indicates the induction of protective reactions in plants. The findings indicate on perspectives of application of *B. subtilis* 10-4 in composition with SA for improving growth and induction of protective reactions under drought. This work was supported by the grant of the President of the Russian Federation (№ МК 643.2019.11).

### Эффективность применения эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* в композиции с салициловой кислотой для повышения стрессоустойчивости растений пшеницы

Гаршина Д.Ю.<sup>1,2</sup>, Ибрагимов А.Э.<sup>1,3</sup>, Ласточкина О.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия; <sup>2</sup>Башкирский научно-исследовательский институт УФИЦ РАН, Уфа, Россия; <sup>3</sup>Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

**Аннотация.** Выявлено, что максимальный рост-стимулирующий и защитный эффект эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* 10-4 на растения пшеницы в норме и при дефиците влаги проявляется при их совместном применении с салициловой кислотой.

**Ключевые слова:** дефицит влаги, устойчивость, пшеница, эндофитный штамм *Bacillus subtilis* 10-4, салициловая кислота

Пшеница – ценная продовольственная культура, имеющая большое значение в обеспечении продовольственной безопасности в мире. Серьезную опасность представляют потери урожая (до 50-82%) от биотических и абиотических стрессов. Полезные эндофитные бактерии *Bacillus subtilis* рассматриваются как биотическая стратегия защиты растений. Интерес вызывает применение *B. subtilis* в композиции с другими природными регуляторами роста. Цель данной работы заключалась в изучении влияния эндофитной бактерии *B. subtilis* 10-4 в композиции с сигнальной молекулой салициловой кислотой (СК) на ростовые процессы, окислительный и осмотический статус пшеницы в норме и при дефиците влаги. Исследования проводились на проростках *Triticum aestivum* L. сорта Омская-35 в течение первых двух недель онтогенеза. Семена перед посевом замачивали (1 час) в суспензии *B. subtilis* 10-4 (10<sup>5</sup> КОЕ/мл), СК (0,05 мМ), *B. subtilis*+СК или воде (контроль) и проращивали при 20-22 °C (16-часовой световой день). 3-сут проростки пересаживали в стаканы с 12%ПЭГ-6000 (опыт) или воду (контроль) и через разные промежутки времени оценивали рост и биохимические показатели устойчивости. Выявлено, что обработка *B. subtilis* 10-4, СК и *B. subtilis* 10-4+СК в норме увеличивала длину корней и побегов (до 15-25%) с максимальным эффектом при совместном применении штамма 10-4 с СК. Воздействие дефицита влаги значительно тормозило рост корней, побегов и накопление сырой и сухой биомассы. Обработка *B. subtilis* 10-4, СК и *B. subtilis* 10-4+СК снижала (в разной степени) уровень негативного влияния засухи на эти же показатели роста, с максимальным положительным эффектом (снижение до 50%) при применении *B. subtilis* 10-4+СК. Выявлено, что обработка *B. subtilis* 10-4, СК и особенно *B. subtilis* 10-4+СК снижала вызываемое засухой увеличение малонового диальдегида (МДА) и пролина, что указывает на индукцию у растений защитных реакций. Совокупность полученных данных свидетельствует в пользу перспективности применения *B. subtilis* 10-4 в композиции с СК в индукции роста и защите растений пшеницы от дефицита влаги.

Работа поддержана грантом Президента РФ (№ МК-643.2019.11).

### Diversity and activity of cultivated lipophilic bacteria from fat-containing industrial wastes

Gerashimchuk A.L.<sup>1,2</sup>, Bukhtiyarova P.A.<sup>1</sup>, Antsiferov D.V.<sup>1</sup>, Ivashenko D.A.<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>TomBioTech LLC, Tomsk, Russia; <sup>2</sup>Tomsk State University, Tomsk, Russia  
E-mail: gerashimchuk\_ann@mail.ru

**Key message.** Pure cultures of lipophilic microorganisms of different phylogenetic groups were isolated from fat-containing industrial wastewaters. The strains of the genera *Pseudomonas* and *Bacillus* were the most active lipolytic microorganisms.

**Keywords:** lipophilic microorganisms, lipolytic enzymes, wastewater of food industry, fats utilization

Fat-containing wastes are accumulated in large quantities in sewage treatment plants as a result of industrial food production and represent a serious environmental problem. Microorganisms that decompose various types of fats may be potential candidates for development of biological products for destruction of this type of wastes.

The aim of the study was to obtain pure cultures of lipophilic bacteria from fat-containing wastes, to study their diversity and activity for the development of a novel biological product.

Pure cultures were isolated using a mineral nutrient medium with either vegetable oil or pork fat as a carbon source. The lipolytic properties of the strains were evaluated by the growth results in the Stern glycerol-fuchsin broth. Phylogenetic analysis was performed by PCR amplification followed by sequencing of 16S rRNA gene fragments with oligonucleotide primers 27F and 1492R. Lipolytic activity was determined by the Ota-Yamada method. The quantitative composition of fatty acids was determined by gas chromatography with flame ionization detection.

Pure bacterial cultures (31 strains) with proposed lipolytic properties were isolated from wastewater samples derived from the milk factory storage pond and the grease trap of the meat processing plant. Phylogenetic analysis allowed to identify and exclude potentially pathogenic strains. Non-pathogenic isolates belonged to *Gammaproteobacteria* (representatives of *Pseudomonas nitroreducens*, *P. synxantha*, *P. extremaustralis* and *P. citronellolis*), *Betaproteobacteria* (*Microvirgula curvata*) and *Firmicutes* (*Bacillus subtilis* and *Brevibacillus brevis*).

The analysis of lipolytic activity showed that all strains were able to utilize vegetable and milk fats as carbon and electron sources. The maximum lipolytic activity of  $40 \mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$  was observed for the strain *Bacillus subtilis* B34. Analysis of the quantitative composition of fatty acids in the culture fluid of the most active strains of *Pseudomonas* A13, B11 and *B. subtilis* B34 was performed. The results of this analysis demonstrated the fact of fats hydrolysis with the formation of free fatty acids. Based on the results obtained in the study, isolated strains are promising for the development of commercial biological product for destruction of fat-containing wastes.

This work was supported by The Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises in Science and Technology, contract No. 2575GS1 / 41327.

### Разнообразие и активность культивируемых липофильных бактерий из жиросодержащих отходов промышленных предприятий

Герасимчук А.Л.<sup>1,2</sup>, Бухтиярова П.А.<sup>1</sup>, Анциферов Д.В.<sup>1</sup>, Ивашенко Д.А.<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>ООО «ТомБиоТех», Томск, Россия; <sup>2</sup>Томский государственный университет, Томск, Россия

**Аннотация.** Из жиросодержащих промышленных сточных вод выделены чистые культуры липофильных микроорганизмов разных филогенетических групп. Наиболее активными липолитиками оказались штаммы родов *Pseudomonas* и *Bacillus*.

**Ключевые слова:** липофильные микроорганизмы, липолитические ферменты, сточные воды пищевых предприятий, утилизация жиров

Образующиеся в результате промышленного производства пищевой продукции жиросодержащие отходы в больших количествах накапливаются в стоках и очистных сооружениях и представляют серьезную экологическую проблему. Микроорганизмы, разлагающие различные типы жиров, могут быть потенциальными кандидатами для создания биопрепаратов-деструкторов.

Цель исследования – получить чистые культуры липофильных бактерий из жиросодержащих отходов, изучить их разнообразие и активность для разработки биопрепарата.

Чистые культуры получали с использованием минеральной питательной среды с растительным маслом или свиным жиром в качестве источника углерода. Липолитические свойства культур оценивали по результатам роста в глицерино-фуксиновом бульоне Штерна. Филогенетический анализ проводили методом ПЦР-амплификации и секвенирования фрагментов генов 16S рНК с праймерами 27F и 1492R. Липолитическую активность определяли по методу Ота-Ямада. Количественный состав жирных кислот определяли методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием.

Из проб сточных вод пруда-накопителя молочного комбината и жируловителя очистных сооружений мясоперерабатывающего комбината выделены чистые культуры бактерий (31 штамм) с липолитическими свойствами. Филогенетический анализ помог выявить и исключить из исследования патогенные штаммы. Остальные культуры относились к классам *Gammaproteobacteria* (представители *Pseudomonas nitroreducens*, *P. synxantha*, *P. extremaustralis* и *P. citronellolis*), *Betaproteobacteria* (*Microvirgula curvata*) и отделу *Firmicutes* (*Bacillus subtilis* и *Brevibacillus brevis*).

Анализ липолитической активности показал, что все штаммы способны утилизировать растительный и молочный жир. Максимальная измеренная липолитическая активность в  $40 \mu\text{моль} \times \text{ч}^{-1} \times \text{мл}^{-1}$  отмечена для штамма *Bacillus subtilis* B34. Анализ количественного состава жирных кислот в культуральной жидкости наиболее активных штаммов *Pseudomonas* A13, B11 и *B. subtilis* B34 продемонстрировал процессы гидролиза жиров с образованием свободных жирных кислот. Исходя из полученных результатов, выделенные штаммы перспективны для разработки биопрепарата-деструктора жиросодержащих отходов.

Работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям, договор № 2575ГС1/41327.

**Auxin and carotene biosynthesis by the bacterium *Pantoea agglomerans***

Gilvanova E.A., Milman P.Yu.

Ufa Institute of biology UFRC RAS, Ufa, Russia

E-mail: gelena@anrb.ru

**Key message.** Monitoring of auxin and carotene during cultivation of the *Pantoea agglomerans* strain IB-BF revealed that the maximum yield of the target products is provided not by population density, but by the qualitative composition of the nutrient medium and the need for a larger peptide component of the substrate (rich amino acid set), which is part of the standard LB medium.

**Keywords:** PGPB bacteria, *Pantoea*, indolyl-3-acetic acid, carotenoids

It is known that associative endo(epi)phytobacteria are potential objects of agrobiotechnology for the development on their basis of biological plant protection products from stresses (osmotic, salt, heavy metal pollution) and phytopathogens. The selection of a nutrient medium and conditions for the cultivation of producers of biologically active substances is a priority step in the process of creating biological products. The task was to determine the maximum level of accumulation of target products by culture *Pantoea agglomerans* IB-BF in the five proposed media options: 1) Luria\_Bertani (LB), NaCl - 10 g/l; 2) LB + L-tryptophan (0.01%), NaCl - 10 g/l; 3) BS: yeast extract - 10 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 2 g/l, NaCl - 10 g/l; 4) K1: starch -10 g/l, peptone - 5 g/l, yeast extract - 5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 2 g/l, NaCl - 10 g/l; 5) potato broth, glucose -10 g/l, NaCl - 10 g/l. IAA production in the culture liquid medium was determined by the method using Salkovsky reagent, carotenoids after extraction from the cell biomass with a methanol: chloroform mixture (2:1) and measurements of the optical density of the supernatant at a wavelength at 461 nm were expressed in accepted units of OD<sub>461</sub>/mg dry biomass. Cell concentration was evaluated by optical density at 600 nm. It was shown that the duration of auxin accumulation for the selected strain was 8 days with a maximum yield of 5-6 days (stationary growth phase), while carotenoids accumulated as much as possible during the period of 4-6 days, depending on the type of medium. The list of culture media, compiled by the degree of reduction of auxin (µg / ml) in CL, is as follows: LB + tryptophan (20.9) > LB (17.9) > K1 (10.2) > BS (6.8) > Potato dextrose (2). Regarding carotene values (in OD<sub>461</sub>/mg dry b/m), a similar set has the following view: LB (0.1723) > Potato dextrose (0.172) > LB + tryptophan (0.113) > BS (0.08) > K1 (0.061). It was found that, when cultured on tryptophan medium (0.01%), the auxin level significantly increases by 17%, which suggests a tryptophan-dependent pathway for the formation of IAA by the *Pantoea agglomerans* strain IB-BF.

**Биосинтез ауксина и каротина бактерией *Pantoea Agglomerans***

Гильванова Е.А., Мильман П.Ю.

Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, Россия

**Аннотация.** Мониторинг ауксина и каротина при культивировании штамма *Pantoea agglomerans* IB-BF выявил, что максимальный выход целевых продуктов обеспечивается не плотностью популяции, а качественным составом питательной среды и потребностью в большей пептидной составляющей субстрата (богатого аминокислотного набора), входящей в состав стандартной среды LB.

**Ключевые слова:** PGPB бактерии, *Pantoea*, индолил-3-уксусная кислота, каротиноиды

Известно, что ассоциативные эндо(эпи)фитные бактерии являются потенциальными объектами агrobiотехнологии для разработки на их основе биологических средств защиты растений от стрессов (осмотического, солевого, загрязнения тяжелыми металлами) и фитопатогенов. Подбор питательной среды и условий для культивирования продуцентов биологически активных веществ является приоритетным этапом в процессе создания биопрепаратов. В работе поставлена задача определения максимального уровня накопления целевых продуктов культурой *Pantoea agglomerans* IB-BF на предложенных пяти вариантах сред: 1) Luria\_Bertani (LB), NaCl – 10 г/л; 2) LB+L-триптофан (0,01%), NaCl – 10 г/л; 3) BS: дрожжевой экстракт – 10 г/л, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 2 г/л, NaCl – 10 г/л; 4) K1: крахмал -10 г/л, пептон – 5 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 2 г/л, NaCl – 10 г/л; 5) картофельный отвар, глюкоза -10 г/л, NaCl – 10 г/л. Продукцию ИУК в культуральной жидкой среде определяли по методике с использованием реактива Сальковского, каротиноиды после экстракции из клеточной биомассы смесью метанол:хлороформ (2:1) и измерения оптической плотности супернатанта при длине волны 461 нм выражали в условных единицах ОП<sub>461</sub>/мг сух. биомассы. Концентрацию клеток оценивали по оптической плотности при 600 нм. Показано, что продолжительность накопления ауксина для выбранного штамма составляла 8 суток с максимальным выходом на 5-6 сутки (стационарная фаза роста), тогда как каротиноиды максимально накапливались в период 4-6 суток в зависимости от типа среды. Ряд вариантов питательных сред, построенный по степени снижения уровня ауксина (мкг/мл) в КЖ выглядит следующим образом: LB+триптофан (20,9) > LB (17,9) > K1 (10,2) > BS (6,8) > Картоф. отвар (2). Для уровня каротина (по ОП<sub>461</sub>/мг сух. б/м) подобный ряд имеет следующий вид: LB (0,172) > Картоф. отвар (0,172) > LB+триптофан (0,113) > BS (0,08) > K1 (0,061). Установлено, что при культивировании на среде с триптофаном (0,01%) достоверно увеличивается уровень ауксина на 17%, что позволяет предполагать триптофан-зависимый путь образования ИУК у штамма *Pantoea agglomerans* IB-BF.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект №18-04-00577 А) в рамках государственного задания Минобрнауки России по теме № АААА-А18-118022190098-9.

### The effect of copper on cadmium-tolerant lawn grass

Gladkov E.A.<sup>1,2</sup>, Gladkova O.N.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia; <sup>3</sup>Moscow State University of Environmental Engineering, Moscow, Russia

E-mail: gladkovu@mail.ru

**Key message.** Cadmium -tolerant plants were more resistant to copper. However, the increase in resilience was not very significant. Therefore, it is more expedient to obtain plants that are resistant to copper.

**Keywords:** copper, cadmium, lawn grasses, *Agrostis stolonifera*

Lawn grasses are highly sensitive to heavy metals. Therefore, increasing resistance to heavy metals is essential in urban greening, ornamental horticulture and in agriculture. *Agrostis stolonifera* L. grass has an advantage over many other lawn grasses because it is capable of vegetative reproduction and permits to create lawn for different purposes only from itself. The lawn from *Agrostis stolonifera* does not need to be cut often, it withstands a shadowing and relatively resistant to gases. Previously, plants of *Agrostis stolonifera* were obtained that are resistant to cadmium using cell selection. However, plants that are resistant to one environmental factor may be cross-resistant to another. Therefore, the aim of this work was to assess the tolerance of the next generation descendants of the regenerant *Agrostis stolonifera*, resistant to cadmium, to one of the most phytotoxic heavy metals - copper. Copper is one of the priority pollutants of ecosystems. Copper enters the soil from various sources - emissions from vehicles, industrial plants, fertilizers, some solutions for spraying various crops, household and municipal waste. The cross-resistance of descendants of the next generation of the regenerant to copper was assessed by the inhibition of shoot growth in aqueous solutions of the toxicant. The degree of resistance of the cadmium -tolerant plants was compared with the original plants. Cadmium -tolerant plants showed more resistance to copper compared to the original plants at all the tested concentrations. However, the increase in resistance was not significant (for example, at a copper concentration of 50 mg/l, the growth of the original plants was 61% of the control, 74% of the control were resistant to cadmium). Thus, plants obtained by cell selection, resistant to cadmium, had a higher resistance to copper, but this resistance is insufficient at a high level of pollution. Therefore, it is more expedient in conditions of a high level of copper pollution to obtain plants that are resistant to this metal.

### Влияние меди на газонные травы, толерантные к кадмию

Гладков Е.А.<sup>1,2</sup>, Гладкова О.Н.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия; <sup>2</sup>Московский физико-технический институт, Москва, Россия; <sup>3</sup>Московский государственный университет инженерной экологии, Москва, Россия

**Аннотация.** Растения, толерантные к кадмию продемонстрировали большую устойчивость к меди. Однако, повышение устойчивости не было очень значительным. Поэтому более целесообразным является получение растений, устойчивых к меди.

**Ключевые слова:** медь, кадмий, газонные травы, *Agrostis stolonifera*

Газонные травы обладают повышенной чувствительностью к тяжелым металлам. Поэтому повышение устойчивости к тяжелым металлам имеет важное значение в городском озеленении, декоративном садоводстве и в сельском хозяйстве. Объект исследования - газонная трава полевица побегоносная (*Agrostis stolonifera* L.). Данное растение имеет ряд преимуществ — вегетативно размножается за короткий срок, отсутствие необходимости частой стрижки, теневыносливость, возможность создания газона разного назначения только из полевицы побегоносной. Газон из полевицы побегоносной относительно газоустойчив. Ранее были получены растения *Agrostis stolonifera*, устойчивые к кадмию с помощью клеточной селекции. Однако, растения, устойчивые к одному экологическому фактору, могут обладать перекрестной устойчивостью к другому. Поэтому целью работы была оценка толерантности потомства одного из регенерантов *Agrostis stolonifera*, устойчивого к кадмию, к одному из наиболее фитотоксичных тяжелых металлов – меди. Медь – один из приоритетных загрязнителей экосистем. Медь поступает в почву из различных источников – выбросы автотранспорта, промышленных предприятий, удобрения, некоторые растворы для опрыскивания различных сельскохозяйственных культур, бытовые и коммунальные отходы. Перекрестную устойчивость к меди оценивали по ингибированию роста побегов в водных растворах токсиканта. Степень устойчивости потомков регенеранта сравнивали с исходными растениями. Растения, толерантные к кадмию продемонстрировали большую устойчивость к меди, по сравнению с исходными растениями, при всех исследуемых концентрациях. Однако, повышение устойчивости не было значительным (например, при концентрации меди 50 мг /л рост исходных растений составлял 61% от контроля, устойчивых к кадмию 74% от контроля). Таким образом, растения, толерантные к кадмию, полученные с помощью клеточной селекции, обладали большей устойчивостью к меди, однако, этой устойчивости недостаточно при высоком уровне загрязнения. Поэтому более целесообразным в условиях высокого уровня загрязнения медью является получение растений, устойчивых к этому металлу.

**Optimization of *Trichoderma* spp. industrial cultivation**Glukhova L.B.<sup>1,2</sup>, Kaposhko D.K.<sup>1</sup>, Frank Yu.A.<sup>1,2</sup>, Ivashenko D.A.<sup>2</sup>, Ivashenko D.A.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Laboratory of Industrial Microbiology, Biological Institute, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia;<sup>2</sup>LLC 'Darwin', Tomsk, Russia

E-mail: bio.darwin@mail.com

**Key message.** The productivity of three *Trichoderma* spp. on different media was compared. The tolerance to salinization and inoculation temperature in the process of solid-state cultivation were determined.

**Keywords:** *Trichoderma* sp., productivity, growth media, temperature, solid state cultivation

Organic and intensive farming involves applying microorganisms in industrial volumes for crops protection and mineral nutrition of plants. Cultivation of microorganisms including fungi of the genus *Trichoderma*, still has some problems associated with productivity increasing of industrial strains and shelf life of biopesticides. *Trichoderma* spp. are widely used in agriculture for soil improvement and plant protection.

The aim of the research was to investigate dependence of *Trichoderma* spp. sporulation from different media conditions. In this study, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens* were grown on CZ, CYA, CYAS (CYA with 5% NaCl), PDA, MEA. Effect of substrate temperature at the inoculation moment was studied on grain media. Productivity of fungi was determined by counting conidia with Hemocytometer after 5 days cultivation on agar media, and after 14 days cultivation on grains.

The maximal growth rate was observed in *T. virens* culture on MEA and PDA, *T. harzianum* culture on MEA, *T. viride* culture on CYA, 5 days. The maximum spores' number was found in *T. virens* and *T. viride* cultures on MEA reaching  $1.2 \cdot 10^9$  spores·ml<sup>-1</sup>. *T. harzianum* on MEA had yield an order less than other fungi and reached only  $7.3 \cdot 10^8$  spores·ml<sup>-1</sup>.

The tolerance to chloride salinity was observed in *T. viride* but not in *T. harzianum* and *T. virens*. 5% salinity 1.5 times decreased the productivity of *T. viride* from  $7.3 \cdot 10^8$  spores·ml<sup>-1</sup> in control conditions (CYA) to  $5 \cdot 10^8$  spores·ml<sup>-1</sup> (CYAS).

Productivity of the fungi during solid state cultivation was studied depending on the degree of grain preparedness, from undercooked to boiled, and the substrate temperature at the moment of inoculation. The sporulation of *Trichoderma* species on grain media revealed no dependence on the degree of grain preparedness. When inoculation was carried out in cooled grain, fungal productivity did not statistically differ. Inoculation in a substrate with temperature about 50 °C led to significant decrease of *T. viride* productivity, but not *T. harzianum* and *T. virens*.

Briefly, *T. virens*, *T. viride* and *T. harzianum* had maximum productivity on MEA. Grain culture medium is suitable for all studied species. *T. viride* is more sensitive to substrate temperature and had higher tolerance to salinity compared to *T. virens* and *T. harzianum*.

**Оптимизация условий промышленного культивирования *Trichoderma* sp.**Глухова Л.Б.<sup>1,2</sup>, Капошко Д.К.<sup>1</sup>, Франк Ю.А.<sup>1,2</sup>, Ивашенко Дан.А.<sup>2</sup>, Ивашенко Ден.А.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Лаборатория промышленной микробиологии, Биологический Институт, Томский государственный университет, Томск, Россия; <sup>2</sup>Общество с ограниченной ответственностью «Дарвин», Томск, Россия

**Аннотация.** Проведено сравнение продуктивности трех видов *Trichoderma* на разных питательных средах, определена устойчивость к засолению, а также к начальной температуре инокуляции при твердофазном культивировании *Trichoderma*.

**Ключевые слова:** *Trichoderma* sp., продуктивность, питательные среды, температура, твердофазное культивирование

Органическое и интенсивное земледелие подразумевает применение культур микроорганизмов в промышленных объемах для защиты урожая и минерального питания растений. В культивировании микроорганизмов, к которым относятся грибы рода *Trichoderma*, до сих пор остаются некоторые проблемы, связанные с повышением продуктивности промышленных штаммов и продолжительностью хранения биопрепаратов. Грибы рода *Trichoderma* широко используются в сельском хозяйстве для улучшения здоровья почвенной микрофлоры и оздоровления растений.

Для решения проблемы, связанной с продуктивностью, было решено изучить влияние разных питательных сред на спороношение промышленных штаммов *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* и *Trichoderma virens*. Работу проводили на стандартных агаризованных средах CZ, CYA, CYAS (CYA с 5% NaCl), PDA, MEA. Изучение влияния температуры субстрата в момент инокуляции на продуктивность проводили на зерновой среде. Продуктивность культур определяли, подсчитывая количество спор в камере Горяева на 5 сутки для питательных сред, и на 14 сутки для зерновой среды.

Наиболее активный рост наблюдался у *T. virens* на питательных средах MEA и PDA, *T. harzianum* - на MEA, *T. viride* - на CYA, 5 сутки роста. Максимальное количество спор было отмечено у *T. virens* и *T. viride* на MEA и составило  $1.2 \cdot 10^9$  спор/мл. При этом промышленный штамм *T. harzianum* на MEA давал на порядок меньше спор (в среднем  $7.3 \cdot 10^8$  спор/мл).

Устойчивость к хлоридному засолению была отмечена у *T. viride*, со снижением продуктивности в 1.5 раза, с  $7.3 \cdot 10^8$  спор/мл в контроле (CYA) до  $5 \cdot 10^8$  спор/мл (CYAS). *T. harzianum* и *T. virens* были не устойчивы к данному типу засоления.

Продуктивность исследуемых микромицетов при твердофазном культивировании изучалась в зависимости от степени готовности зерна, от недоваренного до разваренного, и температуры субстрата при инокуляции. Продуктивность изученных штаммов *Trichoderma* на зерновой среде, не выявила зависимости от степени готовности зерна. Количество спор, при посеве в остывшее до комнатной температуры зерно, статистически не различалось. Инокуляция в зерновую среду температурой 50 °C приводила к достоверному снижению количества спор только у *T. viride*.

Таким образом, *T. virens*, *T. viride* и *T. harzianum* обладали продуктивностью на среде MEA. Зерновая питательная среда подходит для всех исследованных штаммов. *T. viride* является более чувствительным к температуре субстрата, а также устойчивым к засолению, в отличие от *T. virens* и *T. harzianum*.





### **Fine translational control of mRNA: a complex web of mechanisms and its relevance for functional genomics and plant biotechnology**

Goldenkova-Pavlova I.V.<sup>1</sup>, Mustafayev O.<sup>2</sup>, Deineko I.V.<sup>1</sup>, Tyurin A.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Plant Physiology K.A. Timiryazev RAS, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Institute of Genetic Resources, National Academy of Sciences of Azerbaijan, Baku, Azerbaijan  
Email: irengold58@gmail.com

**Key message.** Based on the results of our own research and literature data, we will present the main theoretical and experimental approaches to studying the translation efficiency of plant mRNA and highlight their contribution to functional plant genomics and biotechnology.

**Keywords:** translation, mRNA, regulatory mechanisms

Translation of mRNA into a protein product is an elegantly regulated, almost error-free process. Experimental data and theoretical predictions indicate complex information encoded in mRNA, which, as a rule, determines the future fate of any mRNA - protein formation. The report will: (i) summarize current data on the structural and functional characteristics of plant mRNA and their relationship with translational efficiency; (ii) new experimental and theoretical approaches are considered to clarify a complex network of translation mechanisms; (iii) the potential of this knowledge for functional genomics and plant biotechnology is examined. We believe that the contribution of regulatory contexts and their combinations to the translational status of individual mRNAs can bring the researcher to the «Golden Dream» — all stages of regulation of gene expression, including those introduced from outside, under his strict control. This knowledge will expand the applied potential of regulatory contexts of mRNA, both for the identification of new plant genotypes with the best combinations of alleles, and for the design of a new generation of transgenic plants.

This work was performed under the grant of the Russian Science Foundation 18-14-00026.

### **Тонкий трансляционный контроль мРНК: сложная паутина механизмов и ее актуальность для функциональной геномики и биотехнологии растений**

Голденкова-Павлова И.В.<sup>1</sup>, Мустафаев О.<sup>2</sup>, Дейнеко И.В.<sup>1</sup>, Тюрин А.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия; <sup>2</sup>Институт генетических ресурсов Национальной академии наук Азербайджана, Баку, Азербайджан

**Аннотация:** На основе результатов собственных исследований и литературных данных будут представлены основные теоретические и экспериментальные подходы к исследованию эффективности трансляции мРНК растений и освещен их вклад для функциональной геномики и биотехнологии растений.

**Ключевые слова:** трансляция, мРНК, механизмы регуляции

Трансляция мРНК в белковый продукт – это изящно регулируемый, почти безошибочный процесс. Экспериментальные данные и теоретические предсказания свидетельствуют о сложной информации, закодированной в мРНК, которые, как правило, и определяют дальнейшую судьбу любой мРНК – образование белка. В докладе будут: (i) суммированы современные данные о структурно-функциональных характеристиках мРНК растений и их взаимосвязи трансляционной эффективностью; (ii) рассмотрены новые экспериментальные и теоретические подходы для прояснения сложной сети механизмов трансляции; (iii) рассмотрен потенциал этих знаний для функциональной геномики и биотехнологии растений. Полагаем, что вклад регуляторных контекстов и их сочетаний в трансляционный статус индивидуальных мРНК сможет приблизить к достижению «Золотой мечты» исследователя – все этапы регуляции экспрессии генов, в том числе и привнесённых извне, под его строгим контролем. Эти знания позволят расширить прикладной потенциал регуляторных контекстов мРНК, как для идентификации новых генотипов растений с лучшими комбинациями аллелей, так и для дизайна нового поколения трансгенных растений.

Работа выполнена в рамках гранта РФФ 18-14-00026.

### Cryptochrome-dependent *in vitro* seedling growth of *Melilotus albus*

Golovatskaya I.F., Loshkareva T.V.

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

E-mail: golovatskaya.irina@mail.ru

**Key message.** We have shown that the effect of blue light on the morphogenesis of *Melilotus albus* seedlings can be reversed when illuminated with green light. Like photoregulation of growth suggests the reversibility of the state of cryptochrome.

**Keywords:** *Melilotus albus*, selective light, cryptochrome, photomorphogenesis, scotomorphogenesis

When seeds germinate in darkness, etiolated seedlings form, since the program "search for light" – scotomorphogenesis is activated. In the light the growth of axial organs is inhibited and a photosynthetic apparatus is formed due to the functioning of regulatory pigments (phytochromes, cryptochromes), which differentially perceive the visible part of the solar spectrum. It is known that cryptochromes change the absorption spectrum depending on the oxidation state of their molecules. Recently, the possibility of changing the morphogenesis of plants depending on the state of photoreceptor molecules under the influence of blue (BL) and green (GL) light has been discussed recently. In this regard, the morphogenesis of the seedlings of *M. albus in vitro* was studied, depending on selective light and darkness. The seedlings were cultured under sterile conditions on a Murashige and Skoog medium in the dark and under BL, GL, BL + GL and BL + GL + BL of "Philips" fluorescent lamps (Netherlands). The light was aligned with incident photons 120  $\mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}$ . The area of cotyledons and "mirror" was measured in photographs taken with a video camera using the "Moticam 2300" program. Etiolated seedlings were characterized by elongated hypocotyl and poorly developed cotyledons. BL exerted a greater morphogenic effect on *M. albus* seedlings than GL. The hypocotyl was shortened more, large cotyledons were formed and the first leaf appeared - a "mirror". The surface of the cotyledons was poorly developed at the GL and the first leaf was not formed. Hypocotyl in size was comparable to that of etiolated seedling. When grown under BL + GL, it was noted that the action of GL after BL reduced the size of the root and surface of the cotyledons, leading to the loss of a "mirror". From the analysis of growth parameters, it follows that the illumination of GLs reversed the effects of BL on the morphogenesis of seedlings. This reaction could be directly related to the reversible signaling of cryptochrome. If, following the successive action of BL + GL, BL had an effect, the morphology of the seedling resembled "blue seedlings", only slightly smaller of size. BL removed the effect of GL, which also testified to the participation of cryptochromes in these reactions. *This study was supported by The Tomsk State University competitiveness improvement programme.*

### Криптохром-зависимый рост проростков *Melilotus albus in vitro*

Головацкая И.Ф., Лошкарева Т.В.

Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

**Аннотация.** Показано, что эффект синего света на морфогенез проростков донника белого может быть изменен на противоположный при освещении зеленым светом. Подобная фоторегуляция роста предполагает обратимость состояния криптохрома.

**Ключевые слова:** *Melilotus albus*, селективный свет, криптохром, фотоморфогенез, скотоморфогенез

При прорастании семян в темноте формируются этиолированные проростки, поскольку включается программа "поиска света" – скотоморфогенез. На свету благодаря функционированию регуляторных пигментов (фитохромов, криптохромов), дифференцированно воспринимающих видимый участок солнечного спектра, тормозится рост осевых органов и формируется фотосинтетический аппарат. Известно свойство криптохромов изменять свой спектр поглощения в зависимости от степени окисления молекулы. В последнее время обсуждается возможность изменения морфогенеза растений в зависимости от состояния молекул фоторецепторов под действием синего (СС) и зеленого (ЗС) света. В связи с этим исследовали особенности морфогенеза проростков *Melilotus albus in vitro* в зависимости от селективного света и темноты. Проростки культивировали в стерильных условиях на питательной среде Мурасиге-Скуга в темноте и под СС, ЗС, СС+ЗС и СС+ЗС+СС люминесцентных ламп фирмы «Philips» (Нидерланды), свет выравнивали по падающим фотонам 120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ . Площадь семядолей и «зеркальца» измеряли на фотографиях, сделанных с помощью видеокамеры, с использованием программы «Moticam 2300». Этиолированные проростки характеризовались вытянутым гипокотилем и слабо развитыми семядолями. СС оказывал большее морфогенное действие на проростки донника белого, чем ЗС. Больше укорачивался гипокотиль, формировались большие семядоли и появлялся первый лист – «зеркальце». На ЗС была слабо развита поверхность семядолей и не формировался первый лист. Гипокотиль по размерам был сопоставим с таковым у этиолированного проростка. При выращивании под СС+ЗС отметили, что действие ЗС после СС уменьшало размеры корня и поверхности семядолей, приводя к утрате «зеркальца». Из анализа ростовых параметров следовало, что освещение ЗС обращало эффекты СС на морфогенез проростков. Эта реакция могла быть связана напрямую с обратимым сигналингом криптохрома. Если вслед за последовательным действием СС+ЗС оказывал действие СС, то морфология проростка напоминала «синие проростки», только немного меньших размеров. СС снимал действие ЗС, что также свидетельствовало об участии криптохромов в этих реакциях. *Исследование в рамках научного проекта, выполненного при поддержке Программы повышения конкурентоспособности Томского госуниверситета.*

**Influence of the fungicide TMTD as a stress factor on the ultrastructure of pea (*Pisum sativum* L.) symbiotic nodules**Gorshkov A.P.<sup>1</sup>, Tsyganova A.V.<sup>1</sup>, Tsyganov V.E.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Saint Petersburg Scientific Center RAS, Saint Petersburg, Russia  
E-mail: artemius1993@yandex.ru

**Key message.** The negative effects of tetramethylthiuram disulfide (TMTD) on the ultrastructural organization of nodules of pea wild-type line SGE were studied.

**Keywords:** symbiotic nodule, fungicide, cell wall, bacteroid

In the agricultural industry, various plant protection products are widely used, including fungicides, one of which is TMTD. It was previously shown that TMTD can have a negative effect on legume-rhizobial symbiosis, however, studies of the effect of TMTD on the structure of nodules have not been performed. The aim of this work was to study the effect of various concentrations of TMTD on the ultrastructural organization of nodules of pea (*Pisum sativum* L.) wild-type line SGE. Plants were grown in containers with vermiculite containing 0.4, 4 and 8 g/kg TMTD. At a concentration of 0.4 g/kg, the influence of TMTD on the development of plants and nodules was not observed. At a concentration of 4 and 8 g/kg TMTD, reduction of both the shoots and roots was seen, the number of nodules decreased. At the ultrastructural level at a concentration of 0.4 g/kg TMTD, the following abnormalities were found: cell wall clearing, especially in the meristem zone, accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in bacteroids. At a concentration of 4 g/kg TMTD, the abnormalities of the cell walls were more pronounced, and their swelling, deformation and clearing was observed in all histological zones of the nodule. The walls of the infection threads were also undergoing to swelling and clearing. In bacteroids, along with PHB, large spherical inclusions of average electron density of unknown origin were revealed. At a concentration of 8 g/kg TMTD, along with the above-mentioned changes, bacteroids of an abnormal shape and density were present in the infected cells. Thus, TMTD negatively affects the development of symbiotic pea nodules at the ultrastructural level.

The study was supported by RSF 17-76-30016.

**Влияние фунгицида ТМТД как стрессового фактора на ультраструктуру симбиотических клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.)**Горшков А.П.<sup>1</sup>, Цыганова А.В.<sup>1</sup>, Цыганов В.Е.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>Санкт-Петербургский научный центр РАН, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Изучены проявления негативного влияния тетраметилтиурамдисульфида (ТМТД) на ультраструктурную организацию клубеньков гороха дикого типа линии SGE.

**Ключевые слова:** симбиотический клубенек, фунгицид, клеточная стенка, бактероид

В сельскохозяйственном производстве широко применяются различные средства защиты растений, в том числе фунгициды, одним из которых является ТМТД. Ранее было показано, что ТМТД может оказывать негативное влияние на бобово-ризобиальный симбиоз, тем не менее, исследования влияния ТМТД на структуру клубеньков не проводились. Целью данной работы было изучить влияние различных концентраций ТМТД на ультраструктурную организацию клубеньков линии гороха посевного (*Pisum sativum* L.) дикого типа SGE. Растения были выращены в сосудах с вермикулитом, содержащим 0,4, 4 и 8 г/кг ТМТД. При концентрации 0,4 г/кг не наблюдалось влияния ТМТД на развитие растений и клубеньков. При концентрации 4 и 8 г/кг ТМТД замечена редукция как стеблей, так и корней, количество клубеньков уменьшалось. На ультраструктурном уровне при концентрации 0,4 г/кг ТМТД обнаружены следующие аномалии: просветление клеточных стенок, особенно в зоне меристемы, накопление полигидроксипропаноата (ПОБ) в бактероидах. При концентрации 4 г/кг ТМТД аномалии клеточных стенок были выражены сильнее – наблюдалось их набухание, искривление и просветление во всех гистологических зонах клубенька. Стенки инфекционных нитей также подвергались набуханию и просветлению. В бактероидах наряду с ПОБ были выявлены крупные сферические включения средней электронной плотности неизвестной природы. При концентрации 8 г/кг ТМТД, наряду с вышеописанными изменениями, в инфицированных клетках присутствовали бактероиды аномальной формы и плотности. Таким образом, ТМТД негативно влияет на развитие симбиотических клубеньков гороха на ультраструктурном уровне.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-76-30016.



### Novel determinants of plant-pectobacteria interaction: identification and characteristics

Gorshkov V.<sup>1,2</sup>, Parfirova O.<sup>1,2</sup>, Tsers I.<sup>1,2</sup>, Petrova O.<sup>1</sup>, Gogoleva N.<sup>1,2</sup>, Ageeva M.<sup>1</sup>, Islamov B.<sup>1</sup>,  
Vorob'ev V.<sup>1,2</sup>, Mikshina P.<sup>1</sup>, Gogolev Yu.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia; <sup>2</sup>Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

E-mail: gvy84@mail.ru

**Key message.** There are "molecular switchers" that transform peaceful coexistence of plants with phytopathogenic pectobacteria to symptomatic infection. These switchers seem to be perspective "targets" for plant protection approaches.

**Keywords:** phytopathogens, latent infection, phytoimmunity, virulence, tolerance

Most if not all phytopathogenic microorganisms being able to cause plant diseases usually interact with their hosts as commensalists or even mutualists without manifesting their pathogenic potential. This knowledge forces one to think about the alternative ways of plant protection. The contemporary plant protection approaches are based on pathogen elimination either by using pesticides or by breeding resistant plant varieties. However, such kind of a "tough politics" in relation to a pathogen leads to its fast adaptation resulting in the emergence of new highly aggressive strains. Therefore, the plant protection methods that would not apply a selective pressure on a pathogen are of a great importance. From this position, agrotechnological strategy that would ensure obligatory mutualistic behavior of phytopathogens seems promising. The major obstacle for such a strategy is our poor knowledge in the physiology of asymptomatic infections.

*Pectobacterium atrosepticum* (*Pba*) belongs to one of the most devastating phytopathogens that causes plant rots. It is always regarded as a pathogen with brute force mode of action. Herewith, these bacteria often establish prolonged commensalistic interactions with plants without causing the disease. Our comprehensive study aims to understand what drives the peaceful coexistence of plants with pathogens in terms of the molecular physiology of both organisms and what disturbs the equilibrium within the pathosystem.

Different types of microscopy and NGS-transcriptomics constitute the basis of our systemic methodology providing information on 1) spatial organization of microbial population *in planta* and phenotypic diversity of *Pba* cells – both are the criteria of the infection type; and 2) plant and bacterial genes differentially expressed during latent and acute infection enabling us to assume the molecular players (including novel ones) that determine the type and outcome of plant-pathogen interaction. Then, specific test-systems (including those involving mutagenesis, cloning, chromatography, NMR-spectroscopy, phytohormone application, immunodetection, etc.) are developed to experimentally characterize these players.

The obtained results show that latent, disease-free infections are likely to be the physiological norm and reflect natural equilibrium between plants and pathogens, and the development of pathological processes is a result of the disturbance of this equilibrium due to the specific physiological reactions of both organisms. Different types of induced plant susceptible responses with different outcomes were characterized. Specific role in determination of the infection type was shown for phytohormonal status (which is actively modulated by the pathogen) and *Pba*-induced plant-mediated reorganization of the plant cell wall by plant cell wall proteins/enzymes and ROS. For the first time, we have revealed that a member of soft rot *Pectobacteriaceae* (SRP) is able to produce low molecular weight extracellular phosphonates that seem to contribute to plant-microbe interaction. The synthesis of these compounds is strongly induced by plant-derived metabolites. In addition, for the first time for *Pectobacterium* genus, we obtained and characterized the mutant defective in enterobactin-like siderophore production. Our results show that *Pba* siderophores act in a different manner compared to well-characterized *Dickeya* siderophores. We also identified and characterized the properties of *Pba* exopolysaccharides that made it possible to discuss their role in the pathosystem development. Thus, our data revealed novel molecular participants of plant-*Pba* interaction. The action of some of these metabolites determines the strategy of host-microbe interaction (latent, typical or atypical infection). Global comparative picture of the pathosystem at the equilibrated and disequilibrated states will be presented and maintenance of a pathosystem at the equilibrated state will be discussed as a perspective plant protection strategy.

The study is supported by RSF (No 19-14-00194).

**The study of transcriptomes of symbiotic tissue of pea using  
the third-generation sequencing technology Oxford Nanopore**

Gribchenko E.S., Afonin A.M., Kulaeva O.A., Zorin E.A., Shtark O.Yu., Zhukov V.A.  
FSBSI ARRIAM, St. Petersburg, Russia  
Email: gribemma@gmail.com

**Key message.** The transcriptome profiles the cv. Frisson mycorrhizal roots and inoculated nitrogen-fixing nodules were investigated using the Oxford Nanopore sequencing technology. A database of gene isoforms and their expression has been created.

**Keywords:** *Pisum sativum* L, legume-rhizobial symbiosis, arbuscular mycorrhiza, transcriptomics

Pea (*Pisum sativum* L.) is a popular pulse crop and an important model object of genetics. It is capable of forming triple symbiotic systems consisting of a plant, arbuscular mycorrhizal fungi, and nodule bacteria. With the spread of transcriptome and proteomic approaches to the study of mutualistic symbioses of peas, the need for a reference transcriptome arose. The knowledge about the sequences of genes expressed under various experimental conditions is needed to increase the resolution and accuracy of other methods. The third-generation sequencing technology from Oxford Nanopore produces sequences of entire full-length cDNA molecules, making it possible to determine the expression of genes with high accuracy and also to determine their isoforms and differential expression in tissues.

In our work, the transcriptomes of roots of plants of the Frisson variety 1) without treatment, 2) inoculated with arbuscular-mycorrhizal fungi *Rhizophagus irregularis* strain BEG144, 3) nitrogen-fixing nodules formed with the *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain RCAM1026. In total, more than 80,000 unique isoforms were obtained using this method, with more than 15% of them being unique for nodule transcriptomes, and 8% unique for mycorrhizal root transcriptomes. The remaining isoforms were found in all studied samples. Functional annotation showed a large number of protein-coding transcripts not previously described for *P. sativum*.

Creating a database of gene expression and their isoforms in various tissues will create a solid foundation for all further transcriptome studies of pea.

This work was supported by a grant from the RSF 17-76-30016.

**Изучение транскриптомов симбиотических тканей гороха посевного при помощи технологий секвенирования  
третьего поколения Oxford Nanopore**

Грибченко Э.С., Афонин А.М., Кулаева О.А., Зорин Е.А., Штарк О.Ю., Жуков В.А.  
ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** С использованием технологии секвенирования Oxford Nanopore изучен транскриптом корней гороха сорта Frisson при образовании арбускулярной микоризы и азотфиксирующих клубеньков. Создана база данных экспрессии генов и их изоформ.

**Ключевые слова:** Горох посевной, бобово-ризобийный симбиоз, арбускулярная микориза, транскриптомика

Горох (*Pisum sativum* L.) – широко распространенная сельскохозяйственная культура и важный модельный объект генетики. Он способен образовывать тройные симбиотические системы, состоящие из растения, грибов арбускулярной микоризы и клубеньковых бактерий. По мере распространения транскриптомных и протеомных подходов к изучению мутуалистических симбиозов гороха, для повышения разрешающей способности и точности других методов возникла необходимость в референсном транскриптоме, т.е. в знании последовательностей генов, экспрессирующихся в различных экспериментальных условиях. Использование технологий секвенирования третьего поколения Oxford Nanopore заключается в прочтении молекулы кДНК целиком, что позволяет с большой точностью определять экспрессию генов и также определять их изоформы и дифференциальную экспрессию в тканях.

В нашей работе были исследованы транскриптомы корней растений сорта Frisson при взаимодействии с арбускулярно-микоризными грибами вида *Rhizophagus irregularis* BEG144, азотфиксирующих клубеньков, образовавшихся при взаимодействии со штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026, и корней без обработки. Всего при помощи данного метода были получены более 80000 уникальных изоформ, при этом более 15% из них были уникальны для транскриптома клубеньков, и 8% были уникальны для транскриптома микоризованных корней. Остальные изоформы были найдены во всех исследуемых образцах. Функциональная аннотация показала большое число белок-кодирующих транскриптов, ранее не описанных для гороха посевного.

Создание базы данных экспрессии генов и их изоформ в различных тканях создаст прочный фундамент для всех дальнейших транскриптомных исследований гороха посевного.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-76-30016.

### Varietal features of potato responses to *Azospirillum* and exogenous indole-3-acetic acid

Grigoryan M.A.<sup>1</sup>, Starchikov A.A.<sup>1</sup>, Tkachenko O.V.<sup>1</sup>, Burygin G.L.<sup>1,2</sup>, Evseeva N.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Saratov, Russia; <sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

E-mail: grigorian.mika@yandex.ru

**Key message.** The effect of *A. brasilense* Sp245 and indoleacetic acid (IAA) on microplants of 10 potato cultivars in *in vitro* culture was studied. Significant genotypic differences in the growth-stimulating effect of bacteria and IAA on plants were established.

**Keywords:** *Solanum tuberosum*, *in vitro*, *Azospirillum brasilense* Sp245, indole-3-acetic acid

Potato cultivars differ in resistance to stress, response to nutritional levels, as well as in phytohormone content, sensitivity to exogenous regulators, and in response to inoculation with associative bacteria. Plant-growth-promoting rhizobacteria, such as *Azospirillum brasilense* Sp245, stimulate plant growth due to an increase in the level of phytohormones auxins (Kargapolova et al., 2019).

The purpose of the study was a comparison study of the effect of *A. brasilense* Sp245 bacteria and exogenous indole acetic acid on microplants of 10 potato cultivars *in vitro*.

Microcuttings of 10 potato cultivars were placed on a liquid nutrient medium Murashige-Skoog (MS) without hormones (control) or with IAA at a concentration of 1, 0.1, 0.01 mg/l, respectively. In the fifth variant of the experiment, microplants on a medium without hormones were inoculated with a suspension of *A. brasilense* Sp245 at a concentration of 10<sup>6</sup> cells/ml of nutrient medium.

The growth-promoting effect of bacteria and IAA primarily was in relation to the root system. The data on the cultivars show a significant genotypic dependence of the growth-promoting effect of bacteria and IAA on plants.

Based on the analysis of the results of the action of bacteria and exogenous IAA, all studied cultivars were divided into three groups:

I. Avrora, Ilyinsky, Red Scarlett – the growth of the root system is stimulated; the growth of shoots is reduced. The effect of bacteria is more pronounced than the effect of IAA;

II. Vasilek, Zhukovsky ranniy, Condor, Phioletoviy – the growth of the root system and shoots is increased. The effect of bacteria influence is comparable to or lower than the effect of IAA;

III. Darenka, Nevsky, Rozara – the growth of the root system is inhibited, and the growth of shoots is increased. The effect of bacteria influence is comparable or less pronounced than the effect of IAA.

Thus, as a result of screening of morphometric parameters, the most contrasting potato cultivars in response to inoculation were determined: Red Scarlett, Condor and Nevsky. This work was supported by the RFBR grant No. 19-016-00116.

### Сортовые особенности ответных реакций картофеля на действие азоспирилл и экзогенной ИУК

Григорян М.А.<sup>1</sup>, Старчиков А.А.<sup>1</sup>, Ткаченко О.В.<sup>1</sup>, Бурьгин Г.Л.<sup>1,2</sup>, Евсеева Н.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ, Саратов, Россия; <sup>2</sup>ИБФРМ РАН, Саратов, Россия

**Аннотация.** Изучено влияние бактерий *A. brasilense* Sp245 и ИУК на микрорастения 10 сортов картофеля в культуре *in vitro*. Установлены существенные генотипические различия проявления ростостимулирующего действия бактерий и ИУК на растения.

**Ключевые слова:** *Solanum tuberosum*, *in vitro*, *Azospirillum brasilense* Sp245, индолилуксусная кислота

Сорта картофеля различаются по устойчивости к стрессовым воздействиям, реакции на уровень питания, а также по содержанию фитогормонов, чувствительности к экзогенным регуляторам и по реакции на инокуляцию ассоциативными бактериями. Ризосферные ростостимулирующие бактерии, такие как *Azospirillum brasilense* Sp245, стимулируют рост растений в большой мере благодаря повышению уровня фитогормонов ауксинов (Kargapolova et al., 2019).

Целью исследования являлось сравнительное изучение влияния бактерий *A. brasilense* Sp245 и экзогенной индолилуксусной кислоты на микрорастения 10 сортов картофеля в культуре *in vitro*.

Микрочеренки картофеля 10 сортов помещали на жидкую питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) без гормонов (контроль) или с содержанием ИУК в концентрации 1, 0,1, 0,01 мг/л. В пятом варианте опыта микрорастения на среде без гормонов инокулировали суспензией бактерий *A. brasilense* Sp245 в концентрации 10<sup>6</sup> кл/мл питательной среды.

Наблюдалось ростостимулирующее влияние бактерий и ИУК по сравнению с контролем в первую очередь в отношении корневой системы. Данные по сортам показывают существенную генотипическую зависимость проявления ростостимулирующего действия бактерий и ИУК на растения.

На основании анализа результатов действия бактерий и экзогенной ИУК все изученные сорта распределены на три группы:

I. Аврора, Ильинский, Ред Скарлетт – стимулируется рост корневой системы, рост побегов в среднем снижается. Эффект действия бактерий выражен сильнее, чем ИУК;

II. Василек, Жуковский ранний, Кондор, Фиолетовый – рост корневой системы и побегов в среднем увеличивается. Эффект влияния бактерий в среднем сравним или ниже, чем ИУК;

III. Даренка, Невский, Розара – рост корневой системы ингибируется, а рост побегов в среднем увеличивается. Эффект влияния бактерий в среднем сравним или выражен слабее, чем ИУК.

Таким образом, в результате скрининга морфометрических параметров определены наиболее контрастные по реакции на инокуляцию сорта картофеля: Ред Скарлетт, Кондор и Невский.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-016-00116.

**Prospects of fluorescence methods application for monitoring of cyanobacterial cultures in biotechnology**Grigoryeva N.Yu.<sup>1</sup>, Liss A.A.<sup>2</sup><sup>1</sup>Saint-Petersburg Scientific-Research Center for Ecological Safety RAS, Saint-Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Saint-Petersburg Electrotechnical University «LETI», Saint-Petersburg, Russia

E-mail: renes3@mail.ru

**Key message.** In the last few decades cyanobacteria became a valuable object of biotechnology. During their industrial cultivation growth rate, physiological state and algological purity of the culture should be controlled permanently. One of the methods that can provide on-line monitoring of cyanobacterial cultures is a fluorescence spectroscopy.

**Keywords:** Cyanobacteria, fluorescence spectroscopy, industrial cultivation, on-line monitoring, physiological state

Cyanobacteria are photosynthetic microorganisms that possess a high potential for innovative applications in agriculture, food production, cosmetics, wastewater remediation, biofuels, antioxidative enzymes production, etc. In some South American and Southeast Asian countries mass cultivation of cyanobacteria already became an important part of agriculture and food industry [1]. During the industrial cultivation cyanobacterial cultures should be permanently checked to control their algological purity and the absence of additional toxic species. In this work methods of fluorescence spectroscopy, most perspective for monitoring of physiological state and biological diversity of cyanobacterial cultures during the industrial cultivation, are considered. Cyanobacterial strains from CALU collection of the Core Facility Center “Centre for Culture Collection of Microorganisms” of the Research Park of St. Petersburg State University were used in this investigation. An intrinsic self-fluorescence spectra of living cyanobacterial cultures were recorded via Cary Eclipse (Varian Cary) scanning fluorimeter and confocal laser-scanning microscope Leica TCS-SP5. It is well-known, that the intensity and spectral composition of fluorescence, emitted by cyanobacterial cells in vivo, depends on the operational effectiveness of photosynthetic apparatus, reflecting the in-time physiological state of the culture [2]. Therefore, self-fluorescence spectra, excited at the wavelengths of main photosynthetic pigments, i.e. phycoerythrin (570 nm), phycocyanin (625 nm) and chlorophyll *a* (440 nm), are suggested for on-line monitoring of the developmental stage and physiological state of cyanobacterial cultures during cultivation. We suggest to monitor the algological purity of industrially cultivated cyanobacterial cultures via several characteristic fluorescence spectra, comparing them with the reference spectra of an algologically pure culture. Any changes in the fluorescence intensity of main photosynthetic pigments will indicate the presence of additional species in the industrial volume. In this work we try to emphasize methods of fluorescence spectroscopy most perspective for industrial and biotechnological applications.

**Перспективы применения флуоресцентных методов для мониторинга цианобактериальных культур в биотехнологии**Григорьева Н.Ю.<sup>1</sup>, Лисс А.А.<sup>2</sup><sup>1</sup>Санкт-Петербургский Научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН, Санкт-Петербург, Россия;<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ», Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** В последние несколько десятилетий цианобактерии становятся важным объектом биотехнологии. В процессе их промышленного культивирования необходимо постоянно контролировать скорость роста, физиологическое состояние и альгологическую чистоту культуры. Одним из методов, который может обеспечить оперативный мониторинг культур является флуоресцентная спектроскопия.

**Ключевые слова.** Цианобактерии, флуоресцентная спектроскопия, промышленное культивирование, оперативный мониторинг, физиологическое состояние

Цианобактерии – это фотосинтезирующие микроорганизмы, которые обладают высоким инновационным потенциалом в сельском хозяйстве, в производстве продуктов питания, в косметике, в очистке сточных вод, производстве биотоплива и антиоксидантных ферментов и пр. В некоторых странах Южной Америки и Юго-Восточной Азии массовое выращивание цианобактерий уже стало важной частью сельского хозяйства и пищевой промышленности [1]. Во время промышленного культивирования цианобактериальные культуры необходимо постоянно мониторить на предмет контроля их альгологической чистоты и отсутствия нежелательных токсичных видов. В данной работе рассматриваются методы флуоресцентной спектроскопии, наиболее перспективные для мониторинга физиологического состояния и биологического разнообразия культур цианобактерий при промышленном культивировании. Для исследования использовались штаммы цианобактерий из коллекции CALU Ресурсного центра «Культивирования микроорганизмов» Научно-исследовательского парка СПбГУ. Спектры собственной флуоресценции живых цианобактериальных регистрировались с помощью сканирующего флуориметра Cary Eclipse (Varian Cary) и конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS-SP5. Как известно, интенсивность и спектральный состав флуоресценции, излучаемой цианобактериальными клетками in vivo, зависит от эффективности работы фотосинтетического аппарата, отражающего, в свою очередь, физиологическое состояние культуры на данный момент [2]. Поэтому для оперативного мониторинга фазы развития и физиологического состояния культуры цианобактерий во время культивирования предлагается использовать спектры собственной флуоресценции, возбуждаемые на длинах волн основных фотосинтетических пигментов: фикоэритрина (570 нм), фикоцианина (625 нм) и хлорофилла *a* (440 нм). Мониторинг альгологической чистоты выращиваемых цианобактериальных культур предлагается контролировать по нескольким характерным спектрам флуоресценции контролируемой культуры, сравнивая их с эталонными спектрами альгологически чистой культуры. Любые изменения интенсивности флуоресценции основных фотосинтетических пигментов укажут на наличие дополнительных видов в промышленном объеме. В данной работе мы постарались выделить методы флуоресцентной спектроскопии, наиболее перспективные для промышленного и биотехнологического применения.

[1] S.M. Reddy, S. Girisham, G.N. Babu, Applied Microbiology (agriculture, environmental, food and industrial microbiology) (Scientific Publishers, India 2017)

[2] N. Y. Grigoryeva, L. V. Chistyakova, A.A. Liss, Oceanology 58(6), 896–904 (2018).

**Detection of bacteria in water by a slot-mode sensor in an acoustic delay line**Guliy O.I.<sup>1</sup>, Zaitsev B.D.<sup>2</sup>, Karavaeva O.A.<sup>1</sup>, Alsowaidi A.K.M.<sup>3</sup>, Shavishvili I.Z.<sup>2</sup>, Borodina I.A.<sup>3</sup><sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia;<sup>2</sup>Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, Saratov Branch, Saratov, Russia;<sup>3</sup>Chernyshevsky National Research State University, Saratov, 410005, Russia

E-mail: guliy\_olga@mail.ru

**Key message.** A method has been developed for the rapid determination of bacteria with the help of an acoustic sensor using as example *E. coli* cells in water when they are infected with specific bacteriophages. The detection limit is  $\sim 10^3$  cells / ml, with an analysis time of 5 min.

**Keywords:** microbial cells, bacteriophages, detection, acoustic sensor

Analysis of microbial contamination of water is one of the important tasks for the timely prevention of food poisoning and mass diseases. In this regard, acoustic biosensor systems are a unique solution for detecting bacteria in water. Goal. Developing the method of an analysis of bacteria during their infection by bacteriophages in water using an acoustic sensor. Methods. We used a sensor based on a structure consisting of two piezoelectric plates of lithium niobate with a gap between them. The upper plate serves as the bottom of the liquid container, which is filled with the studied cell suspension. When specific bacteriophages are added to the test suspension of cells, the velocity of the acoustic wave propagating in such a structure will change. A change in the wave velocity leads to a change in the output parameters of the sensor recorded in the experiments. By changing the output parameters of the sensor for a suspension of cells before and after biological interaction, we can draw conclusions about the presence (or absence) of the studied bacteria in the analyzed suspension. The possibility of determining bacterial cells in water with a high conductivity value (up to 990  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) by detecting a specific "bacterial cell – bacteriophage" interaction even in the presence of extraneous microflora using a sensor based on a slot mode in an acoustic delay line with a shear horizontal wave of zero order is shown. The cell detection limit was established, which turned out to be  $10^3$  cells/ml. The method is based on recording changes in the depth and frequency of resonance absorption peaks on the sensor output signal before and after microbial cell infection by specific bacteriophages. Control experiments were carried out, excluding non-specific interaction of microbial cells with bacteriophages. A distinctive feature of the sensor used is the presence of a removable liquid cell, which makes it possible to reuse it and facilitates the process of cleaning the cell from the sample, which is an important condition when working with microorganisms. The developed method allows screening a large number of water samples in a short time, to identify sources of microbiological hazards and to assess the risks of the disease. This work was partially supported by the RFBR grant No. 19-07-00300 and 19-07-00304.

**Определение бактерий в воде датчиком на основе щелевой моды в акустической линии задержки**Гулий О.И.<sup>1</sup>, Зайцев Б.Д.<sup>2</sup>, Каравеева О.А.<sup>1</sup>, Алсовэиди А.К.М.<sup>3</sup>, Шавишвили И.З.<sup>3</sup>, Бородина И.А.<sup>2</sup><sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов; <sup>2</sup>Институт радиотехники и электроники им В.А. Котельникова РАН, Саратовский филиал, Саратов; <sup>3</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

**Аннотация.** Разработан способ быстрого определения бактерий с помощью акустического датчика на примере клеток *E. coli* в воде при их инфекции специфичными бактериофагами. Предел детекции составляет  $\sim 10^3$  кл/мл, при времени анализа 5 мин.

**Ключевые слова:** микробные клетки, бактериофаги, детекция, акустический датчик

Анализ микробного загрязнения воды является одной из важных задач для своевременного предотвращения пищевых отравлений и массовых заболеваний. В этом плане акустические биосенсорные системы являются уникальным решением для определения бактерий в воде. Цель. Развитие метода анализа бактерий при их инфекции бактериофагами в воде с помощью акустического датчика. Методы. В работе использовали датчик, основанный на структуре из двух пьезоэлектрических пластин ниобата лития с зазором между ними. Верхняя пластина служит дном жидкостного контейнера, который заполняется исследуемой суспензией клеток. После добавления к исследуемой суспензии клеток специфичных бактериофагов, скорость акустической волны, распространяющейся в такой структуре, изменяется. Изменение скорости волны приводит к изменению выходных параметров датчика, регистрируемых в экспериментах. По изменению выходных параметров датчика для суспензии клеток до и после биологического взаимодействия можно сделать заключения о наличии (или отсутствии) исследуемых бактерий в анализируемой суспензии. Показана возможность определения бактериальных клеток в воде с высоким значением проводимости (вплоть до 990 мкСм/см) путем регистрации специфического взаимодействия «бактериальные клетки – бактериофаг» даже в присутствии посторонней микрофлоры с помощью датчика на основе щелевой моды в акустической линии задержки с поперечно-горизонтальной волной нулевого порядка. Установлен предел детекции клеток, который оказался равным  $10^3$  кл/мл. Способ основан на регистрации изменений глубины и частоты пиков резонансного поглощения на выходном сигнале датчика до и после инфекции микробных клеток специфичными бактериофагами. Проведены контрольные эксперименты, исключающие неспецифичное взаимодействие микробных клеток с бактериофагами. Отличительной особенностью используемого датчика является наличие съемной жидкостной ячейки, что дает возможность ее многократного использования и облегчает процесс очистки ячейки от образца, что является важным условием при работе с микроорганизмами. Разработанный метод позволяет проводить скрининг большого количества образцов воды в краткие сроки, выявить источники микробиологических опасностей и оценить риски заболевания.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ №№ 19-07-00300 и 19-07-00304.



### Analysis of the antibacterial activity of ampicillin by biological sensor based on a microwave resonator

Guliy O.I.<sup>1,2</sup>, Zaitsev B.D.<sup>3</sup>, Smirnov A.V.<sup>4</sup>, Karavaeva O.A.<sup>1</sup>, Alsowaidi A.K.M.<sup>4</sup>, Larionova O.S.<sup>2</sup>,  
Borodina M.A.<sup>2</sup>, Borodina I.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia; <sup>2</sup>Saratov State Agrarian University, Saratov, Russia; <sup>3</sup>Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, Saratov Branch, Saratov, Russia; <sup>4</sup>Kotel'nikov Institute of Radio Engineering and Electronics, RAS, Moscow, Russia; <sup>5</sup>Chernyshevsky National Research State University, Saratov, Russia  
E-mail: guliy\_olga@mail.ru

**Key message.** A method has been developed for analyzing the activity of antibacterial drugs on ampicillin as example by using a biological sensor based on a microwave resonator with an analysis time of ~ 15 minutes.

**Keywords:** microbial cells, antibacterial activity, ampicillin, microwave resonator

One of the main points when using antibiotics is the determination of their antibacterial activity. Goal. Development of a method for analyzing the antibacterial activity of antibiotics using ampicillin as an example by biological sensor based on a microwave resonator. A detection system based on a microwave electromagnetic resonator represented a segment of a rectangular waveguide, one end of which was electrically shorted by a sealed copper plate. The second end included a standard flange with the guides for precise positioning of a lithium niobate plate with a dielectric constant of the order of 35-40. Resonance appeared on a waveguide segment bounded on one side by a copper plate, and on the other side by a lithium niobate plate with a sensitive layer. The sensitive layer of the sensor represented a thin film of polystyrene (PS), which was uniformly deposited on the surface of a lithium niobate plate and modified in a plasma of a high-frequency (HF) argon discharge. Ampicillin-sensitive microbial cells were immobilized on the surface of thin PS films. Using a coaxial-waveguide junction and a coaxial cable, this device was connected to the S-parameter meter E5071C (Agilent, USA). The reflection coefficient S<sub>11</sub> was measured in the frequency range 5 - 8.5 GHz. Results. After immobilization of cells on the surface of PS films, the possibility of determining ampicillin activity using a microwave resonator was studied as follows. The antibiotic with the given concentration (5, 10, 25, and 50 µg/ml) was added to immobilized cells and the frequency dependence of parameter S<sub>11</sub> was measured near the third resonance peak. The choice of antibiotic concentrations was determined by previous studies. It has been found that with an increase in the concentration of the antibiotic from 5 to 50 µg/ml the S<sub>11</sub> value varies from -12.6 to -15.1 dB. At that, in all cases, the resonant frequency varied within the limits from 8.065 to 8.062 GHz. Thus, it is shown that the developed system can be used to determine the activity of ampicillin.

This work was partially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation and the Russian Foundation for Basic Research (project No. 19-07-00304, 20-37-70021).

### Анализ антибактериальной активности ампициллина биологическим датчиком на основе сверхвысокочастотного резонатора

Гулий О.И.<sup>1,2</sup>, Зайцев Б.Д.<sup>3</sup>, Смирнов А.В.<sup>4</sup>, Каравеева О.А.<sup>1</sup>, Алсовэиди А.К.М.<sup>5</sup>, Ларионова О.С.<sup>2</sup>,  
Бородин М.А.<sup>2</sup>, Бородин И.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов; <sup>2</sup>Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов; <sup>3</sup>Институт радиотехники и электроники им В.А. Котельникова РАН, Саратовский филиал, Саратов; <sup>4</sup>Институт радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова РАН, Москва; <sup>5</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

**Аннотация.** Разработан способ анализа активности антибактериальных препаратов на примере ампициллина биологическим датчиком на основе сверхвысокочастотного (СВЧ) резонатора при времени анализа ~ 15 мин.

**Ключевые слова:** микробные клетки, антибактериальная активность, ампициллин, сверхвысокочастотный резонатор  
Одним из основных моментов при использовании антибиотиков является определение их антибактериальной активности. Цель. Развитие метода анализа антибактериальной активности антибиотиков на примере ампициллина с помощью биологического датчика на основе СВЧ резонатора. Детектирующая система на основе СВЧ электромагнитного резонатора представляла собой отрезок прямоугольного волновода, один торец которого был электрически закорочен запаянной медной пластинкой. На втором торце располагался стандартный фланец с направляющими полосками для точного позиционирования пластины ниобата лития с диэлектрической проницаемостью порядка 35 – 40. Резонанс возникал на отрезке волновода, ограниченном с одной стороны медной пластинкой, а с другой стороны – пластиной ниобата лития с чувствительным слоем. Чувствительный слой датчика представлял тонкую плёнку полистирола (ПС), которая равномерно наносилась на поверхность пластины ниобата лития и модифицировалась в плазме высокочастотного (ВЧ) разряда аргона. Микробные клетки, чувствительные к ампициллину, иммобилизовали на поверхности плёнки ПС. Данное устройство с помощью коаксиально-волноводного перехода и коаксиального кабеля подключалось к измерителю S-параметров E5071C (Agilent, США). Коэффициент отражения S<sub>11</sub> измерялся в диапазоне частот 5 – 8.5 ГГц. Результаты. После иммобилизации клеток на поверхности пленок ПС изучалась возможность определения активности ампициллина с помощью СВЧ резонатора следующим образом. К иммобилизованным клеткам добавляли антибиотик с заданной концентрацией (5, 10, 25 и 50 мкг/мл) и измеряли частотную зависимость параметра S<sub>11</sub> вблизи третьего резонансного пика. Выбор концентраций антибиотика был обусловлен ранее проведенными исследованиями. Установлено, что при увеличении концентрации антибиотика от 5 до 50 мкг/мл величина S<sub>11</sub> изменяется от -12.6 до -15.1 дБ. При этом во всех случаях резонансная частота менялась в пределах от 8.065 до 8.062 ГГц. Установлено, что разработанная система может быть использована для определения активности ампициллина.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 19-07-00304, 20-37-70021).



### **Biolistic transformation of plants using CRISPR/Cas9 technology**

*Gumerova G., Chemeris A., Kuluev B.*

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,  
Ufa, Russia

*E-mail: gulnar.yas@mail.ru*

**Key message.** *Experiments on CRISPR/Cas9 mediated knock-in approaches in the PDS gene of various genes of interest were planned. Biolistic bombardment mediated delivery of target vectors to plant explants was suggested.*

**Keywords:** *genetic transformation of plants, CRISPR/Cas9 system, biolistic bombardment, tobacco*

Constantly new methods of gene editing are being created in modern genetic engineering. One of the most promising among them is CRISPR/Cas9 system. This technique is based on microbial adaptive immune system and allowed to modify a specific genome in precise and predictable manner. Researches on this area have shown that CRISPR/Cas9 is a great tool to edit many genes in a variety of plant species, including the model plant species as well as agriculturally important crops. The purpose of our research is silencing of tobacco phytoenesaturase (*PDS*) gene using CRISPR/Cas9 technology and obtaining tobacco *PDS* - knockout plants. This work is the first step for further researches on plant genome editing in our laboratory. Subsequently, experiments on CRISPR/Cas9 mediated knock-in approaches in the *PDS* gene of various genes of interest were planned. Tobacco leaf explants was chosen as a model object in our work. CRISPR vectors containing gene of Cas9 protein (pKIR1.1 and pK7WGF2::hCas9) and corresponding gRNA (pICH86966::AtU6p::sgRNA\_PDS) were bought in «AddGene». Phytoenesaturase gene of tobacco was selected as the site for gene knockout experiments. This protein is a key enzyme in carotenoid biosynthesis. Knockout of *PDS* leads to inhibition of carotene synthesis resulting in the formation of decolorized plants. Biolistic bombardment mediated delivery of CRISPR vectors to plant explants on PDS-1000/He System (BioRad) was planned. The following gen gun parameters will be used: gold particles an average size of 0.6 microns, target distance - 6 cm, rupture disk 650 or 900 PSI, vacuum 0.9 bar, the amount of DNA per one shot - 1µL (1 µg/µL). The gold particles will be coated with target vectors mixed with 0.1 µM spermidine and 2.5 M CaCl<sub>2</sub>. Leaf discs will be pre-incubated on MS medium with 90 g/L sucrose for 48 hours before transformation (cultivating with increased osmotic pressure) to improve explants survival.



**Rhizobial microsymbionts of the narrowly endemic *Oxytropis* species growing in Kamchatka possess a set of genes that are associated with T3SS and T6SS secretion systems and can affect the development of symbiosis**

Guro P.<sup>1</sup>, Safronova V.<sup>1</sup>, Sazanova A.<sup>1</sup>, Kuznetsova I.<sup>1</sup>, Belimov A.<sup>1</sup>, Yakubov V.<sup>2</sup>, Chirak E.<sup>1</sup>, Afonin A.<sup>1</sup>, Andronov E.<sup>1</sup>, Tikhonovich I.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology (ARRIAM), St.-Petersburg; <sup>2</sup>Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of the RAS, Vladivostok; <sup>3</sup>Saint Petersburg State University, Department of Genetics and Biotechnology, St.-Petersburg  
Email: polinaguro@gmail.com

A collection of rhizobial strains isolated from root nodules of the narrowly endemic legume species *Oxytropis erecta*, *O. anadyrensis*, *O. kamtschatica* and *O. pumilio* growing on the Kamchatka Peninsula (Russian Federation) was obtained. Analysis of the 16S rRNA gene sequence showed a significant diversity of isolates belonging to the families *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*), *Phyllobacteriaceae* (*Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*) and *Bradyrhizobiaceae* (*Bosea*, *Tardiphaga*). Pairs of taxonomically different strains in various combinations were isolated from some nodules of *Oxytropis* plants. Plant nodulation assays showed that only strains belonging to the genus *Mesorhizobium* (*M. jarvisii*, *M. loti* and *M. huakuii*) could form nitrogen-fixing nodules. The nitrogen-fixing activity of the strains was more associated with the host plant than with the species of strains. The whole genome sequences analysis showed that the strains *M. loti* 582 and *M. huakuii* 583 possessed symbiotic genes necessary for the formation of effective symbiosis and grouped into *Sym*-clusters. In contrast, the strain *T. robiniae* 581 had only a reduced number of fix genes, while the strains *Phyllobacterium* sp. 628 and *R. lusitanum* 629 possessed only individual symbiotic genes, which obviously did not participate in the formation of nodules. It was also stated that the strains *M. loti* 582 and *M. huakuii* 583 had a significantly larger set of genes related to the secretion systems T3SS and T6SS that can affect the host specificity of strains, compared with 6 commercial strains used as reference. These two strains formed nodules of two types (typical elongated and atypical rounded) on *Oxytropis* plants. We suggest that a possible cause of the observed phenomenon is the availability of different nodulation strategies in these strains (dependent and independent of Nod-factors).

Thus, as a result of studying the collection of strains isolated from the narrow endemic species of Kamchatka *Oxytropis*, interesting objects were selected to study the functions of the T3SS and T6SS genes, and their role in the development of rhizobia-legume symbiosis. The prospects of using strains with gene systems for both symbiotic and non-symbiotic nodulation to enhance the efficiency of plant-microbe interactions by expanding the host specificity and increasing the efficiency of nodulation are discussed.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant 16-16-00080). Deposition of strains in the RCAM collection was supported by the Program for the Development and Inventory of Bioresource Collections.

### Study of the agrobacterial protein VirE2 - ssDNA interaction under various conditions for delivery technology development

Gusev Yu.S., Volokhina I.V., Fadeev V.V., Chumakov M.I.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

E-mail: yuran1989@yandex.ru

**Key message.** The effects of DNA length and conditions on the formation of VirE2-ssDNA complexes were studied by dynamic light scattering and electron microscopy. The disordered regions of the VirE2 protein are predicted.

**Keywords:** DNA transport, DNA-protein complexes, VirE2

Investigation on the delivery, protection, and realization of genetic material in animal cells is of great interest. Therefore, the study of the possibility of using ssDNA-binding protein VirE2 agrobacteria for the protection and implementation of ssDNA in the cytoplasm of the host cell in order to create technology for targeted delivery and preservation of ssDNA in target cells.

**Aim:** To study the interaction of the VirE2 agrobacterial protein with ssDNA under various conditions to develop technology for targeted delivery and preservation of ssDNA in target cells.

**Methods:** Using the methods of dynamic light scattering (DLS) and electron microscopy (EM), we studied the effect of DNA length on the formation of VirE2-ssDNA complexes, as well as conditions (pH, t). Using computer programs (PONDR, PrDOS, and DisEMBL), we predicted disordered regions in the VirE2 protein.

**Results:** We predicted three  $\alpha$ -helices at the N-terminus and one  $\alpha$ -helix at the C-terminus in disordered regions of the 3D model of the VirE2 protein. The disordered regions correspond to the non-crystallized part of the protein at the C - (40 a.a.r.) and N- (111 a.a.r.) termini. We examined the implication of disordered sites in formation of 2- and 4-subunit VirE2 complexes. With increasing temperature of co-incubation of VirE2 with ssDNA (from 4 °C to 22 °C), the size of the complexes, as measured by DLS, increased slightly on average: by 28% (VirE2-ssDNA (203 nucleotide)), and by 37% (VirE2-ssDNA (500 nucleotide)), by 33% (VirE2-ssDNA (700 nucleotide)). With an increase in the co-incubation temperature to 37 °C, large aggregates of VirE2-ssDNA complexes formed. Compared to the size observed at room temperature (22 °C and neutral pH), the sizes of the 37 °C complexes were greater by 4–7 times. The length of the VirE2-ssDNA complex (500 nucleotide), as measured by EM, was 140 nm (82% of the estimated ssDNA length). Another complex (700 nucleotide) was 200 nm, i.e., 84% of the estimated ssDNA length (700 nucleotide). The sizes of the VirE2 complexes with ssDNA of various lengths (500, 700 nucleotide) at a co-incubation temperature of 4 °C (pH 7), as determined by DLS (127 and 202 nm, respectively) and EM (140 and 200 nm, respectively), were almost identical.

This work was supported by a grant from the President of the Russian Federation (No. MK-2187.2019.4).

### Изучение взаимодействия агробактериального белка VirE2 с оцДНК при различных условиях для разработки технологии невирусной доставки ДНК в эукариотические клетки

Гусев Ю.С., Волохина И.В., Фадеев В.В., Чумаков М.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

**Аннотация.** Методами динамического рассеяния света и электронной микроскопии исследовано влияние длины ДНК и условий на образование VirE2-оцДНК комплексов. С помощью компьютерных программ предсказаны неупорядоченные области белка VirE2.

**Ключевые слова:** транспорт ДНК, ДНК-белковые комплексы, VirE2

Исследования по доставке, защите и реализации генетического материала в животных клетках представляют большой интерес. Поэтому изучение возможности использования оцДНК-связывающего белка VirE2 агробактерий для защиты и реализации оцДНК в цитоплазме клетки-хозяина с целью создания технологии целевой доставки и сохранности оцДНК в клетках-мишенях.

**Цель:** Изучение взаимодействия агробактериального белка VirE2 с оцДНК в различных условиях для разработки технологии целевой доставки и сохранности оцДНК в клетках-мишенях.

Методами динамического рассеяния света (ДРС) и электронной микроскопии (ЭМ) исследовано влияние длины ДНК на образование VirE2-оцДНК комплексов, а также условий (pH, t). С помощью компьютерных программ (PONDR, PrDOS, и DisEMBL) нами исследованы неупорядоченные (неструктурированные) области белка VirE2.

**Результаты:** Нами предсказано 3  $\alpha$ -спирали (на N-конце) и одна  $\alpha$ -спираль (на C-конце) в неупорядоченных областях 3D модели белка VirE2, не имеющих электронной плотности и соответствующих незакристаллизованной части белка на C- (40 а.о.) и N- (111 а.о.) концах. Мы исследовали влияние неупорядоченных областей на образование 2- и 4-субъединичных комплексов VirE2. С помощью ДРС установлено, что при увеличении температуры совместной инкубации белка VirE2 с оцДНК с 4 0С до 22 0С размеры комплексов в среднем увеличивались незначительно: на 28% (VirE2-оцДНК(203 н.о.)), на 37% (VirE2-оцДНК(500 н.о.)), на 33% (VirE2-оцДНК(700 н.о.)). При увеличении температуры коинкубации до 37 0С образовывались большие агрегаты из комплексов VirE2-оцДНК. По сравнению с комнатной (22 °C и нейтральном pH) размеры комплексов 37 °C увеличивались 4-7 раз. Измеренная методом ЭМ длина комплекса VirE2-оцДНК (500 н.о.) составила 140 нм (82% расчетной длины оцДНК). Длина комплекса VirE2-оцДНК (700 н.о.) составила 200 нм, т.е. 84% расчетной длины оцДНК (700 н.о.). Размеры комплексов белка VirE2 с оцДНК различной длины (500, 700 н.о.) при температуре комплексообразования 4 °C (pH 7), определенные с помощью ДРС (127 и 202 нм соответственно) и ЭМ (140 и 200 нм соответственно), практически идентичны.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-2187.2019.4).

**The effect of the buffer zone on the maize pollen flow in mixed crops**Gusev Yu.S.<sup>1</sup>, Fadeev V.V.<sup>1</sup>, Volokhina I.V.<sup>1</sup>, Zaytsev S.A.<sup>2</sup>, Volkov D.P.<sup>2</sup>, Zuk E.A.<sup>2</sup>, Moiseeva. E.M.<sup>1</sup>, Chumakov M.I.<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia;<sup>2</sup>Russian Research, Design and Technology Institute of Sorghum and Corn Federal State Government-Funded Scientific Institution, Saratov, Russia

E-mail: yuran1989@yandex.ru

**Key message.** Field experiments were carried out to study the effect of the buffer zone length and wind direction on the crossover frequency between the donor and recipient of maize pollen.

**Keywords:** maize, crossbreeding frequency, buffer zones

According to the Federal Law No. 358 (July 3, 2016) from June 2018, the cultivation and testing of GM plants as part of scientific research is allowed for the first time in Russia. Therefore, it is necessary to develop criteria for evaluating the safe co-cultivation of non-GM and GM plant varieties, and in particular maize.

**Aim:** To study of the percentage of maize crosspollination under various factors in the field: the length of the buffer zone between the donor and the recipient of pollen, the wind direction.

**Methods:** Maize hybrid Purpurnyy, obtained from the Genetics Department of Saratov University and hybrid Raduga, obtained from All-Russian Research Institute for Sorghum and Maize "Rossorgo" were grown in 2019 in the Zonalny village, Saratov Region on the experimental field of All-Russian Research Institute for Sorghum and Maize "Rossorgo". Planting scheme: around the pollen donor with purple color of the grains (30 m<sup>2</sup>), a buffer zone was created with the sowing of sudan grass Allegory (330 m<sup>2</sup>). Yellow-colored grain Raduga was planted around the buffer zone (840 m<sup>2</sup>). Percentage of crosspollination was calculated as the ratio of the number of purple grains to the total number of grains on the Raduga cobs with yellow-colored grains. The total number of grains collected and analyzed was 201284.

**Results:** We carried out a model experiment with the using of a buffer zone between the donor and recipient of pollen. The maximum percentage (1,7-2,1%) of purple grains in the yellow-grain recipient was observed in the west and east directions with a buffer zone 3 m wide from the pollen donor. For the southwest direction, with a buffer zone 15 m wide from the pollen donor, the percentage of crosses did not exceed the allowable threshold of 0.9% of the presence of GM plants in the crop. We observed a significant excess of the allowable threshold collected in 3-6 m plots apart from the donor to the west and east when using a buffer zone of 3 m. At farther distances from the donor (6-16 m), the percentage of crosses was in the range of 0.3-0.7% in both directions. When using the buffer zone 15 m, we observed 0,1 and 0,9% (in N-W and SE direction, respectively) of purple grains in the yellow-colored grain of Raduga hybrid pollinated by the pollen donor, which does not exceed the allowable threshold. The reported study was funded by RFBR, project number 18-29-14048mk.

**Влияние буферной зоны на перенос пыльцы кукурузы в смешанных посевах**Гусев Ю.С.<sup>1</sup>, Фадеев В.В.<sup>1</sup>, Волохина И.В.<sup>1</sup>, Зайцев С.А.<sup>2</sup>, Волков Д.П.<sup>2</sup>, Жук Е.А.<sup>2</sup>, Моисеева Е.М.<sup>1</sup>, Чумаков М.И.<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия;<sup>2</sup>ФГБНУ РосНИИСК «Россорго» Саратов, Россия

**Аннотация.** Проведены полевые эксперименты по изучению влияния длины буферной зоны и направления ветра на частоту скрещивания между донором и реципиентом пыльцы кукурузы.

**Ключевые слова:** кукуруза, частота скрещивания, буферные зоны

Согласно действующему с июня 2018 г. ФЗ №358 (от 03.07.2016) в России впервые разрешено выращивание и тестирование ГМ-растений в рамках научных исследований. Поэтому необходимо разработать критерии оценки безопасного совместного выращивания неГМ- и ГМ-сортов растений, и, в частности, кукурузы.

**Цель:** Изучение процента переопыления кукурузы при различных факторах в полевых условиях: длина буферной зоны между донором и реципиентом пыльцы, направление ветра.

**Методы:** Опытные растения кукурузы гибрид Пурпурный (донор), селекции кафедры генетики НИУ СГУ и гибрид Радуга (реципиент) селекции ФГБНУ РосНИИСК "Россорго" выращивали в 2019 г. в п. Зональный Саратовской обл. на опытном поле ФГБНУ РосНИИСК "Россорго". Схема посадки: вокруг донора пыльцы с доминантной пурпурной окраской зерен (30 м<sup>2</sup>) была создана буферная зона с посевом суданской травы Аллегория (330 м<sup>2</sup>). Вокруг буферной зоны была высажена желтозерная кукуруза Радуга (840 м<sup>2</sup>). Процент переопылений рассчитывали, как отношение количества пурпурных зерен к общему числу зерен на початках желтозерного гибрида Радуга. Было собранно и проанализировано 201284 зерен.

**Результаты:** Нами проведен модельный полевой эксперимент с использованием буферной зоны между донором и реципиентом пыльцы. Максимальный процент (1,7-2,1%) пурпурных зерен у желтозерного реципиента гибрида Радуги, опыленного донором пыльцы Пурпурный, наблюдался в направлениях на запад, восток при буферной зоне шириной 3 м от донора пыльцы. Для юго-западного направления при буферной зоне шириной 15 м от донора пыльцы процент скрещиваний не превышал допустимый порог в 0,9 % наличия ГМ-растений в урожае. При использовании буферной зоны в 3 м, мы наблюдали достоверное превышение допустимого порога, собранном на делянках, отстоящих на 3-6 м от донора на запад и восток. На расстояниях 6-16 м от донора процент скрещиваний был в пределах 0,3-0,7% в обоих направлениях. При использовании буферной зоны в 15 м от донора пыльцы, мы наблюдали 0,1 и 0,9% пурпурных зерен у реципиента гибрида Радуги (в С-З и Ю-З направлениях, соответственно), опыленной донором пыльцы (Пурпурный), что даже с учетом совпадающего направления ветра, не превышает допустимого порога.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-14048mk.

### Selection of maize with high haploinducing ability

Gutorova O.V.

Saratov State University, Saratov, Russia

E-mail: olga.gutorova@mail.ru

**Key message.** As a result of long-term selection in the conditions of the Lower Volga Region a series of effective haploinducing lines of maize ZMS-P with haploinduction frequency up to 10% was created.

**Keywords:** haploid induction, haploidy, maize, *Zea mays*

Haploids are the starting material for obtaining of homozygous lines, and in the future, the creation of high-heterosis hybrids of crops. Haploinducing lines are successfully used for mass production of haploids in maize. When maternal plants of other lines pollinating with pollen of such lines, maternal-type haploids are formed in hybrid progeny. Despite the fact that several dozen haploinductors have been created in the world, the work on obtaining new genetically marked, having a high frequency of haploinduction and adapted to different climatic conditions lines is relevant. The aim of the work was the creation of new effective haploinductors adapted to the conditions of the Lower Volga Region.

A series of ZMS-P lines was created on the basis of the collection of the Department of Genetics of Saratov State University. The lines were created using family and individual selection methods over several years. The progeny of the lines themselves were used to facilitate selection for haploinducing ability. Earlier, as a result of cytoembryological analysis, we showed that the haploids formed in the progeny of haploinductors after self-pollination are the result of induction rather than inherited parthenogenesis. Variants with a haploid frequency of 1.3% and higher were used for selection. The frequency of haploidy was determined as the ratio of the number of haploids to the total number of plants in the offspring.

Selected promising haploinducing lines were tested on maternal forms differing in genotype and flowering time (lines, varieties, hybrids, cultivar populations). The presence of dominant marker genes of embryo and endosperm purple color in the ZMS-P line series allows selecting of haploids in dry kernels when they are crossed with maternal forms that have recessive alleles of these genes. Variants that gave a high frequency of haploids during pollination of different maternal forms were selected for reproduction.

Thus, a series of effective haploinducing maize lines ZMS-P was created with haploinduction frequencies up to 10%, marked with dominant coloring genes of the embryo, endosperm, and adult plant and adapted to the arid climate of the Lower Volga Region. These lines can be used to produce haploids in a wide range of maternal forms in the amount necessary for selection work.

### Селекция кукурузы с высокой гаплоиндуцирующей способностью

Гуторова О.В.

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

**Аннотация.** В результате многолетнего отбора в условиях Нижнего Поволжья создана серия эффективных линий-гаплоиндукторов кукурузы ЗМС-П с частотой гаплоиндукции до 10%.

**Ключевые слова:** гаплоиндукция, гаплоидия, кукуруза, *Zea mays*

Гаплоиды являются исходным материалом для получения гомозиготных линий, и в дальнейшем, создания высокогетерозисных гибридов сельскохозяйственных культур. Для массового получения гаплоидов у кукурузы успешно используются линии-гаплоиндукторы. При опылении их пыльцой материнских растений других линий в гибридном потомстве образуются гаплоиды материнского типа. Несмотря на то, что в мире создано несколько десятков гаплоиндукторов, актуальны работы по получению новых генетически маркированных, обладающих высокой частотой гаплоиндукции и адаптированных к различным климатическим условиям линий. Целью работы было создание новых эффективных гаплоиндукторов, приспособленных к условиям Нижнего Поволжья.

На базе коллекции кафедры генетики Саратовского госуниверситета была создана серия линий ЗМС-П. Линии создавались методами семейного и индивидуального отборов в течение нескольких лет. Для облегчения отбора на гаплоиндуцирующую способность использовали потомство самих линий. Ранее, нами в результате цитоэмбриологического анализа было показано, что гаплоиды, образующиеся в потомстве гаплоиндукторов при самоопылении, являются результатом индукции, а не наследуемого партеногенеза. Для отбора использовали варианты с частотой гаплоидии 1,3% и выше. Частоту гаплоидии определяли как соотношение количества гаплоидов к общему количеству растений в потомстве.

Отобранные перспективные линии-гаплоиндукторы тестировали на отличающихся по генотипу и срокам цветения материнских формах (линии, сорта, гибриды, сортопопуляции). Наличие доминантных генов-маркеров пурпурной окраски зародыша и эндосперма у серии линий ЗМС-П позволяет отбирать гаплоиды на сухих зерновках при скрещивании их с материнскими формами, имеющими рецессивные аллели данных генов. Для воспроизводства отбирали варианты, дающие высокую частоту гаплоидов при опылении разных материнских форм.

Таким образом, создана серия эффективных гаплоиндуцирующих линий кукурузы ЗМС-П с частотами гаплоиндукции до 10%, маркированных доминантными генами окраски зародыша, эндосперма и взрослого растения и приспособленных к засушливому климату Нижнего Поволжья. Данные линии можно использовать для получения гаплоидов у широкого спектра материнских форм в необходимом для селекционных работ количестве.

## Studying the effect of mineral nutrition on the antifungal activity of a strain of *Bacillus subtilis*, the producer of an experimental sample of a biological product

Gyrnets A.A., Asaturova A.M., Allakhverdyan V.V.

Federal State-Funded Scientific Institution «All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection», Krasnodar, Russia

E-mail: evgenijgyrnets@mail.ru

**Key message.** The research shows a raise of mineral components bioavailability and increase of antifungal activity of strain-producer *Bacillus subtilis* BZR 336g by addition of citric acid in a nutrient medium.

**Keywords:** citric acid, mineral nutrition, antifungal activity, *Bacillus subtilis*

One of the main problems of the biotechnology of microorganisms is a bioavailability of components of nutrient mediums. The composition of industrial environments includes mineral components, some of which remain in undissolved form, that significantly reduces their digestibility. It is well known that a citric acid forms chelate complexes with metal ions move up into the soluble form (Verhoff, Bauweleers, 2014). In this connection, the aim of our research is to select the necessary concentration of a citric acid and determine its influence on the antifungal activity of the strain *Bacillus subtilis* BZR 336g.

The strain *B. subtilis* BZR 336g, having fungicidal activity, was grown under conditions of periodic cultivation on a nutrient medium with the addition of a gradient of citric acid concentrations. The antifungal activity of metabolites of the culture fluid was studied by method of bioautography. (Sidorova, Asaturova, Homyak, 2019). The antifungal activity of the strain and components of the nutrient medium was studied by method of double cultures. Calculation was carried out on the 5th, 10th, 15th and 20th days. (Netrusov, 2004). In both cases the test-object was *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* Appel & Wollenw. The sizes of the zones of inhibition of the test culture were estimated, and in the method of bioautography is also their number. The manifestation of the fungistatic effect was also taken into the calculation.

It was found that from 10 accounting days of double cultures, the antifungal activity of the strain grown on a nutrient medium with the addition of a citric acid, in comparison with the original composition, increased 1.5 times and remained at that level for 20 days. The bioautographic analysis showed that in the culture liquid, selected from medium with a citric acid, the synthesis of iturin with a fungicidal effect and surfactin which according to our data has a significant fungistatic effect are significantly higher. Based on this, the addition of a citric acid is significantly improved the mineral nutrition of the strain *B. subtilis* BZR 336g and raised its antifungal activity. It allows to recommend a citric acid as the substance in conditions of the periodical cultivation.

## Изучение влияния минерального питания на антифунгальную активность штамма *Bacillus subtilis* – продуцента экспериментального образца биопрепарата

Гырнец А.А., Асатурова А.М., Аллахвердян В.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений», Краснодар, Россия

**Аннотация.** В исследовании показаны повышение биодоступности минеральных компонентов и увеличение антифунгальной активности штамма-продуцента биопрепарата *Bacillus subtilis* BZR 336g путем добавление лимонной кислоты в питательную среду.

**Ключевые слова:** лимонная кислота, минеральное питание, антифунгальная активность, *Bacillus subtilis*

Одной из главных проблем биотехнологии микроорганизмов является биодоступность компонентов питательных сред. В состав промышленных сред входят минеральные компоненты, часть которых остается в нерастворенной форме, что значительно снижает их усваиваемость. Известно, что лимонная кислота образует с ионами металлов хелатные комплексы, переводя их в растворимую форму (Verhoff, Bauweleers, 2014). В связи с этим, цель нашего исследования – подобрать необходимую концентрацию лимонной кислоты и определить ее влияние на антифунгальную активность штамма *Bacillus subtilis* BZR 336g.

Штамм *B. subtilis* BZR 336g, обладающий фунгицидной активностью, выращивали в условиях периодического культивирования на питательной среде с добавлением градиента концентрации лимонной кислоты. Антифунгальную активность метаболитов культуральной жидкости изучали методом биоавтографии (Сидорова, Асатурова, Хомяк, 2019). Антифунгальную активность штамма и компонентов питательной среды – методом двойных культур: учет проводили на 5-е, 10-е, 15-е и 20-е сутки (Нетрусов, 2004). В обоих случаях тест-объектом был *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* Appel & Wollenw. Оценивались размеры зон ингибирования тест-культуры, а в методе биоавтографии еще и их количество. Учитывалось также проявление фунгистатического эффекта.

Обнаружено, что с 10-х учетных суток двойных культур антифунгальная активность штамма, выращенного на питательной среде с добавлением лимонной кислоты, в сравнении оригинальным составом возростала в 1,5 раза и сохранялась на таком уровне на протяжении 20 дней. Биоавтографический анализ показал, что в культуральной жидкости, отобранной из среды с лимонной кислотой, значительно выше синтез итурина, обладающего фунгицидным действием, и сурфактина, который, по нашим данным, обладает значительным фунгистатическим эффектом. Из этого следует, что добавление лимонной кислоты значительно улучшило минеральное питание штамма *B. subtilis* BZR 336g и повысило его антифунгальную активность. Это позволяет рекомендовать лимонную кислоту в качестве субстрата в условиях периодического культивирования.

1. Verhoff F. H., Bauweleers H. Citric Acid / Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry – Wiley-VCH, 2014. – P. 5.

2. Сидорова Т.М., Асатурова А.М., Хомяк А.И. и др. Выделение и характеристика антигрибных метаболитов штаммов *Bacillus subtilis* BZR 336g и *Bacillus subtilis* BZR 517 модифицированным методом биоавтографии / Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54. № 1, с. 178-185

3. Нетрусов А. И. Микробиология: учеб. пособие / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова – М.: Академия, 2009. 352 с.



### Development of fluorescent protein-marked strains of *Bacillus subtilis*

Ibragimov A.<sup>1,2</sup>, Baymiev An.<sup>1,2</sup>, Lastochkina O.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Center of RAS, Ufa, Russia; <sup>2</sup>Bashkir State University, Ufa, Russia; <sup>3</sup>Bashkir Research Institute of Agriculture of the Ufa Federal Research Center of RAS, Ufa, Russia  
E-mail: waywardprowler@gmail.com

**Key message.** We obtained constructs pHT01-GFP and pHT43-RFP. Recombinant plasmids were transferred into endophytic *Bacillus subtilis* (strains 10-4 and 26D).

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, fluorescent proteins, genetic constructs, bacterial transformation

Endophytic *Bacillus subtilis* are wild-type beneficial bacteria with antifungal, growth stimulation and anti-stress physiological programs induction activities [2,3]. However, the mechanisms of the formation of symbiotic relationships between plants and endophytic strains of *Bacillus subtilis* are not completely understood, further research in this branch required. The goal of this research was to obtain the strains of *B. subtilis* 10-4 and 26D marked with the genes of green and red fluorescent proteins (*gfp*, *rfp*). The genes of green fluorescent protein (*gfp*) and red fluorescent protein (*rfp*) were amplified and then digested with BamHI and cloned to pHT01 and pHT43 plasmids. Recombinant plasmids were extracted from *Escherichia coli* and transferred into *B. subtilis* (strains 10-4 and 26D). Transformants were selected on LB plates containing 25 µg·mL<sup>-1</sup> chloramphenicol (Cm) [1]. The obtained constructs of strains 10-4 and 26D will allow revealing the nature of the symbiotic relationships between *B. subtilis* strains 10-4, 26D and host-plants and reveal the mechanisms of symbiotic relationships formation between endophytic strains and host-plants, the localization of bacteria in plant tissues, monitoring the bacterial circulation in the plant organism, and pathways of the penetration of the bacteria into the host-plants.

This research was funded by the grant of the President of the Russian Federation (№ MK-643.2019.11).

- 1) Zhang Z., Ding Z.-T., Shu D., Luo D., Tan H. 2015. Development of an efficient electroporation method for iturin A-producing *Bacillus subtilis* ZK. Int. J. Mol. Sci. 16(4):7334-7351. doi: 10.3390/ijms16047334
- 2) Abd-Allah E.F., Alqarawi A.A., Hashem A., Radhakrishnan R., Al-Huqail A.A., Al-Otibi F.O.N., Malik J.A., Alharbi R.I., Egamberdieva D. 2018. Endophytic bacterium *Bacillus subtilis* (BERA 71) improves salt tolerance in chickpea plants by regulating the plant defense mechanisms. J. Plant Inter. 13(1):37-44. doi: 10.1080/17429145.2017.1414321
- 3) Deng Y., Chen H., Li C., Xu J., Qi Q., Xu Y., Zhu Y., Zheng J., Peng D., Ruan L., Sun M. 2019. Endophyte *Bacillus subtilis* evade plant defense by producing lantibiotic subtilomycin to mask self-produced flagellin. Com. Biol. 2:368. doi: 10.1038/s42003-019-0614-0



### Symbiosis of soil and rhizosphere bacteria

Ibragimova S.A., Malafeeva K.A.

National Research Mordovia State University, Saransk, Russia

E-mail: ibragimova-s@yandex.ru

**Key message.** The presence of symbiosis between different taxonomic groups of soil and rhizosphere bacteria is shown. In the mixed population, a high titer of active cells and the preservation of antagonistic activity against the phytopathogen were noted.

**Keywords:** consortium of microorganisms, biocompatibility, multifunctional properties of bacteria

The bacteria that inhabit the soil not only provide access to nutrients to plants, but also protect them from phytopathogens, stimulate growth, and are also capable of biodegradation of pesticides.

Bacteria *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, and *Rhodococcus* are potential targets of agrobiotechnology. It is important to develop biological preparations not only based on a single strain of the above-mentioned species, but also using their cocultivation.

The biocompatibility of different taxonomic groups bacteria was studied in order to further develop a complex biological product with a wide range of functional properties.

We studied: 3 strains of *Pseudomonas putida* and *Rhodococcus erythropolis*, which are characterized by the ability to biodegrade polyaromatic compounds and petroleum products; *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aureofaciens*, which exhibit fungicidal and growth-stimulating properties; *Azotobacter vinelandii*, which is capable of nitrogen fixation and has a protective effect against phytopathogenic fungi. Cultivation of bacteria was carried out on molasses and mineral media. The titer of viable cells was periodically determined. The presence of antagonistic activity of a microorganism's consortium was determined by lysis of the fungal mycelium of the phytopathogen *F. culmorum*.

When all *Pseudomonas* strains were cultivated on the M9 mineral medium the titer of active cells was  $18 \cdot 10^{10}$  CFU / ml. During adding *Bacillus* sp. to *Pseudomonas* consortium the titer value increased by 2 times, which indicates the biocompatibility of these bacteria. In a mixed population of all the studied bacteria, the titer of active cells was minimal, but within the limits of the requirements for biologic preparation ( $20 \cdot 10^9$  CFU/ml).

When bacteria were cultured in a molasses medium, the number of viable cells was  $90 \cdot 10^{10}$  CFU / ml.

When the microbial consortium was co-cultured with phytopathogens, hyphae bloating and mycelium destruction were observed at an early stage, which indicates the preservation of antagonistic properties.

The results can be used in the development in the preparation of a complex biological product.

This work was supported by the RFBR grant № 18-416-130003\19

### Симбиоз почвенных и ризосферных бактерий

Ибрагимова С.А., Малафеева К.А.

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Саранск, Россия

**Аннотация.** Показано наличие симбиоза между почвенными и ризосферными бактериями разных таксономических групп. В смешанной популяции отмечен высокий титр активных клеток и сохранение антагонистической активности в отношении фитопатогена.

**Ключевые слова:** консорциум микроорганизмов, биосовместимость, полифункциональные свойства бактерий

Бактерии, населяющие почву, не только обеспечивают доступ питательных веществ растениям, но и защищают их от фитопатогенов, стимулируют рост, а также способны к биodeградации пестицидов.

Бактерии *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Rhodococcus* являются потенциальными объектами агrobiотехнологии. Интерес представляет разработка препаратов не только на основе одного штамма вышеупомянутых родов, но и с использованием их совместного культивирования.

В работе исследовалась биосовместимость бактерий разных таксономических групп с целью дальнейшей возможности создания комплексного биопрепарата с широким спектром функциональных свойств.

Были исследованы 3 штамма *Pseudomonas putida* и *Rhodococcus erythropolis*, характеризующиеся способностью к биodeградации полиароматических соединений и нефтепродуктов. Бактерии *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas aureofaciens*, проявляющие фунгицидные и ростостимулирующие свойства. Бактерия *Azotobacter vinelandii*, способная к азотификсации и обладающая фунгизащитным эффектом. Глубинное культивирование культур проводили на меласной и минеральной среде. Периодически определяли титр жизнеспособных клеток. Наличие антагонистической активности консорциума микроорганизмов определяли по лизису грибного мицелия фитопатогена *F. culmorum*.

При культивировании на минеральной среде М9 всех исследуемых штаммов псевдомонад титр активных клеток составил  $18 \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл. При внесении в данный консорциум бацилл значение титра увеличилось в 2 раза, что свидетельствует о биосовместимости данных бактерий. В смешанной популяции всех исследуемых бактерий титр активных клеток был минимальным, но в пределах требований, предъявляемым к биопрепаратам ( $20 \cdot 10^9$  КОЕ/мл).

При совместном культивировании бактерий на меласной среде количество жизнеспособных клеток составило  $90 \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл.

При культивировании микробного консорциума с фитопатогеном уже на ранних сроках наблюдалось вздутие гиф, разрушение мицелия, что свидетельствует о наличии антагонистических свойств.

Результаты могут быть использованы при разработке получения биопрепарата комплексного действия.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-416-130003.

## Methodological approaches to agrobacterium-mediated transformation of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench)

Ilina E.L., Kiryushkin A.S., Guseva E.D., Demchenko K.N.

Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

E-mail: [eilina@binran.ru](mailto:eilina@binran.ru)

**Key message.** The method of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of buckwheat has been established; composite plants have been obtained. The distribution of the cellular response to auxin by reporter proteins with different maturation times coincides.

**Keywords:** common buckwheat, agrobacterium-mediated transformation, *Agrobacterium rhizogenes*, composite plants, auxin  
One of the rapid approaches for studying the hormonal and molecular mechanisms of plant development is to obtain “composite plants”. The regulatory interactions between the root system and shoot are preserved in composite plants, while the transgenic roots carry the T-DNA insert of the vector transformed into the cells of the *Agrobacterium rhizogenes* strain. The buckwheat is an important crop in which, like in Cucurbits, lateral roots are initiated in the apical meristem of the parental root [Ilina et al., 2018]. Methods of *A. rhizogenes*-mediated transformation of buckwheat are described that lead to the establishment of hairy root cultures, but there are no reports on development of the buckwheat composite plants.

The aim of this study was to establish the method for development of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) composite plants.

The agrobacterium-mediated transformation technique of Cucurbits [Ilina et al., 2012] has been adapted for buckwheat. Hulled seeds without heat treatment of the “Ballada” buckwheat c.v. were surface sterilized. The wounded bases of the hypocotyls of 4-day-old seedlings were inoculated with *A. rhizogenes* strain R1000, which is virulent for *Fagopyrum tataricum* [Thwe et al., 2016]. Agrobacterial cells harboured vectors 242 pKGW-DR5::mNeonGreen-H2B or 242 pKGW-DR5::mRuby3-H2B for studying the distribution of the cellular response to auxin. Both vectors contained one of the reporter genes, mNeonGreen or mRuby3, under the control of auxin-sensitive DR5 promoter; as well as pAtUBQ10::DsRED cassette for screening of transgenic roots. Proteins encoded by reporter genes differ in maturation time: mNeonGreen 10-30 min, mRuby 136 min. The presence of target genes insertion in transgenic roots was confirmed by PCR.

Composite plants of buckwheat were obtained. The spatial distribution of the cellular response to auxin was analyzed in transgenic roots. The tissue pattern of response to auxin coincided with that shown for *Cucurbitaceae* plants: maxima of response to auxin were localized in the region of the initial cells of the cell files, as well as in developing lateral roots primordia. The pattern of cellular response to auxin by mNeonGreen and mRuby3 reporter proteins with different maturation times did not differ. The research was supported by the RFBR grant 20-016-00233-a.

## Методические подходы к агробактериальной трансформации гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum* Moench)

Ильина Е.Л., Кирюшкин А.С., Гусева Е.Д., Демченко К.Н.

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Адаптирована методика агробактериальной трансформации (*A. rhizogenes*) гречихи посевной, получены композитные растения. Распределение клеточного ответа на ауксин по белкам-репортерам с разным временем созревания совпадает.

**Ключевые слова:** гречиха посевная, агробактериальная трансформация, *Agrobacterium rhizogenes*, композитные растения, ауксин

Одним из экспресс-подходов для изучения гормональных и молекулярно-генетических механизмов развития растений является получение «композитных растений», которые сохраняют регуляторные связи между корневой системой и побегом, при этом трансгенные корни несут вставку Т-ДНК вектора, введённого в клетки штамма *Agrobacterium rhizogenes*. Гречиха посевная является важной сельскохозяйственной культурой, у которой, как и у Тыквенных, боковые корни закладываются в апикальной меристеме родительского корня [Ilina et al., 2018]. Для гречихи описаны методики трансформации *A. rhizogenes*, приводящие к образованию культуры бородатых корней, но отсутствуют данные о получении композитных растений.

Целью данной работы было адаптировать методику получения композитных растений для гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum* Moench).

Методика агробактериальной трансформации Тыквенных [Ilina et al., 2012] была адаптирована для гречихи. Неочищенные семена гречихи сорта «Баллада» без тепловой обработки подвергали поверхностной стерилизации. Основание гипокотыля 4-х дневных проростков инокулировали штаммом R1000 *A. rhizogenes*, который вирулентен для гречихи татарской [Thwe et al., 2016]. Клетки агробактерий содержали вектор для изучения распределения клеточного ответа на ауксин 242 pKGW-DR5::mNeonGreen-H2B или 242 pKGW-DR5::mRuby3-H2B. Оба вектора содержали один из репортерных генов –mNeonGreen или mRuby3 – под контролем ауксин-чувствительного промотора DR5, а также скрининговую кассету pAtUBQ10::DsRED для отбора трансгенных корней. Белки, кодируемые репортерными генами, отличаются по времени созревания: mNeonGreen 10-30 мин, mRuby 136 мин. Наличие вставки целевых генов в трансгенных корнях было подтверждено методом ПЦР.

Были получены композитные растения гречихи. В трансгенных корнях проанализировано пространственное распределение клеточного ответа на ауксин. Тканевой паттерн ответа на ауксин совпадал с тем, который был показан для растений семейства Тыквенные: максимумы ответа на ауксин были локализованы в области инициалей рядов клеток, а также в развивающихся примордиях боковых корней. Паттерн клеточного ответа на ауксин по репортерным белкам mNeonGreen и mRuby3 с разным временем созревания не отличался.

Исследования поддержаны грантом РФФИ 20-016-00233-a.

**Finding of regulatory codes in 5'-UTR of *A. thaliana* mRNAs by polysome profiling method**Kabardaeva K.V.<sup>1</sup>, Mustafaev O.N.<sup>2</sup>, Deineko I.V.<sup>1</sup>, Suhorukova A.V.<sup>1</sup>, Goldenkova-Pavlova I.V.<sup>1</sup><sup>1</sup>Tmiryazev Institute of Plant Physiology, RAS, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Genetic Resources Institute, ANAS, Baku, Azerbaijan;<sup>3</sup>All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

E-mail: kabardaewa@yandex.ru

**Key message.** The polysome profiling method was used to separate mRNAs depending on their loading by ribosomes into polysomal and monosomal fractions. Pools separation of such mRNAs and analysis of transcripts (mRNAs) which are associated with each mRNA pool due to RNA sequencing allowed to get an idea of the translational efficiency of individual mRNAs. Moreover, subsequent *in silico* analysis make possible searching of regulatory contexts in the 5'-UTR of plant *A. thaliana*, which may be potentially important for efficient translation of mRNA.

**Keywords:** translation, 5' - untranslated region, nucleotide composition, expression efficiency

According to current opinion, the 5'-untranslated region (5'-UTR) is a key regulatory element which determines the efficiency of heterologous gene expression at the translation initiation stage. Therefore, we conducted researches aimed at effective regulatory codes finding in 5'-UTR. In this study, we applied the polysome profiling method, which is based on the fact that translationally resting mRNAs are associated with single ribosomes (monosomes), while actively translated mRNAs are associated with multiple ribosomes (polysomes). Pools separation of such mRNAs in the sucrose gradient and subsequent analysis of transcripts (mRNAs) which are associated with each mRNA pool due to RNA sequencing allowed to get an idea of the translational efficiency of individual mRNAs. Furthermore, a subsequent *in silico* analysis that applies a new algorithm make possible searching of regulatory contexts in the 5'-UTR of plant *A. thaliana*. The results of the analysis suggest that pyrimidines, including pyrimidine di-nucleotides and five nucleotide motifs, are typical for 5'-UTR mRNAs with high translational efficiency, while purines, purine dinucleotides, and purine motifs of five nucleotides in length are representative parameter for 5'-UTR mRNA with medium and low translational efficiency.

The work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 18-14-00026).

**Поиск регуляторных кодов в 5'-НТО мРНК растений *A. thaliana* с использованием метода профилирования полисом**Kabardaeva K.V.<sup>1</sup>, Мустафаев О.Н.<sup>2</sup>, Дейнеко И.В.<sup>1</sup>, Сухорукова А.В.<sup>1</sup>, Голденкова-Павлова И.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва; <sup>2</sup> Институт генетических ресурсов Национальной академии наук Азербайджана, Баку, Азербайджан; <sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии», Москва

**Аннотация.** Метод профилирования полисом применили для разделения мРНК в зависимости от их загрузки рибосомами на полисомные и моносомные фракции. Разделение пулов таких мРНК и анализ транскриптов (мРНК), ассоциированных с каждым пулом мРНК, за счет секвенирования РНК, позволили получить представление о трансляционной эффективности индивидуальных мРНК, а последующий *in silico* анализ – провести поиск регуляторных контекстов в 5'-области мРНК растений *A. thaliana*, которые могут быть потенциально важными для эффективной трансляции мРНК.

**Ключевые слова:** трансляция, 5'-нетранслируемая область, нуклеотидный состав, эффективность экспрессии

Согласно текущему мнению 5'-нетранслируемая область (5'-НТО) является ключевым регуляторным элементом, определяющим эффективность экспрессии гетерологичного гена на этапе инициации трансляции. Поэтому мы провели исследования, направленные на поиск эффективных регуляторных кодов в 5'-НТО. В этом исследовании мы применили метод профилирования полисом, который основан на том, что трансляционно покоящиеся мРНК связаны с одиночными рибосомами (моносомами), в то время как активно транслируемые мРНК связаны с множеством рибосом (полисомы). Разделение двух пулов таких мРНК в градиенте сахарозе и последующий анализ транскриптов (мРНК), ассоциированных с каждым пулом мРНК, за счет секвенирования РНК, позволили получить представление о трансляционной эффективности индивидуальных мРНК, а последующий *in silico* анализ с использованием нового алгоритма – провести поиск регуляторных контекстов в 5'-области мРНК растений *A. thaliana*. Результаты проведенного анализа позволили предположить, что пиримидины, в том числе пиримидиновые динуклеотиды и мотивы длиной 5 нуклеотидов характерны для 5'-НТО мРНК с высокой трансляционной эффективностью, тогда как пурины, пуриновые динуклеотиды, а также пуриновые мотивы длиной 5 нуклеотидов являются характерным параметром для 5'-НТО мРНК со средней и низкой трансляционной эффективностью.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 18-14-00026.

## Plant biological control agents as the basis for remediation and stabilization of agrobiocenoses

*Kalamiyets E.I.*

SRPA «Chemical Synthesis and Biotechnologies», Institute of Microbiology of NAS Belarus, Minsk, Belarus

*E-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by*

**Key message.** *New approaches to diagnostics of plant diseases, development of composition and high-tech commercial forms of biopesticides were proposed for enhancement of their efficiency in remediation and stabilization of agrobiocenoses.*

**Keywords:** *agrobiocenoses, biopesticides, diagnostics, microorganisms-antagonists*

Application of biopreparations with phytoprotective action opens new frontiers to alleviate pesticide stress on agrobiocenoses, to yield prime-grade eco-safe farm products, to diminish dependence of agromanufacturers from supply of foreign chemicals. Theoretical and practical basis for design of biopesticides is the selection of superactive strains-antagonists and entomopathogens, elucidation of the type of metabolites showing antimicrobial and insecticidal activities, clarification of mechanisms governing antagonistic activity of introduced cultures, optimization of fermentation processes, elaboration of high-tech commodity forms of biopreparations. Both traditional selection methods and genome-editing techniques improving screening efficiency dozen- and hundred-fold are used to derive strains with elevated biological activity, growth rate, genetic stability, low sensitivity to biocenotic factors and eco-friendliness. Biopesticides derived from pre-selected microbial antagonists, like Fruitin (to control pathologies of berry and fruit cultivars), Phytoprotectin (to suppress diseases of vegetable crops), Beta-protectin (to counter clamp rot of sugar beet), EcoGreen (to combat pathologies of vegetables and green spice cultures), Baciturin, Bactosol, Xantrel (to oppose pests and infections of potato and vegetable crops), Multiphage (to curb bacterial diseases of vegetable and fruit varieties), Polybact (to normalize soil microbial cenoses) occupied their appropriate niche at the home market and possess a vast export potential. The key significance of elaborating microbial products for national economy is determined by low-cost manufacturing technology and cheap prices. The huge contribution into upgrading efficiency of biological control agents is made by the practiced diagnostics of phytopathogenic species using up-to-date molecular-genetic identification methods (PCR, real-time PCR, multiplex PCR). New approaches in strategy of biopesticide elaboration will be aimed at perfecting the formulas and prolonging the storage terms of the developed high-tech commodity forms of the products.

## Биологические средства защиты растений как основа оздоровления и стабилизации агробиоценозов

*Коломиец Э.И.*

ГНПО «Химический синтез и биотехнологии», Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

**Аннотация.** *Предложены новые подходы к диагностике заболеваний растений, разработке композиционного состава и высокотехнологичных товарных форм биопестицидов для повышения эффективности их действия как агентов оздоровления и стабилизации агробиоценозов.*

**Ключевые слова:** *агробиоценозы, биопестициды, диагностика, микроорганизмы-антагонисты.*

Использование биопрепаратов с фитозащитным действием открывает перспективы снижения пестицидной нагрузки на агробиоценозы, позволяет получить высококачественную экологически чистую сельскохозяйственную продукцию, уменьшает зависимость агропромышленного комплекса от импорта агрохимикатов. Теоретической и практической основой создания биопестицидов является селекция высокоактивных штаммов микроорганизмов-антагонистов и энтомопатогенов, выяснение природы метаболитов с антимикробной и энтомоцидной активностями, установление механизмов антагонистического действия потенциальных интродуцентов, оптимизация ферментационных процессов, разработка высокотехнологичных товарных форм. Для получения штаммов с высокой биологической активностью, скоростью роста, генетической стабильностью, низкой чувствительностью к биоценотическим факторам и безвредностью для окружающей среды используются как традиционные методы селекции, так и методы «редактирования» генома, повышающие эффективность селекционных работ в десятки и сотни раз. Разработанные на основе отселектированных штаммов микроорганизмов-антагонистов биопестициды Фрутин (для контроля возбудителей болезней ягодных и плодовых культур), Фитопротектин (для защиты овощных культур от болезней), Бетапротектин (для борьбы с кагатной гнилью сахарной свеклы), Экогрин (для защиты овощных и зеленных культур от болезней), Бацитурин, Бактосол и Ксантрел (для защиты картофеля и овощных культур от вредителей и болезней), Мультифаг (для борьбы с бактериозами овощных и плодовых культур), Полибакт (для оздоровления микробиоценозов почв) нашли свою нишу на внутреннем рынке и имеют экспортный потенциал. Экономическая значимость для республики разработки микробных препаратов связана с малозатратной технологией их получения и низкой стоимостью. Большой вклад в повышение эффективности биологических средств защиты растений вносит практикуемая нами диагностика фитопатогенных микроорганизмов с использованием современных молекулярно-генетических методов (ПЦР, ПЦР в реальном времени, мультиплексная ПЦР). Новые подходы в разработке биопестицидов связаны с совершенствованием их композиционного состава и увеличением сроков хранения путем создания высокотехнологичных товарных форм.

### The taxonomic composition of the microbial community of the southern chernozem when introducing plant substrates and their destructors

Kameneva I.<sup>1</sup>, Melnichuk T.<sup>1</sup>, Abdurashitov S.<sup>1</sup>, Andronov E.<sup>2</sup>, Yakubovskaya A.<sup>1</sup>, Gritchkin M.<sup>1</sup>, Prikhodko A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSBSI “Research Institute of Agriculture of Crimea”, Simferopol; <sup>2</sup>FSBIS “All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology”, St. Petersburg, Russia

E-mail: irina.kameneva.7@mail.ru

**Key message.** The influence of green manure (phacelia), wheat straw, and cellulolytic association on the taxonomic structure of chernozems southern in the steppe zone of the Crimea was studied. Changes in the proportion among representatives of 11 phyla, 14 bacteria, and 2 archaea were established.

**Keywords:** chernozems southern microbiome, phacelia green manure, wheat straw, cellulolytic association of microorganisms

Microbial communities of the soil are the most important factors in the transformation of organic compounds, nutrients cycle, increasing soil fertility and self-purification. To improve the efficiency of these processes, research aimed at managing the functional and taxonomic structure of the microbiome by introducing plant mass and active microorganisms for their destruction is relevant and promising.

The purpose of the research was to determine the taxonomic composition of the microbiome of the chernozems southern after the addition of green manure and straw, as well as their destructors.

In the stationary three-field short crop rotation located in the Department of the field crops of the FSBSI “Research Institute of Agriculture of Crimea” (central part of the steppe Crimea), we studied the taxonomic composition of the microbiome of chernozems southern low humus on loesslike light clays during the incorporation of phytomass of phacelia (*Phacelia tanacetifolia* Bent.) and winter wheat (*Triticum aestivum* L.). We processed this phytomass with the cellulolytic association (CA) of microorganisms in the laboratory. The taxonomic composition of the soil microbiome was determined using high-throughput sequencing of 16S rRNA gene libraries.

Assessment of the microbiome of the chernozems southern showed changes among 11 phyla of fungi, of which five exceeded 1%; 14 phyla of bacteria, of which 6 were dominant; the same for *Thaumarchaeota* – representative of archaea.

The dominant observed eukaryotes were *Ascomycota* phylum. Their proportion was in the range of 30.0-45.1% depending on the introduced plant substrates and CA. The increase in the share of *Ascomycota* was more significant after straw incorporation, namely 4.4% more than in the control variant. In case of phacelia incorporation, the excess was 1.8% only. Among minor eukaryotes, *Cercozoa* has been identified, the most common representatives of which are commonly found in nutrient-rich soils.

Among the major representatives of bacteria, three phyla were identified: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Proteobacteria*, which respond by increasing the proportion when phacelia and straw were incorporated (both without treatment and inoculated with CA).

Thus, the influence of green manure (phacelia), wheat straw, and cellulolytic association of microorganisms on the taxonomic structure of chernozems southern in the steppe zone of the Crimea was established. The work was carried out within the framework of the state task of fundamental research No. 0834-2019-0005 and supported by RFBR grant r\_a No.19-416-910003.

### Таксономический состав микробного сообщества чернозема южного при внесении растительных субстратов и их деструкторов

Каменева И.А.<sup>1</sup>, Мельничук Т.Н.<sup>1</sup>, Абдурашитов С.Ф.<sup>1</sup>, Андронов Е.Е.<sup>2</sup>, Якубовская А.И.<sup>1</sup>, Гритчин М.В.<sup>1</sup>, Приходько А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», Симферополь; <sup>2</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»; Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Изучено влияние сидерата (фацелия), соломы пшеницы и целлюлолитической ассоциации на таксономическую структуру чернозема южного степной зоны Крыма. Установлены изменения доли среди представителей 11 фил грибов, 14 бактерий и 2 архей.

**Ключевые слова:** микробиом чернозема южного, сидерат фацелия, солома пшеницы, целлюлолитическая ассоциация микроорганизмов

Микробные сообщества почвы являются важнейшим фактором трансформации органических соединений, круговорота биогенных элементов, повышения плодородия и самоочищения почвы. Для повышения эффективности этих процессов актуальны и перспективны исследования, направленные на управление функциональной и таксономической структурой микробиома посредством внесения растительной массы и активных микроорганизмов для их деструкции.

Цель исследований – установить таксономический состав микробиома чернозема южного при внесении сидерата и соломы и их деструкторов.

В стационарном трехпольном коротко-ротационном полевом севообороте отделения полевых культур ФГБУН «НИИСХ Крыма», расположенного в центральной части степного Крыма, исследовали таксономический состав микробиома чернозема южного малогумусного на лессовидных легких глинах при заделке фитомассы фацелии (*Phacelia tanacetifolia* Bent.) в фазу цветения и соломы озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), обработанных собранной в лабораторных условиях целлюлолитической ассоциацией микроорганизмов (ЦА). Таксономический состав микробиома почвы устанавливали с использованием высокопроизводительного секвенирования библиотек гена 16S рРНК.

Оценка микробиома чернозема южного показала изменения среди 11 фил грибов, из которых доля пяти превышала 1 %, и 14 фил бактерий, из них 6 доминирующих, как и *Thaumarchaeota* – представителей архей.

Наиболее высокое представительство эукариот отмечено у филы *Ascomycota*, где доля находилась в пределах 30,0–45,1 %, в зависимости от внесенных растительных субстратов и ЦА. Увеличение доли *Ascomycota* было более существенным при внесении соломы – на 4,4 % выше контроля, чем при заделке фацелии, где превышение составило 1,8 %. Среди минорных эукариотов выявлена *Cercozoa*, наиболее распространенные представители которой обычно встречаются в богатых питательными веществами почвах.

Среди мажорных представителей бактерий обозначены три филы: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*, реагирующие увеличением доли при внесении фацелии и соломы, как без обработки, так и инокулированных ЦА.

Таким образом, установлено влияние сидерата (фацелия), соломы пшеницы и целлюлолитической ассоциации микроорганизмов на таксономическую структуру чернозема южного степной зоны Крыма.

Работа выполнена в рамках государственного задания фундаментальных исследований № 0834-2019-0005 и при поддержке гранта РФФИ р\_a №19-416-910003.

**Intracellular transformations in bacteria as a response to external factors: molecular spectroscopic characterization**

Kamnev A.A., Tugarova A.V.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

E-mail: aakamnev@ibppm.ru; a.a.kamnev@mail.ru

**Key message.** Examples are considered of using molecular spectroscopy techniques (Fourier transform infrared, Raman and Mössbauer spectroscopies) in monitoring the responses of bacteria to stresses.

**Keywords:** molecular spectroscopic analysis, Fourier transform infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, Mössbauer spectroscopy, *Azospirillum*

The use of molecular spectroscopy techniques in the analysis of various structural features and composition of a wide variety of objects in recent decades has been steadily developing in line with the development of electronics and instrumentation in laboratories both in scientific institutions and in industrial enterprises. In the field of life sciences, molecular spectroscopy techniques are particularly useful as they allow one to study at the molecular level (often in the mode of non-destructive analysis) not only the structure and composition of biomaterials, but also various intermolecular interactions, the importance of which cannot be overestimated for the functioning of organisms. In this lecture, some examples will be considered of applications, primarily, of vibrational spectroscopy techniques (Fourier transform infrared spectroscopy in its various methodological variants, Raman spectroscopy) [1] for studying the responses of bacteria (using the examples of azospirilla) to external factors, as well as of Mössbauer (nuclear gamma-resonance) spectroscopy [2,3] which allows, in particular, the state of intracellular iron, one of the most important trace elements, and its changes to be monitored *in situ*. The possibilities of monitoring the accumulation and studying the intracellular properties of reserve biopolymers (poly-3-hydroxybutyrate in bacteria of the genus *Azospirillum*) and their changes during growth of bacteria under various stresses will be demonstrated. One of the interesting novel effects is the change in the state of intracellular iron found in azospirilla in the course of drying (lyophilization) of cellular biomass [2], which may be a natural strategy to avoid damage to cells in the dormant state (dried living biomass) as a result of redox transformations (e.g., the Fenton reaction) in the presence of cellular Fe(II).

This work was supported in part by The Russian Foundation for Basic Research (grants 17-08-01696-a, 19-13-50160).

**Внутриклеточные превращения у бактерий как отклик на внешние воздействия: молекулярно-спектроскопическая характеристика**

Камнев А.А., Тугарова А.В.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

**Аннотация.** Рассмотрены примеры использования методов молекулярной спектроскопии (инфракрасная фурье-спектроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния, мёссбауэровская спектроскопия) для изучения откликов бактерий на стрессы.

**Ключевые слова:** молекулярно-спектроскопический анализ, инфракрасная фурье-спектроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния, мёссбауэровская спектроскопия, *Azospirillum*

Использование методов молекулярной спектроскопии в анализе различных структурных особенностей и состава самых разнообразных объектов в последние десятилетия стабильно развивается благодаря развитию электроники и приборного оснащения лабораторий как в научных организациях, так и на промышленных предприятиях. В области наук о жизни методы молекулярной спектроскопии особенно полезны тем, что позволяют на молекулярном уровне (часто и в режиме неразрушающего анализа) не только изучать структуру и состав биоматериалов, но и отслеживать различные межмолекулярные взаимодействия, важность которых для функционирования организмов невозможно переоценить. В настоящей лекции будут рассмотрены некоторые примеры использования в первую очередь методов колебательной спектроскопии (инфракрасная фурье-спектроскопия в ее различных методологических вариантах, спектроскопия комбинационного рассеяния) [1] для исследования откликов бактерий (на примере азоспирилл) на внешние воздействия, а также метод мёссбауэровской (ядерной гамма-резонансной) спектроскопии [2,3], позволяющий, в частности, контролировать *in situ* состояние внутриклеточного железа, одного из важнейших микроэлементов, и его изменения. Будут продемонстрированы возможности мониторинга накопления и изучения внутриклеточных свойств резервных биополимеров (поли-3-гидроксибутирата у азоспирилл) и их изменений в процессе роста бактерий под воздействием различных стрессов. Одним из интересных новых эффектов является обнаруженное у азоспирилл изменение состояния внутриклеточного железа в процессе высушивания (лиофилизации) клеточной биомассы [2], что может быть связано с необходимостью предотвращения повреждения клеток в dormantном состоянии (высушенная живая биомасса) в результате редокс-превращений типа реакции Фентона в присутствии клеточного Fe(II).

Работа выполнена при частичной поддержке грантами РФФИ 17-08-01696-a, 19-13-50160.

1. Kamnev A.A. *et al.* Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. 193 (2018) 558-564.
2. Kamnev A.A. *et al.* Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. 229 (2020) 117970.
3. Kamnev A.A., Tugarova A.V. Talanta 174 (2017) 819-837.

**Biochar influence on antibiotic resistance genes abundance in the manure derived composts**

Karamova K., Danilova N., Galitskaya P.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

E-mail: 89625725848@yandex.ru

**Key message.** Composting chicken droppings with the addition of biochar and an antibiotic led to a decrease in the concentration of oxytetracycline on the 28th day and an increase in the amount of the resistant *tet(X)* gene.

**Keywords:** biochar, antibiotic resistance genes, composting

Antibiotic resistance is one of the most important and modern public health problems, as it reduces the efficiency of infections treatments. The reason of resistance wide spreading is use of antibiotics, especially in cattle and poultry farming, for disease prevention and growth promotion. To remove the antibiotic resistance genes (ARG) from the cattle and poultry manures, composting may be used. However, this method has own limitations, and different improvements such as biochar addition to composts are recommended to decrease the number of ARG.

In the present study, we analyzed the potential of biochar to reduce ARG number in the process of chicken manure composting. Five composting mixtures of chicken manure with sawdust (1:2) were used in the experiment conducted in 200L rotating machines for 120 days: control (K), with 15% of biochar (B), with additional 50, 150 and 300 mg kg<sup>-1</sup> of oxytetracycline (B50, B150, B300). Biochar was prepared from chicken manure at 400 °C and 3 h residence time.

It was revealed that composting main parameters such as temperature profile and dissolved organic carbon content were not influenced by biochar or antibiotics. The contents of oxytetracycline decreased 6, 2 and 11 fold in the B50, B150 and B300 variants, correspondingly, after 28 days of composting. The copy number of genes encoding tetracycline resistance – *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(O)*, *tet(M)* and *tet(S)* – was not affected by antibiotics. Biochar addition did not affect the number of these genes as well, moreover, it led to increase of *tet(X)* gene copy number – 10 fold in B variant as compared with control. Bacterial community structure, revealed by *Illumina MiSeq* method, overcame several changes in the process of composting determined by composting stage and did not depend on biochar or antibiotic presence.

The work was supported by the RFBR grant project 18-29-25054.

**Влияние биочара на количество генов устойчивости к антибиотикам в компостах, полученных из куриного помета**

Карамова К.О., Данилова Н.В., Галицкая П.Ю.

Казанский федеральный университет, Казань, Россия

**Аннотация:** Компостирование куриного помета с внесением биочара и окситетрациклина привело к снижению содержания антибиотика на 28 сутки, привело к увеличению гена *tet(X)*, кодирующего устойчивость к антибиотикам

**Ключевые слова:** биочар, гены устойчивости к антибиотикам, компостирование

Одной из важных и современных проблем здравоохранения является устойчивость к антибиотикам, приводящая к снижению эффективности лечения. Широкое применение антибиотиков в животноводстве и птицеводстве вносит существенный вклад в распространение резистентности.

Цель данного исследования оценить возможность биочара снижать количество генов устойчивости к антибиотикам (ГУА) в процессе компостирования куриного помета.

Компостирование проводили в 200-литровых компостерах с периодическим перемешиванием в течение 120 дней. Использовали пять вариантов компостных смесей (соотношение куриного помета и опилок 2:1): контроль (К), контроль с биочаром (КВ), образцы с биочаром и окситетрациклином в концентрации 50, 150 и 300 мг/кг (B50, B150, B300). Биочар получали в процессе пиролиза при температуре 400° С и длительности 3 часа.

Было выявлено, что внесение биочара и антибиотиков не оказало значительного влияния на основные параметры компостирования, такие как температурный профиль, содержание растворенного органического углерода и др. Содержание окситетрациклина уменьшилось в 6, 2 и 11 раз в вариантах B50, B150 и B300 соответственно через 28 дней компостирования. Внесение биочара и антибиотиков не оказало влияния на количество генов *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(O)*, *tet(M)* и *tet(S)*, более того, оно привело к увеличению числа копий гена *tet(X)* – в 10 раз в варианте В по сравнению с контролем. Структура бактериального сообщества, выявленная методом *Illumina MiSeq*, преодолевала ряд изменений в процессе компостирования, определяемых стадией компостирования, и не зависела от наличия биочара или антибиотика.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ проект 18-29-25054.

### Comparative analysis of nucleotide polymorphism of chromosomal and symbiotic genes in symbionts of eastern and medical goat's rue from a population of the North Caucasus

Karasev E.P., Andronov E.E., Chizevskaya E.P., Provorov N.A.

ARRIAM, St. Petersburg, Pushkin, Russia

Email: [evgenii1991.karasev@gmail.com](mailto:evgenii1991.karasev@gmail.com)

**Key message.** The analysis of the nucleotide polymorphism in two goatfish rhizobia biovars showed that the diversity of all gene groups corresponds to the diversity of the host plant, and the general polymorphism of chromosomal genes is higher than the symbiotic gene polymorphism in both biovars.

**Keywords:** nodule bacteria, eastern goatskin, medical goatskin, *Neorhizobium galegae*, nucleotide polymorphism

Goat's rue rhizobia microsymbionts (*Neorhizobium galegae*) are very interesting and convenient model for studying evolutionary processes that occur during the initial stages of speciation. In nature, there are 2 types of goatskin: eastern goatskin (*Galega orientalis*) and medical goatskin (*Galega officinalis*). In accordance, 2 biotypes are distinguished in microsymbionts: *N. galegae* bv. *orientalis* and *N. galegae* bv. *officinalis*. We studied the population of the North Caucasus, which is the center of the eastern goat's rue, while the second species began to populate this region relatively recently. Accordingly, the genetic diversity of the first goat's rue species is significantly higher than the second one. In this work, a comparative analysis of the nucleotide polymorphism of rhizobia, symbionts of each species of goat's rue was undertaken. For this purpose, genome sequencing of 14 strains of *N. galegae* (6 *orientalis* and 8 *officinalis*) and a comparative analysis were performed.

It was shown that nucleotide polymorphism in goat's rue rhizobia in the Caucasus clearly correlates with the genetic diversity of the host plant: a more diverse macrosymbiont (*G. orientalis*) corresponds to a more diverse microsymbiont (*N. galegae* bv. *orientalis*). The second feature, revealed during the comparative analysis, is related to the comparison of the nucleotide polymorphism of chromosomal and symbiotic genes in each of the rhizobia biovars: the polymorphism of *sym*-genes is much lower than the "non-symbiotic" genes, which may be the result of stabilizing selection according to the signs of symbiosis associated with intensive reproduction of bacteria in nodules. Divergence bv. *orientalis* and bv. *officinalis* is more pronounced for *nif* / *fix* genes than for *nod* genes and "non-symbiotic" genes, indicating the key role of host-specific N<sub>2</sub> fixation in the evolution of *N. galegae*.

In general, the analysis indicates that the host plant seems to be one of the main factors in the rhizobia's evolution.

### Сравнительный анализ нуклеотидного полиморфизма хромосомных и симбиотических генов у симбионтов козлятника восточного и лекарственного из популяции Северного Кавказа.

Карасев Е.С., Андронов Е.Е., Чижевская Е.П., Проворов Н.А.

ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

**Аннотация:** Анализ нуклеотидного полиморфизма генов у двух биофаров ризобий козлятника показал, что разнообразие во всех группах генов соответствует разнообразию растения-хозяина, а общий полиморфизм хромосомных генов выше, чем симбиотических в обоих биофаров.

**Ключевые слова:** клубеньковые бактерии, козлятник восточный, козлятник лекарственный, *Neorhizobium galegae*, нуклеотидный полиморфизм

Ризобии-микросимбионты козлятника (*Neorhizobium galegae*) являются очень интересной и удобной моделью для изучения эволюционных процессов, происходящих при начальных этапах видообразования. В природе встречается 2 вида козлятника: козлятник восточный (*Galega orientalis*) и козлятник лекарственный (*Galega officinalis*). В соответствии с этим у микросимбионтов выделяется 2 биотипа: *N. galegae* bv. *orientalis* и *N. galegae* bv. *officinalis*. Мы исследовали популяцию Северного Кавказа, являющегося генцентром козлятника восточного, в то время как второй вид начал заселение этого региона относительно недавно. Соответственно, генетическое разнообразие первого вида козлятника существенно выше, чем второго. В настоящей работе был предпринят сравнительный анализ нуклеотидного полиморфизма ризобий, симбионтов каждого из видов козлятника. С этой целью было выполнено полногеномное секвенирование 14 штаммов *N. galegae* (6 *orientalis* и 8 *officinalis*) и проведен сравнительный анализ.

Было показано, что нуклеотидный полиморфизм у ризобий козлятника на Кавказе четко коррелирует с генетическим разнообразием растения-хозяина: более разнообразному макросимбионту (*G. orientalis*) соответствует более разнообразный микросимбионт (*N. galegae* bv. *orientalis*). Вторая особенность, выявленная в ходе сравнительного анализа, связана с сопоставлением нуклеотидного полиморфизма хромосомных и симбиотических генов у каждого из биофаров ризобий: полиморфизм *sym*-генов гораздо ниже, чем "несимбиотических" генов, что может быть результатом стабилизирующего отбора по признакам симбиоза, связанного с интенсивным размножением бактерий в клубеньках. Дивергенция bv. *orientalis* и bv. *officinalis* по *nif*/*fix*-генам выражена сильнее, чем по *nod*-генам и по "несимбиотическим" генам, указывая на ключевую роль хозяин-специфичной N<sub>2</sub>-фиксации в эволюции *N. galegae*.

В целом, проведенный анализ свидетельствует о том, что растение-хозяин является одним из основных факторов эволюции ризобий.

Исследование проводилось при финансировании гранта РФФ 19-16-00081.



**To the study of the diversity of endophytic microbiota of vines in the Western Ciscaucasia**Karasev S.G.<sup>1</sup>, Yurchenko E.G.<sup>1</sup>, Moiseeva E.V.<sup>2</sup>, Vinogradova S.V.<sup>3</sup>, Karaseva E.V.<sup>2</sup><sup>1</sup>North Caucasus Federal Scientific Center for Horticulture, Viticulture, Winemaking, Krasnodar, Russia; <sup>2</sup>Kuban State University, Krasnodar, Russia; <sup>3</sup>Centre Biotechnology RAS, Moscow, Russia

E-mail: yug.agroekos@yandex.ru

**Key message.** Microorganisms were isolated from the annual lignified shoots of the vine, for the identification of which classical microbiological methods were used, as well as the method of chromatography mass spectrometry.

**Keywords:** vine, microorganisms associated with plants, biocontrol

The identification of the laws governing the formation of the functional structure of microbial complex is necessary for the environmental justification of the development of adaptive protection technologies for grapes from diseases that have received priority in the modern environmental conditions of the Western Ciscaucasia.

The study was subjected to lignified annual shoots of grapes. After sterilizing the vine with alcohol and thoroughly washing it three times with sterile distilled water, 2-3-cm stems were crushed, ground in a sterile mortar and diluted with saline. Microorganisms were isolated on MPA, R-2, King media, and media with a high content of carbohydrates. For identification, classical microbiological methods were used, as well as the MALDI-TOF method. In total, more than 80 bacterial cultures and one micromycete were isolated, for each of which morphological-cultural and physiological properties are described. 58 cultures were identified by protein profile using the MALDI-TOF method with varying degrees of probability. The *Metschnikowiaceae* family includes the isolate *Metschnikowia pulcherrima*, previously found on grapes and some fruit crops, an antagonist of fungi and bacteria that can be used as a biocontrol agent. Of the bacterial cultures, 43 isolates are assigned to the class *Gamma Proteobacteria*, of which 13 belong to the genus *Pantoea*. The family *Pseudomonadaceae* includes 29 cultures – *Pseudomonas* sp. A representative of the genus *Rhizobium* has been isolated from the class of *Alphaproteobacteria*. Three strains are assigned to the genus *Bacillus*; all belong to the *subtilis* group. *Actinobacteria* were represented by the species *Cellulosimicrobium cellulans* and *Micrococcus luteus*. All the described microorganism cultures were transferred to the collection of the laboratory for biotechnological control of phytopathogens and phytophages for further research.

**К изучению разнообразия эндофитной микробиоты виноградной лозы в Западном Предкавказье**Карасев С.Г.<sup>1</sup>, Юрченко Е.Г.<sup>1</sup>, Моисеева Е.В.<sup>2</sup>, Виноградова С.В.<sup>3</sup>, Карасева Э.В.<sup>2</sup><sup>1</sup>Северо-Кавказский Федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Краснодар, Россия<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, Россия<sup>3</sup>ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

**Аннотация:** Из однолетних одревесневших побегов виноградной лозы выделены микроорганизмы, для идентификации которых использовали классические микробиологические методы, а также метод хромато-масс-спектрометрии.

**Ключевые слова:** виноградная лоза, микроорганизмы, ассоциированные с растениями, биоконтроль

Выявление закономерностей формирования функциональной структуры микробиокомплексов необходимо для экологического обоснования разработки технологий адаптивной защиты винограда от болезней, получивших приоритетное значение в современных средовых условиях Западного Предкавказья.

Исследованию подвергались одревесневшие однолетние побеги винограда. После стерилизации лозы спиртом и трехкратного тщательного промывания стерильной дистиллированной водой фрагменты 2-3см стебля измельчали, растирали в стерильной ступке и разводили физраствором. Выделение микроорганизмов вели на МПА, средах R-2, Кинга и средах с повышенным содержанием углеводов. Для идентификации использовали классические микробиологические методы, а также метод MALDI-TOF. Всего выделено более 60 культур бактерий и один микромицет, для каждого из которых описаны морфолого-культуральные и физиологические свойства. 58 культуры удалось идентифицировать по белковому профилю с помощью метода MALDI-TOF с разной степенью вероятности. К семейству *Metschnikowiaceae* отнесен изолят *Metschnikowia pulcherrima*, ранее обнаруженный на винограде и некоторых плодовых культурах, антагонист грибов и бактерий, который может быть использован как агент биоконтроля. Из бактериальных культур 43 изолятов отнесены к классу *Gamma Proteobacteria*, из которых 13 принадлежат роду *Pantoea*. К семейству *Pseudomonadaceae* отнесены 29 культур - *Pseudomonas* sp. Из класса Альфа-протеобактерий выделен представитель рода *Rhizobium*. К роду *Bacillus* причислены 3 штамма, все принадлежат к группе *subtilis*. Актинобактерии были представлены видами *Cellulosimicrobium cellulans* и *Micrococcus luteus*. Все описанные культуры микроорганизмов переданы в коллекцию лаборатории биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов СКФНЦСВВ для дальнейших исследований.

### Prospects the use of polystyrene films for the immobilization of bacteria

Karavaeva O.A.<sup>1</sup>, Guliy O.I.<sup>1</sup>, Simakov V.V.<sup>2</sup>, Alsowaidi A.K.M.<sup>2</sup>, Khomyakova A.A.<sup>2</sup>, Ksenofontova O.Yu.<sup>2</sup>, Smirnov A.V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia; <sup>2</sup>Chernyshevsky National Research State University, Saratov; <sup>3</sup>Kotel'nikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
E-mail: helga1121@yandex.ru

**Key message.** The use of polymer films modified by plasma treatment is proposed as a carrier for immobilizing cells at create biosensors.

**Keywords:** immobilization, microbial cells, polystyrene films, plasma treatment

The development of methods for the immobilization of bacteria and the search for the optimal carrier opens up new possibilities in the creation of biosensors. Of considerable interest is the assessment of the potential use of polystyrene (PS) films modified via plasma etching to immobilize microbial cells and to create biocatalysts for sensory systems. Goal. The immobilization of bacterial cells on the surface of PS films modified by plasma treatment and to estimate the duration of bacterial-viability preservation. Methods. PS films were prepared via centrifugation. Monocrystalline silicon wafers 10 × 10 mm<sup>2</sup> in size were used as substrates. The thickness of the films was estimated via cleavage of the samples with scanning electron microscopy (SEM) and was 280 ± 20 nm. The surfaces of PS films were modified in a vacuum chamber of the Orion-40T installation (VTC, South Korea). Substrates with a deposited PS film were located in the erosion zone of the magnetron target. A high-frequency (HF) discharge (13.56 MHz) was ignited in an argon atmosphere. The discharge power was 100 W, and the working pressure in the chamber was maintained at 10<sup>-3</sup> mbar. Cell immobilization was carried out by adsorption on PS films. After the immobilization of microbial cells, the PS surface was studied via atomic force microscopy (AFM) with the NtegraSpectra probe nanolaboratory (NT-MDT, Russia). Results. The immobilization efficiency of bacterial cells depends from the film processing time in plasma. Treatment of a polystyrene film in a high-frequency discharge plasma allowed a significant increase in the lifetime of microbial cells immobilized on its surface. The study showed the promise of PS films for immobilization with the possibility of reuse. The possibilities of the use of microbial cells immobilized on PS films modified via plasma etching were demonstrated in a biosensor detecting system based on a microwave (microwave) resonator (5–8.5 GHz). The results are of practical interest for the use of polymer coatings modified via plasma etching as a carrier for cellular immobilization to create biosensors.

This work was partially supported by the Russian Foundation for Basic Research (projects nos. 20-37-70021 and 19-07-00304).

### Перспективы применения пленок полистирола для иммобилизации бактерий

Каравеева О.А.<sup>1</sup>, Гулий О.И.<sup>1</sup>, Симаков В.В.<sup>2</sup>, Алсовэиди А.К.М.<sup>2</sup>, Хомякова А.А.<sup>2</sup>, Ксенофонтова О.Ю.<sup>2</sup>, Смирнов А.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов; <sup>2</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского; <sup>3</sup>Институт радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова РАН, Москва

**Аннотация.** Предложено использование полимерных пленок, модифицированных плазменной обработкой, в качестве носителя для иммобилизации клеток при создании биосенсоров.

**Ключевые слова:** иммобилизация, микробные клетки, пленки полистирола, плазменная обработка

Развитие методов иммобилизации бактерий и поиск оптимального носителя лимитирует создание новых сенсоров. Значительный интерес представляет оценка возможности применения пленок полистирола (ПС), модифицированных плазменным травлением, для иммобилизации микробных клеток с целью создания биокатализаторов для сенсорных систем. Цель. Иммобилизация бактериальных клеток на поверхности пленок ПС, модифицированных плазменной обработкой, и оценка времени сохранения жизнеспособности бактерий. Методы. Пленки ПС получали методом центрифугирования, в качестве подложек использовали пластины монокристаллического кремния размером 10×10 мм<sup>2</sup>. Толщина пленок оценивалась по сколу образцов методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и составляла 280±20 нм. Модификацию поверхности пленок ПС осуществляли в вакуумной камере установки Orion-40T («VTC», Южная Корея). Подложки с нанесенной пленкой ПС располагали в зоне эрозии мишени магнетрона. Высокочастотный разряд (13.56 МГц) зажигался в атмосфере аргона. Мощность разряда составляла 100 Вт, рабочее давление в камере поддерживалось на уровне 10<sup>-3</sup> мбар. Иммобилизацию клеток проводили путем адсорбции на пленках ПС. После иммобилизации микробных клеток поверхность ПС изучали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) с помощью зондовой нанолaborатории NtegraSpectra («NT-MDT», Россия). Результаты. Эффективность иммобилизации бактерий на пленках ПС зависит от времени обработки пленок в плазме. Обработка пленки ПС в плазме высокочастотного разряда позволяла увеличить время жизни бактерий, иммобилизованных на ее поверхности. Установлена перспективность использования пленок ПС в качестве иммобилизующего агента с возможностью многократного использования. Возможности применения микробных клеток, иммобилизованных на пленках ПС, модифицированных плазменным травлением, продемонстрированы в сенсорной системе на основе сверхвысокочастотного резонатора (5–8,5 ГГц). Результаты представляют интерес с практической точки зрения для использования пленок ПС, модифицированных плазменным травлением, в качестве носителя для иммобилизации бактерий.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 20-37-70021 и 19-07-00304).

### On the role of flagella in the adaptation of the PGPR *Azospirillum brasilense* to life on surfaces

Katsy E.I., Shelud'ko A.V., Petrova L.P., Filip'echeva Y.A., Yevstigneyeva S.S., Telesheva E.M., Mokeev D.I.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Saratov, Russia

E-mail: ei\_katsy@mail.ru

**Key message.** The polar flagellum significantly affects the morphological and behavioral responses of the bacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 to changes in the density of the medium and the maintenance of its biofilms at the interface between solid and liquid media.

**Keywords:** bacterial mechanosensory elements, bacterial cell differentiation, mixed flagellation, swarming, biofilm

The plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) *A. brasilense* respond to variations in milieu density by changes in cell length, modes of flagellation (only the polar flagellum [Fla] or Fla and lateral flagella [Laf]), and lifestyle (swimming, swarming, or building colonies and biofilms). However, in these and other microbes, the mechanisms of perception of mechanical signals and of the development of response to such signals are poorly understood. The aim of this study was to analyze the role of flagella in the mechanoresponses of the bacterium *A. brasilense* Sp245. Molecular genetic, microbiological, and bioinformatic methods were used. It is shown that in *mmsB1*, *fabG1*, and *flhB1* mutants, defects in flagellation and motility are accompanied by a decrease in the amount of biomass in mature biofilms. Complementation of the mutants with the corresponding genes of strain Sp245 results in the restoration of flagellation and motility and in an increase in biofilm biomass amount and stability. For the formation of working Laf, native Fla must be present on the cell. Only Fla is detected in *Azospirillum* biofilms at the interface between solid and liquid media. Preliminary data suggest that the morphological responses of azospirilla to shifts in the density of the media are affected by the FlhB1 protein of the flagellar export apparatus and putative hybrid multisensor histidine kinase/response regulator, which is encoded by the gene adjacent to *flhB1*.

The authors thank the IBPPM RAS Symbiosis Centre for the Collective Use of Research Equipment (Saratov, Russia) for technical support. The reported study was partially funded by RFBR, project number 20-04-00006-a.

### О роли жгутиков в адаптации PGPR *Azospirillum brasilense* к жизни на поверхностях

Кацы Е.И., Шелудько А.В., Петрова Л.П., Филип'ечева Ю.А., Евстигнеева С.С., Телешева Е.М., Мокеев Д.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

**Аннотация.** Полярный жгутик вносит существенный вклад в морфологические и поведенческие ответы бактерии *A. brasilense* Sp245 на изменения в плотности среды и в стабилизацию её биопленок на интерфазе между плотными и жидкими средами.

**Ключевые слова:** бактериальные механосенсорные элементы, дифференциация клеток бактерий, смешанное жгутикование, роение, биопленка

Стимулирующие рост растений ризобактерии (PGPR) *A. brasilense* отвечают на вариации в плотности окружающей среды изменениями длины и характера жгутикования клеток (только полярный жгутик [Fla] или Fla и латеральные жгутики [Laf]) и образа жизни (плавание, роение или строительство колоний и биопленок). Однако механизмы восприятия механических сигналов и выработки ответа на них у этих и других микробов мало изучены. Цель работы – анализ роли жгутиков в механоответах бактерии *A. brasilense* Sp245. Используются методы молекулярной генетики, микробиологии, биоинформатики. Показано, что у *mmsB1*, *fabG1*, *flhB1* мутантов дефекты в жгутиковании и подвижности сопровождаются снижением количества биомассы в зрелых биопленках, а комплементация мутантов соответствующими генами штамма Sp245 приводит к восстановлению жгутикования и подвижности, увеличению накопленной биомассы в биопленках и повышению их стабильности. Присутствие на клетке активного Fla необходимо для образования работающих Laf. В биопленках азоспирилл, сформированных на интерфазе между плотными и жидкими средами, выявляется только Fla. Получены предварительные данные о том, что белок FlhB1 аппарата экспорта флагеллярных белков и предполагаемая гибридная мультисенсорная гистидинкиназа/регулятор ответа, кодируемая соседним с *flhB1* геном, оказывают влияние на морфологический ответ азоспирилл на сдвиги в плотности среды.

Авторы благодарят ЦКП "Симбиоз" ИБФРМ РАН (Саратов, Россия) за помощь в работе. Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00006-a.

### Design of an inducible *rolC* expression vector

Khafizova G.V., Matveeva T.V.

Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

E-mail: galina.khafizova@gmail.com

**Key message.** *rolC* is one of the most conserved genes in T-DNA - a fragment, that agrobacteria transfer to the plant during transformation. The *rolC* functions are not defined yet, to clarify them we designed an inducible expression vector.

**Keywords:** *rolC*, naturally transgenic plants, cellular T-DNA

Today agrobacterial transformation by members of *Rhizobiaceae* family is one of the main production methods of transgenic plants *in vitro*. This method is based on the ability of bacteria to integrate the fragment of their DNA (T-DNA) into a plant's genome. However, there are some transgenic plants that appeared in nature before we developed methods of genetic engineering (Matveeva, Sokornova, 2017). These plants contain sequences homologous to agrobacterial T-DNA in their genomes. One of the highly conserved genes in T-DNA sequence is *rolC* and it has been shown that in a number of naturally transgenic plants *rolC* is expressed in different organs and tissues, and its function has not yet been established (Matveeva, 2018). Possible functions of *rolC* that are speculated are: cytokinin level regulation, secondary metabolites synthesis and carbohydrates metabolism. Number of plant studies confirmed *rolC* role in carbohydrate metabolism, and also showed an impact of *rolC* on the morphophysiological processes (Hanieh Mohajjel-Shoja et al., 2011). These experiments used pTA7002 vector which consisted of *Ar\_rolC* gene (the *rolC* gene from *A. rhizogenes* A4 strain) and dexamethasone-induced promoter with viral protein VP16 transcription activation domain. Using this construction as a template, we cloned *Ar\_rolC* and its promoter into the destination vector pB7WG2D. New vector carries the *gfp* reporter gene, as well as a selective marker *bar* (resistance to ammonium glufosinate), which streamlines selection process of plant explants after agrobacterial transformation. Application of *rolC* pB7WG2D\_rolC\_pDex inducible expression vector optimized our study and experiments design. Using new transformation vector for plant species without T-DNA-like sequences could provide significant evidence of controlled changes in plant metabolism, which will expand our understanding of the *rolC* gene role in the regulation of secondary metabolites synthesis.

This study was supported by a grant from the RFBR 18-016-00118 and conducted using the equipment of the “molecular and cellular technology development” Centre of the SPbSU Research Park.

### Создание конструкций для индуцируемой экспрессии *rolC*

Хафизова Г.В., Матвеева Т.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** *rolC* – один из наиболее консервативных генов в Т-ДНК - фрагменте, который агробактерии переносят в растение при трансформации. Функции *rolC* не определены, создание конструкций для индуцируемой экспрессии позволит их уточнить.

**Ключевые слова:** *rolC*, природно-трансгенные растения, клеточная Т-ДНК

Агробактериальная трансформация растений бактериями семейства *Rhizobiaceae* сегодня является одним из основных способов получения трансгенных растений в лаборатории. Этот метод основан на умении бактерий встраивать в растение фрагмент своей ДНК – Т-ДНК. Однако существуют трансгенные растения, появившиеся в природе без участия человека (Матвеева, Сокоорнова, 2017), - их геномы содержат последовательности, гомологичные Т-ДНК агробактерий. Ген *rolC* является одним из наиболее консервативных генов в составе Т-ДНК. Было показано, что у ряда природно-трансгенных растений *rolC* экспрессируется в разных органах и тканях, его функция на сегодня не установлена (Matveeva, 2018). Среди возможных функций *rolC* предполагают: регуляцию уровня цитокининов в растительных тканях, участие в синтезе вторичных метаболитов, и в метаболизме углеводов. Результаты ранее проведенных исследований по изучению активности гена *rolC* подтвердили его роль в углеводном метаболизме, а также показали влияние *rolC* на морфофизиологические процессы растений (Hanieh Mohajjel-Shoja et al., 2011). В данных экспериментах были использованы конструкции на основе вектора pTA7002, содержащие ген *Ar\_rolC* (ген *rolC* из штамма *A. rhizogenes* A4) под воздействием дексаметазон-индуцируемого промотора, содержащего активирующий транскрипцию домен вирусного белка VP16. Используя данную конструкцию в качестве матрицы, мы получили фрагмент, включающий *Ar\_rolC* и промотор, и переклонировали его в вектор назначения pB7WG2D. Данный вектор содержит репортерный ген *gfp*, а также селективный маркер для растений *bar* (устойчивость к глюфосинату аммония), что облегчает отбор растительных эксплантов, в которые встроилась конструкция, после агробактериальной трансформации. Вектор для индуцируемой экспрессии *rolC* pB7WG2D\_rolC\_pDex был создан для оптимизации работы по изучению роли гена *rolC* во вторичном метаболизме растений. Использование созданного вектора для трансформации видов, не содержащих Т-ДНК-подобных последовательностей, позволит выявить контролируемые изменения в метаболизме растений, что поможет прояснить участие гена *rolC* в регуляции синтеза вторичных метаболитов.

Данная работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-016-00118 с использованием оборудования ресурсного центра «РМКТ» СПбГУ.

**Plant growth biostimulants based on synthetic polyaminosaccharides**Khamidullina L.A.<sup>1,2</sup>, Tobysheva P.D.<sup>1,2</sup>, Rybina E.A.<sup>2</sup>, Cherepanova O.E.<sup>3</sup>, Pestov A.V.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Postovsky Institute of Organic Synthesis, UB RAS, Ekaterinburg, Russia; <sup>2</sup>Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia;<sup>3</sup>Botanical Garden, UB RAS, Ekaterinburg, Russia

E-mail: lili.khamidullina@gmail.com

**Key message.** The growth-regulating properties of chitosan derivatives were studied in vitro on several types of medicinal plants. Carboxyethyl chitosan demonstrated the best effect on Echinacea plants.

**Keywords:** plant growth regulators, elicitors, chitosan, polyaminosaccharides

Successful cultivation of medicinal plants in effective and environmentally friendly conditions in vitro is impossible without resort to growth biostimulants. Elicitors therewith become agrochemicals with predominant properties, because they not only promote growth and accelerate development, but also initiate the immune defense of plants. Chitosan is polyaminosaccharide which is used as an immunomodulator and plant growth regulator. At the same time there is no data on growth-regulating properties of its derivatives in the literature, which, in turn, are of undoubted interest.

The objectives of this research are study the growth-regulating properties, as well as estimation of the elicitor activity mechanism of such synthetic chitosan derivatives as carboxyethyl chitosan (CEC) and sulfoethyl chitosan (SEC), which can also be considered as derivatives of  $\beta$ -alanine and taurine, respectively, which can result in their significantly superior biological activity compared with the parent chitosan.

Growth-regulating activity was evaluated on *Astragalus*, *Echinacea*, *Calluna* and *Crataegus* medicinal plants. The experiments were carried out in vitro on Murashige-Skoog nutrient medium to produce both seedlings and callus cultures. Parent chitosan, CEC, SEC and associated amino acid were studied at the same concentration. Experiments were performed at the constant exposure of the studied compounds. The effect of exposure by new compounds is evaluated by the following parameters: seed germination rate, as well as the quantity, size, type of cells involved in the formation of the growth centers of a callus.

The synthesized compounds made dissimilar impact on the studied plant species. The most striking stimulation of germination was manifested in *Echinacea* plants, where the first seedlings in the CEC line were observed on the 6th day of the experiment. *Astragalus* plants were less sensitive to the new synthesized compounds.

**Биостимуляторы роста и развития растений на основе синтетических полиаминосахаридов**Хамидуллина Л.А.<sup>1,2</sup>, Тобышева П.Д.<sup>1,2</sup>, Рыбина Е.А.<sup>2</sup>, Черепанова О.Е.<sup>3</sup>, Пестов А.В.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург, Россия; <sup>2</sup>Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия; <sup>3</sup>Ботанический сад УрО РАН, Екатеринбург, Россия

**Аннотация.** Исследованы росторегулирующие свойства производных хитозана в условиях in vitro на лекарственных растениях нескольких видов. Наибольший эффект показал карбоксиэтилхитозан на растениях рода *Echinacea*.

**Ключевые слова:** регуляторы роста и развития растений, элиситоры, хитозан, полиаминосахариды

Успешное культивирование лекарственных растений в эффективных и экологически чистых условиях in vitro невозможно без использования биостимуляторов роста и развития, при этом препаратами с преимущественными свойствами становятся элиситоры, поскольку они не только способствуют росту и ускоренному развитию, но и инициируют иммунную защиту растений. Полиаминосахарид хитозан используется как иммуномодулятор, регулятор роста и развития растений, но не его производные, что, в свою очередь, представляет несомненный интерес, так как в литературе отсутствуют данные об их росторегулирующих свойствах.

Целью данной работы является изучение росторегулирующих свойств, а также оценка механизма элиситорной активности таких синтетических производных хитозана, как карбоксиэтилхитозан (КЭХ) и сульфэтилхитозан (СЭХ), которые можно рассматривать и в качестве производных аминокислот  $\beta$ -аланина и таурина соответственно, что является причиной, объясняющей их биологическую активность, значительно превосходящую свойства исходного хитозана.

Оценка росторегулирующей активности проводилась на лекарственных растениях рода *Astragalus*, *Echinacea*, *Calluna* и *Crataegus*. Эксперименты осуществлялись в условиях in vitro на питательной среде Мурасиге-Скуга с получением как сеянцев, так и каллусных культур. В качестве объектов изучения использовались исходный хитозан, КЭХ, СЭХ, соответствующие аминокислоты в одинаковой концентрации. Эксперименты проводились при постоянной экспозиции изучаемых веществ. Эффект воздействия нового соединения оценивали по следующим параметрам: скорость прорастания семян, а также количество, размеры, тип клеток, участвующих в образовании центров роста каллусов.

Синтезированные соединения оказали неоднородное воздействие на изученные виды растений. Наиболее яркая стимуляция прорастания проявилась у растений рода *Echinacea*, где мы отметили первые проростки в линиях КЭХ уже на 6 сутки эксперимента. Менее чувствительны к новым синтезированным соединениям оказались растения рода *Astragalus*.

**Functioning of benthic type of microbial fuel cell with the possibility of utilization of toxic compounds**

Khizhnyak E.I., Volchenko N.N., Samkov A.A., Khudokormov A.A., Lazukin A.A.

Kuban State University, Krasnodar, Russia

E-mail: ekaterina.khiz95@mail.ru

**Key message.** The electrogenesis of benthic-type microbial fuel cell was studied under conditions of pollutant contamination. The ability of microbial fuel cells to generate low-power electricity and participate in the biodegradation of toxic substances was revealed.

**Keywords:** microbial fuel cell (MFC), electrogenesis, pollutants, biodegradation

A promising area of alternative energy is the benthic type of microbial fuel cells (MFC), which can generate low-power electricity due to the activity of electrochemically active microflora and participate in the processes of biodegradation of toxic substances. Due to excessive environmental pollution, the study of MFC's resistance to the toxicants is an important issue. The purpose of this work is to study the influence of biological and physical-chemical factors on the functioning of the benthic type of microbial fuel cells under conditions of overwetting.

In the laboratory conditions, microscopes were modeled. Microsomes are vessels, which are filled in with peat soil with electrodes inside. All vessels were filled with water until full saturation. Some objects were inoculated with the biomass of the *Rhodococcus erythropolis* B2, the biodestructor strain from the collection of the Department of Genetics, Microbiology and Biochemistry of the Kuban State University, which is capable of biodestructing petroleum products, surfactants, resistant to heavy metals, and stimulating plant growth. Diesel fuel, Triton X-100 (surfactant) and lead acetate were used as pollutants.

As a result, the electrogenesis of benthic MFC system was studied, registered at the level of 200-300 mV. It was found that inoculation of MFC systems with the *R. erythropolis* B2 strain has a positive effect on electrogenesis, since the level of electrogenesis increased by 40 % compared to the control. The greatest decrease in voltage, which was accompanied by a drop throughout the experiment, occurred as a result of the introduction of lead acetate. A high level of biodegradation was observed in the experiment using diesel fuel, which was 16 %, and up to 42 % in the systems, which were inoculated by *R. erythropolis* B2. As a result of the experiment, phytotesting was carried out. It showed that in MFC contaminated with diesel fuel, the yield of phytomass was higher than when adding Triton X-100 and lead acetate. More pressure on the test plants was exerted by the Triton X-100. The yield of phytomass in peat soil treated with *Rhodococcus* was as 1.67 times higher as than without treatment. In the case of introducing diesel fuel and *Rhodococcus*, a phytostimulating effect was noted.

**Функционирование бентосных микробных топливных элементов  
с возможностью утилизации токсических веществ**Хижняк Е.И.<sup>1</sup>, Волченко Н.Н.<sup>1</sup>, Самков А.А.<sup>1</sup>, Худокормов А.А.<sup>1</sup>, Лазукин А.А.<sup>1</sup>  
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», г. Краснодар, Россия

**Аннотация.** Изучен электрогенез МТЭ бентосного типа в условиях загрязнения поллютантами. Выявлена способность микробных топливных элементов генерировать электроэнергию малой мощности и участвовать в биодegradации токсичных веществ.

**Ключевые слова:** микробный топливный элемент (МТЭ), электрогенез, поллютанты, биодegradация

Перспективным направлением альтернативной энергетики являются микробные топливные элементы (МТЭ) бентосного типа, способные за счёт жизнедеятельности электрохимически-активной микрофлоры вырабатывать электроэнергию малой мощности и участвовать в процессах биодegradации токсичных веществ. Вследствие чрезмерного загрязнения окружающей среды, изучение устойчивости МТЭ к токсикантам является важным вопросом. Целью данной работы является изучение влияния биологических и физико-химических факторов на функционирование микробных топливных элементов бентосного типа в условиях переувлажнения.

В лабораторных условиях были смоделированы микросомы, представляющие собой сосуды, заполненные почвенным торфогрунтом, в толще которого расположены электроды. Все сосуды пропитаны водой до полного насыщения. Часть установок были инокулированы биомассой штамма-биодеструктора *Rhodococcus erythropolis* B2 из коллекции кафедры генетики, микробиологии и биохимии Кубанского государственного университета, способного к биодеструкции нефтепродуктов, СПАВ, устойчивого к тяжелым металлам, стимулирующего рост растений. В качестве поллютантов использовали дизельное топливо, Тритон X-100 (СПАВ) и ацетат свинца (тяжёлый металл).

В результате был изучен электрогенез систем МТЭ бентосного типа, регистрируемый на уровне 200-300 мВ. Установлено, что инокуляция систем МТЭ штаммом *R. erythropolis* B2 благоприятно влияет на электрогенез, поскольку уровень электрогенеза, по сравнению с контролем, увеличился на 40 %. Наибольшее снижение напряжения, которое сопровождалось падением на всём протяжении эксперимента, происходило в результате внесения ацетата свинца. Высокий уровень биодegradации отмечен в опыте с использованием дизельного топлива, который составлял 16 %, а в инокулированных родококком системах до 42 %. По итогам эксперимента было проведено фитотестирование, которое показало, что в МТЭ, загрязнённых дизельным топливом, выход фитомассы оказался выше, чем при внесении Тритон X-100 и ацетата свинца. Большой прессинг на тест-растения оказал Тритон X-100. Выход фитомассы в торфогрунте, обработанном родококком, был в 1,67 выше раза, чем без обработки. В случае внесения дизельного топлива и родококка был отмечен фитостимулирующий эффект.

**Vavilovia formosa rhizobia symbionts belong to *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* species, but form a separate group within it**

Kimeklis A.K.<sup>1</sup>, Aksenova T.S.<sup>1</sup>, Gladkov G.V.<sup>1</sup>, Kuznetsova I.G.<sup>1</sup>, Sazanova A.L.<sup>1</sup>, Safronova V.I.<sup>1</sup>, Belimov A.A.<sup>1</sup>, Onishchuk O.P.<sup>1</sup>, Kurchak O.N.<sup>1</sup>, Pinaev A.G.<sup>1</sup>, Andronov E.E.<sup>1,2,3</sup>, Provorov N.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ARRIAM, Pushkin, Russia; <sup>2</sup>SPbSU, Saint-Petersburg, Russia; <sup>3</sup>V.V. Dokuchaev Soil Science Institute, Moscow, Russia  
E-mail: kimeklis@gmail.com

**Key message.** Ecological isolation, group separation of *hkg* and *sym* genes, along with the results of the sterile tube test demonstrate that symbionts of *V. formosa* belong to *R. leguminosarum* bv. *viciae* species, but form a separate group within it.

**Keywords:** *Vavilovia formosa*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, group separation, house-keeping genes, symbiotic genes, *nodX*

*Vavilovia formosa* is considered to be closest to its last common ancestor (LCA) of *Fabeae* tribe. Apart from *Vavilovia*, this tribe consists of four other plant genera, which are *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus*, and *Lens*. These genera are cross-inoculated by rhizobia belonging to *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (*Rlv*). In contrast to biovar *viciae*, bacteria from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* (*Rlt*) inoculate plants from the *Trifolieae* tribe. The aim of this work was to determine the position of *vavilovia* symbionts within *R. leguminosarum*. Twenty-two rhizobia strains were isolated from *vavilovia* plants from three distinct populations (North Ossetia, Dagestan, and Armenia). Set of house-keeping (*hkg*: 16S rRNA, *glnII*, *gltA*, and *dnaK*) and symbiotic (*sym*: *nodA*, *nodC*, *nodD*, and *nifH*) genes from these strains, along with *Rlv* and *Rlt* strains from GeneBank were used for this study. Nucleotide distances were aligned and used to construct phylogenies and to calculate group separation between rhizobia groups. Comparison of *hkg* and *sym* genes of the symbionts of *V. formosa* with those of other *Rlv* and *Rlt* strains reveals a significant group separation, which was most pronounced for *sym* genes. A remarkable feature of the strains isolated from *V. formosa* was the presence of the *nodX* gene, which was commonly found in *Rlv* strains isolated from Afghanistan pea genotypes. Tube testing of different strains on nine plant species, including all genera from the *Fabeae* tribe, demonstrated that the strains from *V. formosa* nodulated the same cross inoculation group as the other *Rlv* strains. Comparison of nucleotide similarity in *sym* genes suggested that their diversification within *sym*-biotypes of *Rlv* was elicited by host plants. Contrariwise, diversification of *hkg* genes could be caused by either local adaptation to soil niches or by genetic drift. Long-term ecological isolation, genetic separation, and the ancestral position of *V. formosa* suggested that symbionts of *V. formosa* could be responsible for preserving ancestral genotypes of the *Rlv* biovar. This work is supported by RSF grant 19-16-00081.

**Ризобияльные симбионты *Vavilovia formosa* принадлежат к виду *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, но образуют внутри него обособленную группу**

Кимеклис А.К.<sup>1</sup>, Аксёнова Т.С.<sup>1</sup>, Гладков Г.В.<sup>1</sup>, Кузнецова И.Г.<sup>1</sup>, Сазанова А.Л.<sup>1</sup>, Сафронова В.И.<sup>1</sup>, Белимов А.А.<sup>1</sup>, Онищук О.П.<sup>1</sup>, Курчак О.Н.<sup>1</sup>, Пинаев А.Г.<sup>1</sup>, Андронов Е.Е.<sup>1,2,3</sup>, Проворов Н.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ ВНИИСХМ, Пушкин, Россия; <sup>2</sup>СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия; <sup>3</sup>Почвенный институт им. В.В. Докучаева РАН, Москва, Россия

**Аннотация.** Экологическая изоляция, групповое обособление по нуклеотидным расстояниям и результат микровегетационного опыта указывают на то, что симбионты *V. formosa* принадлежат к виду *Rlv*, но образуют обособленную группу внутри него.

**Ключевые слова:** *Vavilovia formosa*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, обособление групп, гены домашнего хозяйства, симбиотические гены, *nodX*

*Vavilovia formosa* считается ближайшим родственником к последнему общему предку трибы *Fabeae*. Помимо *Vavilovia*, к этой трибе относятся четыре других рода растений: *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* и *Lens*. Эти роды образуют группу перекрестной инокуляции с ризобиями, принадлежащими к виду *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (*Rlv*). В отличие от *Rlv*, бактерии из *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (*Rlt*) инокулируют растения из трибы *Trifolieae*. Целью данной работы было определение таксономического положения симбионтов *vavilovia* внутри вида *R. leguminosarum*. Всего было изучено 22 штамма ризобии из растений *vavilovia* из трех различных популяций (Северная Осетия, Дагестан и Армения). Для этого исследования использовали набор генов домашнего хозяйства (*hkg*: 16S рРНК, *glnII*, *gltA* и *dnaK*) и симбиотических генов (*sym*: *nodA*, *nodC*, *nodD* и *nifH*) из этих штаммов, а также *Rlv* и *Rlt* штаммов из GeneBank. Нуклеотидные последовательности были выровнены и использованы для построения филогений и для расчета группового обособления между изучаемыми группами ризобий. Сравнение генов *hkg* и *sym* симбионтов *V. formosa* с генами других штаммов *Rlv* и *Rlt* выявило значительное обособление групп, которое было наиболее выражено для *sym* генов. Примечательной особенностью штаммов, выделенных из *V. formosa*, было наличие гена *nodX*, который характерен для симбионтов «афганского» гороха. Микровегетационный опыт с использованием симбионтов *vavilovia* и 9 различных видов растений из трибы *Fabeae* продемонстрировал, что штаммы из *V. formosa* принадлежат к группе перекрестной инокуляции *Rlv*. Сравнительный анализ нуклеотидного разнообразия сим-генов показал, что их разнообразие в пределах *Rlv* могло быть вызвано растениями-хозяевами, независимо от места изоляции. Напротив, диверсификация *hkg* могла быть вызвана либо локальной адаптацией к нишам почвы, либо генетическим дрейфом. Долгосрочная экологическая изоляция, нуклеотидное обособление групп ризобий, а также анцестральный статус хозяина позволяют предположить, что симбионты *V. formosa* могут выступать в качестве хранилища анцестральных черт генотипов вида *Rlv*.

Данная работа была выполнена при поддержке грантом РФФИ 19-16-00081.

**Regulation of the development of defense reactions on the part of plants with the participation of rhizobia signaling molecules as the basis for the development of legume-rhizobial symbiosis**

*Kirienko A.N., Dolgikh E.A.*

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology (ARRIAM), Saint Petersburg, Russia

*E-mail: kirienkoann@yandex.ru*

**Key message.** *The role of the LysM-containing receptor-like kinase K1 of pea in the development of protective reactions and vesicular transport during the symbiosis development with rhizobial bacteria is shown*

**Keywords:** *legume-rhizobial symbiosis, LysM-RLK, defense reactions*

Most legumes are able to establish a symbiotic relationship with rhizobial bacteria. As a result of this interaction, nitrogen fixing organs — nodules — are formed on the roots of the plants. In most legumes, the penetration of rhizobia into the root tissues and the settlement of the forming nodule occurs through special structures - infection threads. In this case, unlike the interaction with pathogenic microorganisms, legumes do not develop defense reactions in response to the rhizobia penetration. Previously, we described the role of LysM-containing receptor-like kinase of pea K1, which is necessary for recognizing the signal molecules of rhizobia Nod factors and regulating the development of symbiosis. It was found that K1 can control early symbiotic reactions, the promotion of infection threads in root tissues, and the exit of bacteria from them. Due to the fact that the penetration of rhizobia into root tissues is directly related to the control of the development of defense reactions on the part of plants, we have studied the role of K1 in the regulation of these processes. The mutant line *k1-2*, which is characterized by blocking the exit of bacteria from infection threads, was used in the work. Histochemical analysis of the roots of plants of this line showed that callose deposition occurs around the possible exit sites of bacteria, which is a typical reaction of the plant to the penetration of the pathogen. It is known that both during the development of symbiosis and pathogenesis in plants, changes occur in the vesicular transport system. When analyzing transgenic pea roots with overexpression of the *K1* gene under the CaMV 35S promoter, targets of the receptor action were identified, including both defense reaction regulators and vesicular transport components. The role of the K1 receptor and Nod factors signaling molecules in regulating the development of defense reactions when rhizobia enter plant tissues, as well as in controlling vesicular transport during symbiosis, is discussed.

This work was supported by a grant of the Russian Science Foundation 16-16-10043.

**Регуляция развития защитных реакций со стороны растений с участием сигнальных молекул ризобий как основа для развития бобово-ризобияльного симбиоза**

*Кириенко А.Н., Долгих Е.А.*

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** *Показана роль LysM-содержащей рецептор-подобной киназы K1 гороха в контроле развития защитных реакций и везикулярного транспорта в ходе развития симбиоза с ризобияльными бактериями*

**Ключевые слова:** *бобово-ризобияльный симбиоз, LysM-РПК, защитные реакции*

Большинство бобовых растений способны устанавливать симбиотические отношения с ризобияльными бактериями. В результате такого взаимодействия на корнях растения формируются органы азотфиксации – клубеньки. Наиболее распространенным способом проникновения ризобий в ткани корня и заселения формирующегося клубенька является развитие специальных структур – инфекционных нитей. При этом, в отличие от взаимодействия с патогенными микроорганизмами, у бобовых подавляются защитные реакции в ответ на проникновение ризобий. Ранее нами была описана роль LysM-содержащей рецептор-подобной киназы K1 гороха, необходимой для узнавания сигнальных молекул ризобий Nod-факторов и регуляции развития симбиоза. Установлено, что K1 может контролировать ранние симбиотические реакции, продвижение инфекционной нити в тканях корня и выход бактерий из инфекционной нити. В связи с тем, что проникновение ризобий в ткани корня непосредственно связано с контролем развития защитных реакций со стороны растений, нами была изучена роль K1 в регуляции этих процессов. В работе была использована мутантная линия *k1-2*, которая характеризуется блокированием выхода бактерий из инфекционных нитей. Гистохимический анализ корней растений данной линии показал, что вокруг возможных мест выхода бактерий происходит отложение каллозы, что является типичной реакцией растения на проникновение патогена. Известно, что, как при развитии симбиоза, так и при патогенезе у растений происходят изменения в системе везикулярного транспорта. При анализе трансгенных корней гороха со сверхэкспрессией гена *K1* под промотором CaMV 35S были выявлены мишени действия рецептора, в числе которых оказались, как регуляторы защитных реакций, так и компоненты везикулярного транспорта. Обсуждается роль рецептора K1 и сигнальных молекул Nod-факторов в регуляции развития защитных реакций при проникновении ризобий в ткани растения, а также в контроле везикулярного транспорта при симбиозе.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-16-10043.



### Study of the DEEPER ROOTING 1 (DRO1) expression features in the cucumber (*Cucumis sativus*) root system architecture formation

Kiryushkin A.S., Guseva E.D., Ilina E.L., Demchenko K.N.  
Komarov Botanical Institute, Saint Petersburg, Russia  
E-mail: akiryushkin@binran.ru

**Key message.** Identification of the cucumber DRO clade in IGT protein family was performed using phylogenetic analysis. Relative expression to the exogenous auxin and promoter tissue activity of the DRO genes were studied.

**Keywords:** root systems, DRO1, cucumber, lateral root, molecular cloning

Change in the angle of the aboveground and underground lateral organs elevation in monocotyledonous and dicotyledonous plants is regulated by the IGT proteins (named for a conserved three amino acid motif IGT (isoleucine-glycine-threonine)). One of the representatives of the IGT family is the DRO1 protein, which regulates the lateral root angle. The aim of this work is to study the expression features of the gene encoding the DRO1 protein during the cucumber (*Cucumis sativus*, *Cucurbitaceae*) root system architecture formation.

Phylogenetic analysis of the IGT proteins was performed using the MEGA7.0. Data about auxin sensitivity of cucumber DRO genes were obtained using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Study of the cucumber DRO genes expression pattern in various root zones, as well as the assessment of the DRO genes expression domain during lateral root initiation and development were performed using laser scanning confocal microscopy.

Three representatives of the DRO clade were identified in the cucumber proteome using phylogenetic analysis of the Arabidopsis, rice and cucumber IGT proteins. The genes encoding the cucumber DRO proteins were named CsDRO1, CsDRO2 and CsDRO3 according to the percentage of similarity between the amino acid sequences of the cucumber DRO proteins and rice DRO1 protein (OsDRO1). CsDRO1 has 52% identical amino acid sequences. For CsDRO2 the identity was 45%, and for CsDRO3 only 22%. According to preliminary qRT-PCR data three identified cucumber DRO genes are auxin-sensitive. Tissue activity analysis of the cucumber DRO gene promoters showed that their expression pattern was present both in the root apical meristem and in the lateral root primordia initiated directly in the apical meristem of the parental root.

Considering the highest similarity of CsDRO1 protein with OsDRO1 protein, as well as the CsDRO1 expression features in roots, CsDRO1 can be selected as a target gene for further CRISPR/Cas editing in order to change the cucumber root system architecture. The reported study was funded by RFBR, project number 20-316-80046.

### Изучение особенностей экспрессии гена DEEPER ROOTING 1 (DRO1) при формировании архитектуры корневой системы огурца (*Cucumis sativus*)

Кiryushkin A.S., Гусева Е.Д., Ильина Е.Л., Демченко К.Н.  
Ботанический институт им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация:** Анализ филогении белков семейства IGT позволил идентифицировать представителей клады DRO у огурца. Для генов DRO огурца анализировали уровни их экспрессии в ответ на экзогенный ауксин, а также тканевую активность их промоторов.

**Ключевые слова:** корневые системы, DRO1, огурец, боковой корень, молекулярное клонирование

Изменение угла наклона надземных и подземных боковых органов у однодольных и двудольных растений регулируется работой белков семейства IGT, название которого происходит от консервативной аминокислотной последовательности IGT (изолейцин-глицин-треонин), имеющейся у всех белков этого семейства. Одним из представителей семейства IGT является белок DRO1, регулирующий угол наклона бокового корня относительно вертикальной оси родительского корня. Целью данной работы является изучение особенностей экспрессии гена, кодирующего белок DRO1, при формировании архитектуры корневой системы огурца (*Cucumis sativus*, сем. *Cucurbitaceae*).

Филогенетический анализ белков семейства IGT был проведен с помощью программы MEGA7.0. Данные по ауксин-чувствительности генов DRO огурца были получены с помощью метода количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Изучение паттерна экспрессии генов DRO огурца в различных ростовых зонах корня, а также оценка этапа формирования собственного домена экспрессии генов DRO при инициации и развитии бокового корня проводились с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

В результате филогенетического анализа белков семейства IGT Arabidopsis, риса и огурца были идентифицированы три представителя клады DRO у огурца. Гены, кодирующие белки DRO огурца, были названы CsDRO1, CsDRO2 и CsDRO3. Номер присваивался исходя из процента сходства между аминокислотными последовательностями белка огурца и белка DRO1 риса (OsDRO1). CsDRO1 обладает 52% идентичных аминокислотных последовательностей. Для CsDRO2 это значение составляло 45%, а для CsDRO3 только 22%. Согласно предварительным данным ПЦР-РВ, все найденные гены DRO огурца являются ауксин-чувствительными. Анализ тканевой активности промоторов идентифицированных генов DRO огурца показал, что при формировании бокового корня их домен экспрессии охватывает как меристему родительского корня, так и формирующиеся в ней примордии бокового корня.

Учитывая наибольший процент сходства белка CsDRO1 с белком OsDRO1, а также особенности экспрессии гена CsDRO1 в корнях огурца, CsDRO1 может быть выбран в качестве гена-мишени для дальнейшего CRISPR/Cas редактирования с целью направленного изменения архитектуры корневой системы огурца.

Исследования поддержаны грантом РФФИ 20-316-80046-мол\_эв\_а.



### Genetic characterization of pea (*Pisum sativum* L.) mutants P59 and P60, defective in nitrogen fixation

Klimenko O.P.<sup>1</sup>, Kulaeva O.A.<sup>1</sup>, Shtark O.Y.<sup>1</sup>, Zhernakov A.I.<sup>1</sup>, Tikhonovich I.A.<sup>1,2</sup>, Zhukov V.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

E-mail: klimenko\_o.p@mail.ru

**Key message.** Several genes involved in development of symbiosis between pea and rhizobia haven't yet been characterized in detail. Here, the first results of genetic analysis of pea mutants in the symbiotic genes *Sym23* and *Sym24* are presented.

**Keywords:** nitrogen fixation, symbiotic genes, nodulation

An important factor of soil productivity is the ability of legumes to fix nitrogen in symbiosis with nodule bacteria. Identification of genes that are important for these symbiotic relationships is the key to understanding the functioning of nitrogen-fixing systems, and thus is an important task for both applied and fundamental science. A large collection of mutants with defects in nodulation is available for pea, and for several mutants, comprehensive phenotypic characterization and genetic analysis is needed.

**Aim:** To perform the phenotypic and genetic characterization of pea (*Pisum sativum* L.) mutants P59 and P60, defective in nitrogen fixation.

In this work different lines of pea were used: Frisson, NGB1238 and SGE, characterized by pink effective nodules; two mutant lines obtained on the Frisson line: P59 (mutation in the *Sym23* gene), P60 (mutation in the *Sym24* gene), characterized by the formation of white, ineffective nodules. The microorganisms that were used are *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026 strain.

The nitrogen-fixing activity of nodules was assessed by the acetylene reduction method. Localization of mutant loci was carried out using bulk segregant analysis (Galvão et al., 2012) in combination with RNA-seq.

Comparative analysis of the vegetative mass of plants showed that the P59 line had the lowest mass (1,38 times lower compare to Frisson,  $p=0,021$ ), while the P60 line did not differ in this parameter from wild-type plants. However, the difference in shoot mass between the three analyzed lines was not statistically significant.

Analysis of acetylene reduction showed that mutant plants had a greatly reduced nitrogen-fixing ability, especially plants of the P59 line – among two mutants, this line has the lowest ability to reduce acetylene (17, 5 times lower compare to Frisson,  $p=0,00023$ ). Nitrogen fixing ability of P60 plants was 9,7 times lower compare to Frisson plants ( $p=0,0007$ ).

For localization of genes *Sym23*, *Sym24* in pea genome, the F2 population from the cross of P59 and NGB1238 and the F2 population from the cross of P60 and SGE were analyzed for mutant phenotypes. Two separate bulks consisting of fix+ and fix- plants were pooled for future next generation sequencing of transcriptomes via MACE and subsequent search for the genes which, according to segregation analysis, are linked to the mutant genes. So, we plane to determine region of localization of mutations.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant 17-76-30016).



## Construction and characterization of the deletion mutant of *slyA* gene in phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora*

Koida E.S., Lagonenko A.L.

Biology Faculty, Belarusian State University, Minsk, Belarus

E-mail: elenakoida99@gmail.com

**Key message.** The regulon of global transcriptional regulator SlyA in bacteria *Erwinia amylovora* was examined. For that, the  $\Delta slyA$  mutant was constructed. The mutant showed a decreased level of amylovoran production and polymyxin B resistance.

**Keywords:** *Erwinia amylovora*, SlyA, transcription regulation, deletion mutant, virulence factors

SlyA is a transcriptional regulator that is common for *Enterobacteriaceae* family members, but also found in other bacteria and archaea. The protein has been shown to be involved in the virulence factors regulation in some pathogens, but its role in *Erwinia amylovora* was unknown.

In this study we exam the regulon of global transcriptional regulator SlyA in bacteria *Erwinia amylovora*. The factor belongs to the MarR (multiple antibiotic resistance regulators) family that regulate a wide variety of cellular processes, including resistance to multiple antibiotics, organic solvents, oxidative-stress agents and some aromatic compounds [2].

For examination of the role of SlyA we have constructed the deletion mutant of *slyA* gene, utilizing one-step inactivation approach by Datsenko [1]. Having predicted the regulon with the bioinformatics tool we took the most expressive virulence factors to check for any changes. For swarming motility analysis, the assay with semi-solid agar was used, but despite the presence of *fliL* operon in predicted SlyA regulon no significant difference was detected. The test for cellulose production (as an auxiliary biofilm polysaccharide) has not shown the difference too. Also, the ability to amylovoran (main biofilm polysaccharide) production was measured. The mutant exhibited decreased (about 58,6%) level of exopolysaccharide secretion in comparison with wild type, whereas the complementation test showed intermediate values (about 89,8% of wild type results). The test for survivability in presence of antimicrobial agent polymixin B also was conducted. There mutant showed the decreased survival rate. These results allow us to suggest that SlyA plays an important role in the pathogenicity of *Erwinia amylovora*.

The further research will be focused on biofilm formation study, survival ability under different conditions such as hyperosmotic stress, ROS-mediated stress, low pH and other unfavorable conditions that might be faced by bacteria in the host plant.

- 1) Datsenko K. A. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products / K. A. Datsenko, B. L. Wanner // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2000. – Vol. 97, № 12. – P. 6640-6645.
- 2) Ellison D. W. Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family / D. W. Ellison, V. L. Miller // Current Opinion in Microbiology. – 2006. – Vol. 9, №2. – P. 153-159.

### Molecular aspects of *Pectobacterium carotovorum* – *Solanum tuberosum* interaction

Kolubako A.V., Nikolaichik Y.A.

Belarusian State University, Minsk, Belarus

E-mail: kolubakoav@yandex.by

**Key message.** Some molecular aspects of *Solanum tuberosum* immune response to the pectobacterial infection were studied.

**Keywords:** *Solanum tuberosum*, immune response, *Pectobacterium carotovorum*

*Pectobacterium carotovorum* is the broad host range phytopathogen causing bacterial soft rot, beet vascular necrosis, potato blackleg, and slime flux on tree species. All potato cultivars are susceptible to pectobacterial infection, which reduces tubers integrity during storage. That fact exacerbates the necessity of studying the immune responses with the prospect of creating resistant plants.

Goal. To study molecular mechanisms of the immune response of *S. tuberosum* plants to the *P. carotovorum* invasion.

Methods. Infiltration of *S. tuberosum* tubers with bacterial culture suspensions, quantitative PCR.

Gene expression analysis in potato plants inoculated with the wild-type *P. carotovorum* strain showed downregulation of abscisic acid (ABA) biosynthesis genes NCED and AAO3 and upregulation of ABA hydroxylase CYP707 which is bound to decrease this hormone level. ABA level decrease causes derepression of the salicylic acid (SA) signalling pathway and activation of the effector-triggered immunity and hypersensitive response. Also, during infection, expression of JAZ3, the negative regulator of jasmonate-dependent genes was upregulated. Expression of AP2 family transcription factor from the ethylene signalling chain, the was increased. Overexpression of pathogenesis-related genes PR2, PR4 and PR5 was observed. According to the literature, such a reaction can be caused by altering the concentration of ABA which is known to negatively regulate GCC-box-containing genes (PR2 and PR5). Expression of PR1a, the pathogenesis-related gene with antibacterial activity is reduced, as well as the genes PR6 and PR10.

A decrease in expression levels of transcription factors WRKY65 and WRKY71 genes was detected. WRKY65, according to the KEGG database, is related to SA signalling and expression of PR1. WRKY71 is associated with the detection of pathogen-associated molecular patterns through RIN4.

Expression of some F-box-containing components of E3 ubiquitin ligase complex is reduced. According to the literature, overexpression of its ortholog increases resistance to biotrophic pathogens, so its silencing may increase resistance to the necrotrophic pathogen *P. carotovorum* in potato plants.

We are planning to further explore the roles of the most interesting immune response genes in potato plants by changing their expression levels.

### Молекулярные аспекты взаимодействия *Pectobacterium carotovorum* с растениями *Solanum tuberosum*

Колубако А.В., Николайчик Е.А.

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

**Аннотация.** В работе изучены некоторые молекулярные аспекты иммунного ответа растений *Solanum tuberosum* на развитие пектобактериальной инфекции.

**Ключевые слова:** *Solanum tuberosum*, иммунный ответ, *Pectobacterium carotovorum*

*Pectobacterium carotovorum* фитопатоген широкого круга хозяев, вызывающий мягкие гнили, некроз сосудов свеклы, черную ножку стеблей картофеля, гоммоз у древесных растений. Все сорта картофеля подвержены пектобактериальной инфекции, что снижает лежкость клубней при хранении и обостряет необходимость изучения механизмов иммунного ответа с перспективой создания устойчивых растений.

Цель. Изучить молекулярные механизмы иммунного ответа растений *S. tuberosum* на внедрение патогена *P. carotovorum*.

Методы. Инфильтрация клубней *S. tuberosum* суспензиями бактериальных культур, количественная ПЦР.

Измерение уровней экспрессии защитных генов в растениях картофеля при заражении штаммом дикого типа *P. carotovorum* JN42 показало снижение экспрессии генов биосинтеза абсцизовой кислоты (АБК) NCED и AAO3 и сверхэкспрессию гена гидроксиллазы АБК CYP707, что неизбежно снижает уровень активной формы гормона, таким образом, посредством снятия репрессии с салицилатного сигнального пути, происходит запуск эффектор-индуцированного иммунитета и реакции гиперчувствительности. Также при взаимодействии с патогеном повышается уровень экспрессии гена JAZ3, негативного регулятора экспрессии жасмонат-зависимых генов; повышается экспрессия транскрипционного фактора с доменом AP2, звена этиленовой сигнализации. Наблюдается повышение уровня экспрессии защитных генов PR2, PR4, PR5, такая реакция, согласно данным литературы, может быть опосредована изменением концентрации АБК, которая негативно регулирует гены с GCC-боксом (PR2 и PR5). Снижена экспрессия защитного гена с антибактериальной активностью PR1a, а также генов PR6 и PR10.

Показано снижение экспрессии генов транскрипционных факторов WRKY65 и WRKY71. WRKY65, согласно информации базы данных KEGG, связан с салицилатной сигнализацией и экспрессией PR1, а WRKY71 – с детекцией молекулярных паттернов патогенов через RIN4.

Снижена экспрессия некоторых компонентов убиквитинлигазного комплекса, содержащих F-боксы. Согласно данным литературы, сверхэкспрессия ортолога одного из них, повышает устойчивость к биотрофным патогенам, следовательно, сайленсинг его в растениях картофеля может повысить устойчивость к некротрофному патогену *P. carotovorum*.

Планируется подробное изучение роли наиболее интересных генов иммунного ответа растений картофеля путем изменения их уровней экспрессии.

### Molecular mechanisms for the plant promoter efficiency correction

Komakhin R.A., Efremova L.N., Strelnikova S.R.

All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

E-mail: [recombination@iab.ac.ru](mailto:recombination@iab.ac.ru)

**Key message.** The mutations determining functional differences between two highly identical promoters from the chickweed plant were identified. These mutations lead to the formation of hypoosmolarity-responsive cis-element within core promoter and its specific positioning relative to the other cis-elements.

**Keywords:** gene expression, synthetic promoters, cis-elements, genetic engineering of plants

At present, in genetic engineering there is a need for effective promoters for precise and coordinated expression of recombinant genes. This need may be satisfied with the synthetic promoters with predictable properties. Construction of such promoters, however, is restricted by shortage of knowledge on molecular functioning of plant core promoters and absence of reliable methodology of their improvement. Previously, we found that in transient expression in *Nicotiana benthamiana* plants the minimal promoter pro-SmAMP1 (having size 158 bp) from the chickweed plant (*Stellaria media* L.) was up to two times stronger than the other promoter pro-SmAMP2 (having size 161 bp) from the same plant. On the other hand, in the nutrient medium with kanamycin antibiotic pro-SmAMP2 promoter allowed to obtain up to thrice more transgenic shoots of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) that evidenced more constitutive expression pattern of selective gene *nptII* under its control. Meanwhile, the nucleotide sequences of these two promoters are identical by 94% and differ as little as by ten-point mutations outside the canonical cis-elements of core region, viz. TATA box, G-box, CAAT box и transcription start site (TSS). The purpose of present study was the investigation of molecular mechanisms determining the difference of properties of the two highly identical promoters. Employing site-directed mutagenesis, we created ten new synthetic variants of minimal promoter pro-SmAMP2 with substitutions or deletions of polymorphic nucleotides. New variants were assayed by transient expression of the reporter *uidA* gene in *N. benthamiana* plants and by efficiency of expression of selective *nptII* gene in transformed cells of *N. tabacum* at the nutrient medium with kanamycin. It was established that in transient expression the significant superiority of pro-SmAMP1 over pro-SmAMP2 is caused by simultaneous presence of five-point mutations between TATA box and TSS. Of these five mutations two-point substitutions result in arising of PRE cis-element (hypoosmolarity-responsive element) which is known as positive regulator from proximal region of proline dehydrogenase gene promoter in *Arabidopsis* [1]. Two-point deletions are necessary for precise positioning of PRE relative to TATA box and TSS. One more nucleotide substitution probably provides the specific nucleotide context for correct functioning of PRE. Stable (though not statistically significant) positive effect with respect to the strength of the promoters was also provided by three mutations in 5'-untranslated region of *pro-SmAMP1* gene (within *pro-SmAMP1* promoter). By the selection of transgenic tobacco cells at the kanamycin-containing nutrient medium we established that the constitutive pattern of *nptII* gene expression, though insignificantly reduced by the presence of functional PRE element in the pro-SmAMP2 sequence, still remains significantly higher than in case of using pro-SmAMP1. In addition, the pro-SmAMP2 constitutive level was also reduced by another point substitution near the G-box leading to the appearance of the CAANNNNATC motif which is able to change the promoter efficiency under the control of a circadian clock [2]. As a result of experiments the new synthetic modification of pro-SmAMP2 with PRE element in the necessary position was selected. The modification is not inferior to pro-SmAMP1 in transient expression and has the constitutive level comparable to pro-SmAMP2. Thus, the presence and the precise positioning of PRE cis-element between TATA box and TSS of core plant promoter is able to change its properties, including strength and constitutive, significantly. The found combination and mutual positioning of cis-elements may be used for the property's correction of the other plant promoters for sake of coordination of their work.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 19-016-00067.

1. Satoh R., Nakashima K., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. ACTCAT, a novel *cis*-acting element for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2002. 130: 709-719.
2. Piechulla B., Merforth N., Rudolph B. Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Mol Biol* 1998. 38, 655-662.

**Gluten hydrolysing proteases of Sunn pest *Eurygaster integriceps* Put. and related wheat bugs**Konarev Alexander V.<sup>1</sup>, Senderskiy I.<sup>1</sup>, Tsarev A.<sup>1</sup>, Timofeev S.<sup>1</sup>, Zhuravlev V.<sup>1</sup>, Kapustkina A.<sup>1</sup>,Konarev Alexey V.<sup>2</sup>, Lovegrove A.<sup>3</sup>, Dolgikh V.<sup>1</sup><sup>1</sup>All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup>N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia; <sup>3</sup>Rothamsted Research, Harpenden, UK

E-mail: al\_konarev@hotmail.com

**Key message.** Wheat bug salivary gland proteases injected into grain damage gluten proteins responsible for bread quality. The restriction of the activity of these enzymes could be a safe for humans and the environment approach to reduce the detriment.

**Keywords:** Sunn pest, wheat gluten, protease, protease inhibitor, inhibitory antibodies

Salivary gland (SG) proteases (Ps) from Sunn pest *Eurygaster integriceps* and related wheat bugs (WBs) are injected into grain during feeding and cause deterioration of the gluten proteins that are responsible for the most important bread-making qualities. Sunn bug Ps are also of interest as a diagnostic for wheat grain damage and can be used as modifiers of gluten for food technology or to destroy coeliac disease related epitopes in gluten proteins. The aim of the research was to reveal and study main bug Ps responsible for gluten degradation and find safe for humans approaches to limit their destructive activity or use them for practical needs. WBs Ps have been studied for many years, but owing to their complexity and absence of simple detection methods there is still no complete picture of them. *Methods.* The several substrate-containing replicas (with glutenin, gliadin, gelatin and other proteins) were developed for the detection of Sunn pest Ps after isoelectric focusing (IEF) of proteins extracted from bug's SGs or bug-damaged grains [1]. DNA encoding some Ps were cloned and expressed both in bacteria and yeasts [1, 2]. Several types of Ps were detected in wheat grains damaged by Sunn pest and related species from several regions of Russia and Turkey. Two P groups were identified in damaged grains based on pI: neutral Ps (NPs); with isoelectric points (pI) in the range 6.0-7.0 and alkaline Ps (APs), with the majority of pIs higher than 7.0. The NPs hydrolyse both glutenin and gliadin proteins and cause the most gluten deterioration. APs are capable of hydrolysing not only gluten but also animal proteins, gelatin and (or) casein. Analysis of APs showed that some of them were related to bovine trypsin or chymotrypsin. Both NPs and APs retain activity in dry matured grain for many years. Sunn bug Ps show a high degree of variability in terms of IEF patterns both between damaged grain samples and within one sample. IEF patterns of NPs and APs in combination with the micro gluten sedimentation method can be used as additional highly specific diagnostic criteria of wheat grain damage by WBs. NPs were isolated from bug-damaged wheat grain samples collected in Russia and Turkey and partially sequenced. Homologous to trypsins from arthropods and mammals 28 kDa Ps were capable of cleaving HMWGS specifically between the hexa- and nonapeptide repeats. They differed in cleavage site specificity from NPs of WB *Nysius huttoni* (Konarev et al., 2011). The recombinant forms of one of the Sunn pest SG NPs (rGHP3) hydrolysed gluten proteins and also their recombinant homologs. Using antibodies raised to rGHP3 it was found that in vivo GHP3 accumulated in SGs in secretory granules as zymogens which could be activated by trypsin-like Ps [1]. Results indicated that other NPs and also APs pass through the same path of accumulation and activation in SGs. In this research, proline specific endopeptidase, described earlier by Yandamuri et al. (2014), was also detected in bug's SG but damaged grains only contained weak activity of this enzyme. Sunn pest SGs produce a set of diverse GHPs which complicates the task of designing inhibitors to them. Most of APs from bug's SGs or bug-damaged wheat grains can be inhibited by some known inhibitors of plant or animal origin (e.g. STI, aprotinin) [1]. Since APs in some samples can play a significant role in the deterioration of the gluten quality so the search for more effective inhibitors of their activity may be justified. However, NPs, which are the main destructive factors in bug-damaged grains are almost insensitive to all known proteinaceous inhibitors. Only a few inhibitors including some members of potato chymotrypsin inhibitor I family can reduce the activity of these enzymes at high concentrations and can serve as a base for the design of effective inhibitors of Sunn pest NPs. Another approach to the design of specific NP inhibitors is based on the use of antibodies capable of linking to regions of active centre of the P to prevent its interaction with substrate. One of the fragments of polypeptide chain involved in substrate binding was inserted in a chimeric protein and used to produce antibodies in mice. The antibodies obtained inhibited GHP3 activity [3]. Such antibodies could be used in processing technologies or for the development of wheat forms resistant to WBs.

*This work was partially supported by grant 18-08-00828 from Russian Foundation for Basic Research (RFBR). Rothamsted Research receives grant-aided support from the BBSRC: Designing Future Wheat [BB/P016855/1].*

1. Konarev AV. *Asia Pac. Entomol.* 22, 379-85 (2019)
2. Dolgikh V. et al. *Appl. Biochem. Microbiol.* 50, 433-440 (2014)
3. Dolgikh V et al. *Food Science & Nutrition.* 8, :703-8 (2019)

### Characteristics of the polysaccharide-producing culture *Haloterrigena saccharevitans* EG3QL57 isolated from the saltworks at lake Karun (Egypt)

Konnova S.A.<sup>1,3</sup>, Ibrahim I.M.<sup>1,2</sup>, Fedonenko Y.P.<sup>1,3</sup>, Sigida E.N.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>N. G. Chernyshevsky Saratov State University, Saratov, Russia; <sup>2</sup>Fayoum University, Fayoum, Egypt; <sup>3</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS Saratov, Russia

E-mail: Konnovasa@yandex.ru

**Key message.** According to the physiological-morphological and molecular-biological characteristics, the halophilic representative of archaea strain-isolate from the saltworks of lake Karun (Egypt) was identified as *Haloterrigena saccharevitans* EG3QL57. The ability of *H. saccharevitans* EG3QL57 to utilize oil with an efficiency of 27.4%, resistance to the presence of concentrations of up to 5 mm of heavy metals in the growth medium is shown. It is shown that when the growth conditions of microorganisms are optimized, they produce up to 2.3 g/l of exopolysaccharides (EPS).

**Keywords:** *Haloterrigena saccharevitans*, identification of oil utilization, optimization of exopolysaccharide production, resistance to heavy metals

Halophilic archaea are unique microorganisms that are resistant to extreme conditions of existence. Many archaea produce biopolymers that are important for their survival, including exopolysaccharides (EPS), the study of which is relevant both in theoretical terms and from a practical point of view. The purpose of the study: identification and characterization of the properties of the *H. saccharevitans* strain EG3QL57 and the EPS produced by it.

Culture of microorganisms was isolated from artificial solar salt ponds near lake Karun (Arab Republic of Egypt) using a storage culture on the medium of Segal and Gibson (1960), modified by the addition of glucose and salt in optimal concentrations for the culture. EPS-producing microorganisms were selected based on their ability to form donkey colonies. Identification of the microorganism was performed based on the analysis of data from cultural-morphological and molecular-biological studies of the nucleotide sequence of the 16S RNA gene (registration number GenBank MK463953). Studies have shown that on SG-agar microorganisms form small (1.5-2 mm), round, with smooth edges, raised above the surface of the medium colonies of light red or pink color. The cells are gram-negative and mobile. Growth requires at least 2.6 M NaCl, and the optimal concentration is 4.3–5.1 M NaCl. Microorganisms can be classified as chemoorganotrophs, capable of growing in anaerobic conditions in the presence of nitrate.

The ability to degrade crude oil (1 g/l) in a liquid mineral medium that does not contain any other carbon sources has been identified. At the same time, the oil content during cultivation is high. *H. saccharevitans* EG3QL57 for 12 days decreased by 27.4 %. The most effective enzyme systems of *H. saccharevitans* EG3QL57 degraded fractions of paraffins and naphthenes.

It is shown that the culture was resistant to high (up to 5 mM) concentrations of lead and cadmium salts, but responded to the presence of these metal ions in the medium by reducing the yield of biomass by 4.5 times, as well as the amount of EPS by 20 times. The EG3QL57 strain showed less resistance to copper, zinc and nickel salts.

According to the results of optimization of the duration of cultivation, temperature, pH, nature of carbon sources and their concentration, the content of NaCl, the maximum yield of EPS for *H. saccharevitans* EG3QL57 was obtained-2.3 g/l. The EPS of the culture of *H. saccharevitans* EG3QL57 is represented by  $\beta$ -1,6-glucan according to NMR spectroscopy. The emulsifying activity of *H. saccharevitans* EG3QL57 EPS solution with respect to hydrophobic substances (kerosene) was revealed, while the emulsion remained stable for a year.

**Development of a scheme for acclimatization of woody plants regenerants using microbial biopesticides**

Konstantinov A.V., Ostriкова M.Ya., Kulagin D.V.  
Forest Institute of the NAS of Belarus, Gomel, Belarus  
E-mail: avkonstantinof@mail.ru

**Key message.** The effect of isolates and breeding strains on microclonal propagated forest planting material was studied. An increase in survival rate and a stimulating effect in the process of growing *ex vitro* has been established.

**Keywords:** acclimatization, regenerants, strains of PGPR, birch, aspen

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) is of interest for growing of planting material of woody trees. Application of phosphate-mobilizing and nitrogen-fixing bacteria allows to promote the acclimatization of micropropagated plantlets to *ex vitro* conditions.

The study was carried out to examine the effect of fresh microbial suspension of rhizosphere bacteria on the survival rate and growth of birch (*Betula pubescens* Ehrh.) and aspen (*Populus tremula* L.) micropropagated plants during acclimatization to *ex vitro* conditions.

The strains of *Pseudomonas aurantiaca* B162/17, *Ps. fluorescens* pACD1.4, *Ps. mendocina* pAYSCD1.7 and *Ps. mendocina* 9-40, *Rahnella aquatilis* E10 and isolates of *Pseudomonas* sp. 10, *Agrobacterium* sp. 17, *Streptococcus* sp. 35, *Enterobacter* sp. 11 were tested. The bacteria cultures were provided by the Institute of Microbiology of NAS of Belarus and the Faculty of Biology of the Belarusian State University. Plantlets were transplanted into 70 ml pots with the mixture of peat and sand (3:1). The treatment was performed by adding of 5 ml of 10% fresh microbial suspension just after the plant transplantation. Plants were grown under permanent lighting and relative air humidity of about 90%.

On the base of the experiment results we selected four microbial strains (*Ps. fluorescens* pACD 1.4, *Ps. mendocina* 9-40, *Agrobacterium* sp. 17 and *Pseudomonas* sp. 10) for the use in order to promote the adaptation to *ex vitro* conditions of aspen and birch plantlets. The strains mentioned significantly increased survival rate (up to 90-100%) and accelerated the growth (in 1.3-1.5 times) of the experimental plants.

**Разработка схемы акклиматизации регенерантов древесных растений с применением биопрепаратов**

Константинов А.В., Острикова М.Я., Кулагин Д.В.  
Институт леса НАН Беларуси, Гомель, Беларусь

**Аннотация.** Изучено влияние изолятов и селекционных штаммов на микроклонально размноженный лесной посадочный материал. Установлено повышение приживаемости и стимулирующее воздействие в процессе выращивания *ex vitro*.

**Ключевые слова:** акклиматизация, регенеранты, штаммы PGPR, береза, осина

Перспективными объектами для получения широкого спектра экологически безопасных биопрепаратов различного назначения являются штаммы некоторых свободноживущих бактерий, имеющих особое значение в ассоциативных и симбиотических микробных сообществах. Внесение в субстрат ризосферных азотфиксирующих и фосфатмобилизирующих бактерий (PGPR) позволяет оптимизировать корневое питание микроклонов и снизить фитопатогенную нагрузку на растения.

Цель – изучение влияния суточных культур штаммов и изолятов ризосферных бактерий на приживаемость и рост регенерантов березы пушистой (*Betula pubescens* Ehrh.) и осины обыкновенной (*Populus tremula* L.) при акклиматизации к нестерильным почвенным условиям *ex vitro*.

Апробировали штаммы *Pseudomonas aurantiaca* B 162/17, *Ps. fluorescens* pACD 1.4, *Ps. mendocina* pAYSCD 1.7 и *Ps. mendocina* 9-40, *Rahnella aquatilis* E<sub>10</sub> и изоляты *Pseudomonas* sp. 10, *Agrobacterium* sp. 17, *Streptococcus* sp. 35, *Enterobacter* sp. 11), предоставленные Институтом микробиологии и кафедрой генетики БГУ. Микроклональные регенеранты акклиматизировали в кассетах по 54 ячейки объемом 70 мл на торфо-песчаном (3:1) субстрате в течение 45 суток. Обработку проводили при посадке путем полива 5 мл 10% раствора суточных культур бактерий. Выращивали растения в климатической камере в следующих условиях: постоянное освещение лампами «Fluora» (2-4 тыс. люкс), температура 23±2°C, относительная влажность около 90%.

Наиболее благоприятное воздействие на микрорастения березы оказали штаммы *Ps. fluorescens* pACD 1.4 и *Ps. mendocina* 9-40 обработка которыми вызвала достоверное увеличение приживаемости (96-100%) и прироста в 1.3 раза. Повышение приживаемости до 90-96% и увеличение прироста микроклонов осины в 1,4-1,5 раза отметили при применении изолятов *Agrobacterium* sp. 17 и *Pseudomonas* sp. 10. Указанные PGPR были отобраны нами как наиболее перспективные для применения в ходе адаптации микроклональных древесных растений к почвенным условиям.



### Scaling of the promising producer strains cultivation process of fungicidal metabolites

Kozitsyn A.E., Sidorova T.M., Asaturova A.M.

Federal State Budget Scientific Institution "All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection", Krasnodar, Russia

E-mail: KozicinAlexander@gmail.com

**Key message.** The optimal conditions in pilot bioreactors for deep cultivation of the genus *Bacillus* bacteria were selected according to a number of biotechnological parameters, and the dynamics of antifungal compounds synthesis in the process of the culture maintaining was monitored.

**Keywords:** Antagonist bacteria, phytopathogenic fungi, cultivation of the genus *Bacillus* bacteria, optimization of the cultivation process, microbiological product

The aim of the work was to optimize and scale the cultivation process of producer strains of the antifungal bacteria *Bacillus subtilis* BZR 336g and *B. subtilis* BZR 517, promising agents for protecting plants from economically significant diseases caused by phytopathogenic fungi.

In the course of the work, the optimal parameters for the deep cultivation of strains in pilot bioreactors were selected according to the following parameters: cultivation temperature, optimal acidity of the nutrient medium, optimal degree of aeration. We also studied the dynamics of antifungal compounds synthesis and growth characteristics of the *B. subtilis* BZR 336g strain at 32 consecutive passages during 10 months of maintaining the culture.

As an investigation objects we used promising bacterial strains from the BRC (Bio resource collection) "State collection of entomocariophagi and microorganisms" of the Federal State Budget Scientific Institution "All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection": *B. subtilis* BZR 336g, *B. subtilis* BZR 517, as well as test cultures of phytopathogenic fungi *Fusarium graminearum* Schwabe and *F. oxysporum* var. *orthoceras* App. et Wr., *Venturia inaequalis*.

During the study, the optimal cultivation temperature of *B. subtilis* BZR 336g and *B. subtilis* BZR 517 strains in the pilot bioreactor was established. The best growth characteristics were demonstrated by samples cultured at a temperature of + 25 °C.

The degree of aeration influence was determined during the cultivation of *B. subtilis* BZR 336g and *B. subtilis* BZR 517 strains under the conditions of pilot bioreactors. For all the studied strains, the most optimal flow rate of sterile air passing through the culture was 0.6 m<sup>3</sup> / h, while both the largest number of viable cells and the maximum antifungal activity were recorded.

We studied the optimum hydrogen index for *B. subtilis* BZR 336g and *B. subtilis* BZR 517 strains. The optimum pH was in the range from 7 to 8. In this acidity range, the largest number of viable cells was observed at the end of the pilot cultivation cycle.

The synthesis of antifungal compounds and the number of colonies of the forming units of the *B. subtilis* BZR 336g strain were determined at 32 consecutive passages during 10 months of updating of the studied strain culture. The *B. subtilis* BZR 336g strain did not show a tendency to degenerate the culture and decrease the synthesis of antifungal compounds during repeated reseeded of the culture on rich nutrient media under laboratory conditions.

### Масштабирование процесса культивирования перспективных штаммов-продуцентов фунгицидных метаболитов

Козицын А.Е., Сидорова Т.М., Асатурова А.М.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений", Краснодар, Россия

**Аннотация.** Подбирались оптимальные условия глубинного культивирования бактерий рода *Bacillus* в пилотных биореакторах по ряду биотехнологических параметров и отслеживалась динамика синтеза антигрибных соединений в процессе поддержания культуры.

**Ключевые слова:** бактерии-антагонисты, фитопатогенные грибы, культивирование бактерий рода *Bacillus*, оптимизация процесса культивирования, микробиопрепарат

Целью работы являлась оптимизация и масштабирование процесса культивирования штаммов-продуцентов антигрибных соединений бактерий *Bacillus subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517, перспективных агентов для защиты растений от экономически значимых заболеваний, вызываемых фитопатогенными грибами.

В ходе работы подбирались оптимальные параметры глубинного культивирования штаммов в пилотных биореакторах по следующим параметрам: температура культивирования, оптимальная кислотность питательной среды, оптимальная степень аэрации. Так же исследовалась динамика синтеза антигрибных соединений и ростовых характеристик штамма *B. subtilis* BZR 336g при 32 последовательных пересевах в течение 10 месяцев поддержания культуры.

В качестве объектов исследования использовались перспективные бактериальные штаммы из БРК «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов» ФГБНУ ВНИИБЗР: *B. subtilis* BZR 336g, *B. subtilis* BZR 517, а также тест-культуры фитопатогенных грибов *Fusarium graminearum* Schwabe и *F. oxysporum* var. *orthoceras* App. et Wr., *Venturia inaequalis*.

В ходе исследования устанавливалась оптимальная температура культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в пилотном биореакторе. Наилучшие ростовые характеристики продемонстрировали образцы, культивированные при температуре +25°C.

Определялась степень влияния аэрации в процессе культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в условиях пилотных биореакторов. Для всех исследуемых штаммов наиболее оптимальный расход проходящего через культуру стерильного воздуха составил 0,6 м<sup>3</sup>/ч, при этом расходе было зафиксировано как наибольшее количество жизнеспособных клеток, так и максимальная антифунгальная активность.

Исследовался оптимальный водородный показатель для штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517. Оптимум pH находился в диапазоне от 7 до 8. В данном диапазоне кислотности наблюдалось наибольшее количество жизнеспособных клеток по окончании цикла пилотного культивирования.

Определялся синтез антигрибных соединений и количество колоний образующих единиц штамма *B. subtilis* BZR 336g при 32 последовательных пересевах в течение 10 месяцев обновления культуры исследуемого штамма. У штамма *B. subtilis* BZR 336g не обнаружено тенденции к вырождению культуры и снижению синтеза антигрибных соединений в процессе многократного посева культуры на богатых питательных средах в лабораторных условиях.

### The prospect of using clonal micropropagation to conserve the gene pool of natural *Tulipa suaveolens* (Liliaceae) populations

Kritskaya T.A., Kashin A.S., Kasatkin M.Yu.

N. G. Chernyshevsky Saratov State University, Saratov, Russia

E-mail: kritckaiata@gmail.com

**Key message.** Despite the morphological correspondence between the regenerated and natural *Tulipa suaveolens* plants, the ISSR analysis identified a relatively high degree of somaclonal variability between them.

**Keywords:** biodiversity conservation, morphogenesis, somaclonal variation, ISSR

*Tulipa suaveolens* Roth (= *T. schrenkii* Regel) is a decorative bulbous polycarpic of the Liliaceae family and the hypothetical ancestor of garden tulips. Violation of natural steppes leads to a reduction in the number of its populations.

The goals of the study were to obtain *T. suaveolens* regenerated plants *in vitro*, to study the characteristics of their morphogenesis, and to assess their genetic stability using the ISSR markers. Natural *T. suaveolens* specimens were introduced in culture *in vitro*. As the donor material for clonal micropropagation, we used the seedlings obtained from rape seeds that had been cultivated under low temperatures for three months. The selection of the clonal micropropagation protocol stemmed from the data recorded in literature. For testing the somaclonal variability with the ISSR markers, we used the fully formed regenerant plants obtained from the samples of the donor population from the Ozinsky district of the Saratov province.

The plants developed on the covering scales by direct organogenesis. The average number of shoots per seedling was  $4.8 \pm 0.8$  pcs for the nutrient medium containing 0.2 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA (Var1) and  $7.9 \pm 0.5$  pcs for the medium containing 0.5 mg/L BAP + 1.0 mg/L NAA (Var2). The rate of shoot formation was 65.7%. In the control group, a single bulblet developed on the inner surface of the seedling.

In the course of the ISSR analysis, we conducted the PCR of the DNA samples extracted from the initial natural *T. suaveolens* population as well as from the regenerated plants grown in two variants of nutrient media (Var1 and Var2) and obtained 101 bands 300–2500 bp long. The ISSR pattern of the donor plants and *in vitro* cultured regenerated plants were similar but not identical. In the ISSR pattern of the regenerated plants, we found the bands which were absent both in the specimens of the donor population and in the specimens of the adjacent populations studied earlier. Their share was 13.9% for the Var1 regenerants and 15.8% for the Var2 regenerants. Other four bands (3.9%), on the contrary, were present in all donor genotypes and were completely absent in the regenerants. In general, the degree of genetic identity between the regenerants obtained in different variants of the experiment was higher than the degree of identity between the regenerants and the original donor plants. Hence, we suggested that *in vitro* culture *T. suaveolens* genotypes undergo selection or similar changes.

On the UPGMA dendrogram, regenerants formed a separate cluster that was significantly different (bootstrap index 100%) from the cluster consisting of the samples of the donor population. The natural samples, despite their intra-population polymorphism, formed a clear homogeneous cluster.

The ISSR analysis showed a fairly high level of somaclonal variability in *T. suaveolens* regenerated plants obtained as a result of one complete cycle of clonal micropropagation. Furthermore, we noted that the proportion of somaclonal variability increases with an increase in the number of micropropagation cycles.

Thus, we concluded that the fact that during clonal micropropagation *T. suaveolens* genotypes undergo selection and modification contradicts the main mission of germplasm banks. First, the selection of genotypes takes place already at the level of seedlings, and 34.3% of them do not respond to the influence of exogenous growth regulators and do not produce microshoots. Secondly, the bulblets obtained as a result of regeneration have unique bands that are not found in the ISSR pattern of the initial natural population and the populations closest to it, which were studied earlier. For these reasons, we believe that the creation of an *in vitro* germplasm bank for the conservation of the *T. suaveolens* gene pool, at least with the use of clonal micropropagation according to the protocol tested in this work, is impractical.

Taking into account the susceptibility of tulips grown in *ex situ* collections to viral diseases, we propose that the main measures to conserve the *T. suaveolens* gene pool should be the creation, maintenance, and monitoring of the protected natural areas with the restoration of the species population. Also, in order to develop a technology facilitating the efficient preservation of the *T. suaveolens* gene pool in an *in vitro* germplasm bank, it is necessary to identify the plant growth regulators and their combinations that would not have a mutagenic effect on the genome.

*This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant no. 16-04-00142).*

### Correlation between the diversity of xenobiotic catabolism genes in *Rhodococcus* and phytotoxicity of imidazolinone and organophosphate herbicide biotransformation products

Kruglova M.N., Chugunova Y.A., Samkov A.A., Volchenko N.N., Khudokormov A.A.

Kuban State University, Krasnodar, Russia

E-mail: mariya-kruglova-98@mail.ru

**Key message.** *Rhodococcus* strains with a wide spectrum of catabolic genes, have provided a more marked reduction of toxicity of imidazolinone. In the case of glyphosate, the opposite strain-specific pattern is found.

**Keywords:** *Rhodococcus*, herbicides, imazamox, imazapyr, glyphosate

One of the problems of our time is chemical contamination of the biosphere with herbicides, which remain the most effective and cost-effective way to increase yields. Microorganisms, in particular, actinobacteria of the genus *Rhodococcus*, which are characterized by a variety of catabolic pathways, can play an important role in biological detoxification of soil and water. The aim of the work was to identify the relationship between the presence of key catabolic genes, responsible for the degradation of pesticides, and the level of toxicity of a set of biotransformation products of organophosphorus herbicides and imidazolinones by representatives of the genus *Rhodococcus*, in comparison with the initial substances.

All used strains were able to grow on the selected pesticides. Determination of the presence of catabolic genes – *AtzA*, *AtzB*, *AtzC*, *amoA*, *akbA*, *npcB*, *bphA* associated with pesticide degradation in strains of *Rhodococcus erythropolis* B2, *Rhodococcus* spp. F2 and J8 were performed via PCR. To assess the phytotoxicity of the decomposition products of herbicides, the strains were cultivated in a liquid mineral medium with imazamox, imazapyr, and glyphosate. *Beta vulgaris* seeds were treated with supernatants of liquid cultures containing microbial degradation products, as well as solutions of the original pesticides.

It was found that the biotransformation products of all the studied herbicides have a rather high level of inhibition of the growth of the root system of seedlings, the phytotoxicity indicators exceed 60 %, but the negative impact of the initial herbicides is much higher. The strain *Rhodococcus* sp. J8, which did not have any of the studied catabolic genes, showed the greatest effect of inhibiting the growth of the root system by the products of imidazolinone degradation by this strain, which could be associated with large residual concentrations of the original substance. Metabolites of glyphosate transformation by the *Rhodococcus* sp. F2 with the *AtzB*, *AtzC*, and *npcB* genes, as well as the presumed homologue of the *AtzA* gene, were the least toxic to the test plant. *Rhodococcus erythropolis* B2 is presumed to have the *AtzA* gene and the *npcB* gene homolog. The products of imidazolinone biodegradation with this strain had the least effect of inhibiting of the root system, in the case of glyphosate – the greatest.

### Взаимосвязь между разнообразием генов катаболизма ксенобиотиков у родококков и фитотоксичностью продуктов биотрансформации имидазолинонов и фосфорорганических гербицидов

Круглова М. Н., Чугунова Ю. А., Самков А. А., Волченко Н. Н., Худокормов А.А.

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, Россия

**Аннотация.** Штаммы родококков, обладающие широким спектром катаболических генов, обеспечили более выраженное снижение токсичности имидазолинонов. В случае глифосата, штаммоспецифично обнаружена противоположная картина.

**Ключевые слова:** *Rhodococcus*, гербициды, имазамокс, имазапир, глифосат

Одной из проблем современности является химическое загрязнение биосферы гербицидами, которые остаются наиболее эффективным и экономически выгодным способом повышения урожайности. Важную роль в биологической детоксикации и деконтаминации почв и воды могут играть микроорганизмы, в частности, актинобактерии рода *Rhodococcus*, которые характеризуются разнообразием катаболических путей. Целью работы было выявление у представителей рода *Rhodococcus* взаимосвязи между наличием ключевых катаболических генов, ответственных за деградацию пестицидов, и уровнем токсичности набора продуктов биотрансформации фосфорорганических гербицидов и гербицидов ряда имидазолинонов, по сравнению с исходными веществами.

Все исследованные штаммы были способны к росту на выбранных пестицидах. Определение наличия катаболических генов – *AtzA*, *AtzB*, *AtzC*, *amoA*, *akbA*, *npcB*, *bphA*, связанных с деградацией пестицидов, у штаммов *Rhodococcus erythropolis* B2, *Rhodococcus* spp. F2 и J8 проводили при помощи ПЦР. Для оценки фитотоксичности продуктов разложения гербицидов штаммы культивировали на жидкой минеральной среде, где источником углерода и энергии являлись имазамокс, имазапир и глифосат. Семена *Beta vulgaris* обрабатывали супернатантами жидких культур, содержащих продукты микробного распада, а также растворы исходных пестицидов.

Обнаружено, что продукты распада всех исследованных гербицидов оказывают довольно высокий уровень торможения роста корневой системы проростков, показатели фитотоксичности превышают 60 %, но при этом негативное влияние самих гербицидов значительно выше. Штамм *Rhodococcus* sp. J8, у которого не было обнаружено ни одного из исследованных генов, показал наибольший эффект торможения роста корневой системы продуктами деградации имидазолинонов данным штаммом, что могло быть связано с большими остаточными концентрациями исходного вещества. Метаболиты трансформации глифосата штаммом *Rhodococcus* sp. F2, обладающим генами *AtzB*, *AtzC*, *npcB*, а также предположительно гомологом гена *AtzA*, были наименее токсичными в отношении тест-растения. *Rhodococcus erythropolis* B2, предположительно, имеет ген *AtzA* и гомолог гена *npcB*. Продукты разложения имидазолинонов данным штаммом оказывали наименьший эффект торможения корневой системы, в случае глифосата – наибольший.

### The “embryo in planta – callus in vitro” system: cytophysiological aspects (by wheat example)

Kruglova N.N., Seldimirova O.A.

Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Center of RAS, Ufa, Russia

E-mail: Kruglova@anrb.ru

**Key message.** Plant regeneration from calli in vitro is an integral part of a number of biotechnologies. Immature embryos (IE) are particularly promising as explants for obtaining morphogenic calli (MC) in cereals.

**Keywords:** embryo in planta, morphogenic callus in vitro, wheat

The aim of study is to identify the cytophysiological features of “embryo in planta–callus in vitro” system by wheat Zhnitsa cultivar as example. Methods of culture *in vitro*, light and electron microscopy (SEM, TEM), immunocytochemistry, ELISA and the author's periodization of grass embryogenesis were applied. The results of different-age IE culture showed that optimal stage of embryogenesis for obtaining MC is the beginning of organogenesis. In such IE the primordia of scutellum and shoot are laid down, its highly active meristematic cells are not yet covered by a dense wall. MC is formed from the scutellum cells that are in contact with medium. Apparently, the borderline (embryo/medium) position of the scutellum cells promotes the initiation of MC from them, while the successful receipt of the MC formation inducer (2,4-D) is favored by the absence of a dense wall. Localization of endogenous auxins and cytokinins was found in the scutellum and shoot cells. The cytophysiological features of MC in the dynamics of development *in vitro* on induction medium from histologically homogeneous structures to the histological zone installing in them with the formation of morphogenetic foci (MF) are considered. The central zones of MF are represented by highly active meristematic cells, in which endogenous auxins and cytokinins are localized. Thereby in MC the histological and hormonal prerequisites for future implementation of various morphogenesis pathways *in vitro* are created. In our opinion, the leading element of the “embryo in planta – callus in vitro” system is precisely the IE. The competence of IE cells to form MC is determined by its cytophysiological status at the time of inoculation, i.e., the present of meristematic cells of embedded organs in the absence of dense walls, as well as the localization of auxins and cytokinins in them as the key hormones of morphogenesis.

The work was carried out through the state task of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, the project no. 075-00326-19-00 according to theme AAAA-A18-118022190099-6.

### Система «зародыш *in planta* – каллус *in vitro*»: цитофизиологические аспекты (на примере пшеницы)

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

**Аннотация.** Регенерация полноценных растений из каллусов *in vitro* – неотъемлемая часть ряда биотехнологий. В качестве эксплантов для получения морфогенных каллусов (МК) у злаков особенно перспективны незрелые зародыши (НЗ).

**Ключевые слова:** зародыш *in planta*, морфогенный каллус *in vitro*, пшеница

Цель работы – на примере яровой мягкой пшеницы сорта Жница выявить цитофизиологические особенности системы «зародыш *in planta* – каллус *in vitro*». Применены методы культуры *in vitro*, световой и электронной (СЭМ, ТЭМ) микроскопии, иммуноцитохимии, ИФА, а также авторскую периодизацию эмбриогенеза злаков. Результаты культивирования разновозрастных НЗ показали, что оптимальной для получения МК стадией эмбриогенеза является начало органогенеза. В таких НЗ заложены примордии щитка и побега, высокоактивные меристематические клетки которых еще не покрыты плотной стенкой. МК формируется из клеток щитка, находящихся в контакте с питательной средой. По-видимому, пограничное (зародыш/среда) положение клеток щитка способствует инициации из них МК, при этом успешному поступлению индуктора каллусообразования (2,4-Д в оптимальной концентрации) благоприятствует отсутствие плотной стенки. В клетках щитка и побега выявлена локализация эндогенных ауксинов и цитокининов. Рассмотрены цитофизиологические особенности МК в динамике развития на индукционной среде *in vitro* от гистологически однородных структур до становления в них гистологической зональности с формированием морфогенетических очагов (МО). Центральные зоны МО представлены высокоактивными меристематическими клетками, в которых локализованы ауксины и цитокинины. Тем самым в МК создаются гистологические и гормональные предпосылки для будущей реализации различных путей морфогенеза *in vitro*. По нашему мнению, ведущим элементом системы «зародыш *in planta* – каллус *in vitro*» является именно НЗ. Компетентность клеток НЗ к формированию МК определяется его цитофизиологическим статусом в момент инокуляции, т.е. меристематичностью клеток заложившихся органов при отсутствии плотных стенок, а также локализацией в них ауксинов и цитокининов как ключевых гормонов морфогенеза.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № AAAA-A18-118022190099-6.



### A genomic analysis of the catabolism of aromatic compounds in *Azospirillum brasilense* SR80

Kryuchkova Ye.V.<sup>1</sup>, Burygin G.L.<sup>1</sup>, Gogoleva N.E.<sup>2,3</sup>, Gogolev Y.V.<sup>2,3</sup>, Shagimardanova E.I.<sup>3</sup>,

Balkin A.S.<sup>4</sup>, Muratova A.Y.<sup>1</sup>, Turkovskaya O.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, RAS, Saratov, Russia; <sup>2</sup>Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center, RAS, Kazan, Russia; <sup>3</sup>Kazan Federal University, Kazan, Russia;

<sup>4</sup>Center of Shared Scientific Equipment, Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, UB RAS, Orenburg, Russia

E-mail: kryu-lena@yandex.ru

**Key message.** We performed a genomic analysis of the presence and organization of oxygenases involved in the hydroxylation of various substrates, including the aromatic ring, and dioxygenases catalyzing a ring-cleavage of the formed hydroxylated intermediates in *A. brasilense* SR80.

**Keywords:** *Azospirillum brasilense* SR80, genomic sequence analysis, hydroxylated dioxygenases, extradiol dioxygenases, metabolic pathways of aromatic compounds

*A. brasilense* SR80 showed degradation ability toward petroleum (Muratova et al., 2005), however the molecular mechanisms of aromatic degradation in SR80 are unclear. On the other hand, we are understanding, that many evolution processes have occurred allowing bacteria to adapt and survive in rhizosphere riching of complex aromatic molecules.

In this study, a detailed genomic analysis was performed to identify of the presence, organization and genomic surround among oxygenase-encoding genes involved in aromatic catabolism in the *A. brasilense* SR80.

The draft genome sequence has been assembled, annotated and deposited to GenBank (accession number QXHE00000000.1). Well-characterized key oxygenase sequences from Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) were used to search for orthologous sequences. Genomic search of catabolic dioxygenase-encoding genes of four main pathways (catechol, protocatechuate, gentisate and homogentisate) and their peripheral reactions was carried out. Benzoate 1,2-dioxygenase (BenDO), 3-hydroxybenzoate-6-hydroxylase (Mhb6H), nitronate monooxygenase (YrpB), cytochrome P450 (CYP), phthalate 4,5-dioxygenase (PhtDO), aminomethyltransferase (VanOD), *p*-cresol methylhydroxylase (PchH), four markers of the 2OG-Fe oxygenase superfamily (II) and other are represented in genome as nonspecific hydroxylating oxygenases.

The strain SR80 harbored of ring-cleaving extradiol dioxygenases – 4,5-DOPA dioxygenase (LigB), protocatechuate 4,5-dioxygenase subunits alpha and beta (LigAB), type I extradiol dioxygenases, 2,5-dihydroxypyridine 5,6-dioxygenase (NicX), and various transcriptional regulators and transporters in the degradation pathways.

Bioinformatic analysis showed that, in most cases, plant aromatic components were substrates of SR80 catabolic oxygenases. This research significantly improves our understanding of the biodegradative potential of *A. brasilense* SR80 and demonstrates the importance of aromatic catabolism in plant-bacterial interactions.

The genome sequencing, assembly and annotation were supported by the Russian Science Foundation (grant no. 17-14-01363). The genomic analysis was funded by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 18-29-05062).

Muratova A.Iu., Turkovskaia O.V., Antoniuk L.P., Makarov O.E., Pozdniakova L.I., Ignatov V.V. (2005). Oil-oxidizing potential of associative rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. *Microbiology*. Vol. 74, P. 248–254.

**Molecular-genetic identification of arbuscular mycorrhiza fungi from Teberda natural reserve**Kryukov A.A.<sup>1</sup>, Gorbunova A.O.<sup>1,2</sup>, Kurbanniyazov Sh.K.<sup>2</sup>, Mikhaylova Yu.V.<sup>3</sup>,Rodionov A.V.<sup>2,3</sup>, Shishova M.F.<sup>2</sup>, Zhurbenko P.M.<sup>3</sup>, Yurkov A.P.<sup>1</sup><sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia; <sup>3</sup>Komarov Botanical Institute, Saint-Petersburg, Russia

E-mail: rainniar@rambler.ru

**Key message.** Arbuscular mycorrhiza fungi of soil samples from North Caucasus were identified via Illumina Miseq and universal primers for ITS region. It was shown, that both ITS1 and ITS2 are necessary for identification.

**Keywords:** soil microbiome, arbuscular mycorrhiza, symbiogenetics, barcoding, *Glomeromycotina*

Arbuscular mycorrhiza (AM) fungi form a symbiosis with the most species of terrestrial plants, which lead to the increase in nutrition of host plants and improving adaptation to drought and salinization. Despite its significance, a major part of AM fungi has been not identified and corresponded to cryptic taxa. We carried out the identification of AM fungi from soil and plant roots collected in Teberda Nature Reserve via Illumina Miseq. Universal primers were used: three common (ITS5, ITS3, ITS4) and one (5'-CGTTCAAAGATTCGATGATTCAC-3') we developed as the reverse for ITS1 region. Data analysis was carried out using USEARCH and MEGA7 software. There were on an average up to 20 OTUs of AM fungi per sample, which were assigned to several taxa. Obtained OTUs shown high variability in length and nucleotide polymorphism. Identification based on the entire ITS region (with the mixture of primers for ITS1 and ITS2) were more efficient than identification based on only ITS1 or ITS2 region. The most of OTUs belongs to the Glomerales order (mainly to the genus *Rhizophagus*). OTUs from *Diversisporales* and *Archaeosporales* are often not possible to identify to species level and assigned to virtual taxa. Identification of AM fungi by NGS methods together with an assessment of their symbiotic efficiency and a development of the collection of ARRIAM with new effective isolates will promote their practical application in agriculture of the Russian Federation.

The research was supported by RFBR (19-29-05275, and partly 20-016-00245, 18-016-00220).

**Молекулярно-генетическая идентификация грибов арбускулярной микоризы Тебердинского заповедника**Крюков А.А.<sup>1</sup>, Горбунова А.О.<sup>1,2</sup>, Курбанниязов Ш.К.<sup>2</sup>, Михайлова Ю.В.<sup>3</sup>,Родионов А.В.<sup>2,3</sup>, Шишова М.Ф.<sup>2</sup>, Журбенко П.М.<sup>3</sup>, Юрков А.П.<sup>1</sup><sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; <sup>3</sup>Ботанический институт им. В.Л.Комарова, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** С помощью Illumina Miseq и универсальных праймеров на ITS регион проведена идентификация грибов арбускулярной микоризы из почв Северного Кавказа. Выявлена необходимость анализа как ITS1, так и ITS2.

**Ключевые слова:** микробиом почв, арбускулярная микориза, симбиогенетика, баркодирование, *Glomeromycotina*

Известно, что грибы арбускулярной микоризы (АМ), формируя симбиоз с большинством видов наземных растений, способствуют усилению их питания, повышению адаптации к засухе и засолению. Несмотря на значимость, в настоящее время значительная часть АМ грибов не идентифицирована и является криптическими таксонами. Нами проведена идентификация АМ грибов из почв и корней растений Тебердинского заповедника с применением Illumina Miseq и универсальных праймеров (ITS5, ITS3, ITS4 и разработанный нами на участок ITS1 (CGTTCAAAGATTCGATGATTCAC)). Анализ результатов проведен с помощью USEARCH и MEGA7. На образец определяется в среднем до 20 OTUs АМ грибов относимых обычно к нескольким таксонам. Длина и полиморфизм OTUs значительно варьирует. Показана более высокая эффективность идентификации по всему ITS региону (при использовании смеси праймеров на участки ITS1 и ITS2) при сравнении с идентификацией только по ITS1 или ITS2. Значительная часть OTUs относится к порядку Glomerales (большая часть к роду *Rhizophagus*), в то время как, OTU *Diversisporales* и *Archaeosporales* часто не определяются до вида и должны быть отнесены к виртуальным таксонам. Идентификация АМ грибов методами NGS с сопутствующей оценкой симбиотической эффективности и пополнением коллекции ФГБНУ ВНИИСХМ новыми эффективными изолятами будет способствовать их практическому внедрению в сельское хозяйство РФ.

Работа была поддержана РФФИ (19-29-05275, и частично 20-016-00245, 18-016-00220).

### Features of *Origanum vulgare* L. basal metabolism substances in the plants treated with entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis*

Kryzhko A.V., Shirma A.V.

FSBSI "Research Institute of Agriculture of Crimea", Simferopol, Crimea

E-mail: solanum@ukr.net

**Key message.** The treatment with *B. thuringiensis* 888 strain of *O. vulgare* courses the increasing of the sugar content. The sample #2 demonstrated the increasing of ascorbic acid content. So, the treatment can influence the dynamic of protector substances in *O. vulgare* plants.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, *Origanum vulgare* L., metabolism, protector substances

*Origanum vulgare* L. is a valuable essential oil and medicinal culture. One of the main problems of its cultivation is a protection from one of the main pest belonging to the group of *Eriophye* ssp. The entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* can be used for this purpose. However, the effect of this entomopathogen on the metabolism and the main indicators of the physiological state of oregano plants is not studied.

The purpose of this work is to study the features of basic metabolism substances content in the leaves of *O. vulgare* when treating plants with entomopathogenic bacteria *B. thuringiensis*.

The liquid spore culture of the strain *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 888 from the Crimean collection of microorganisms of the FSBSI "Research Institute of Agriculture of Crimea" (registered on the website <http://www.ckp-rf.ru> under the number 507484) used as a research material. As well as a varieties of *O. vulgare* #1 with a predominant content of germacrene D (21.5%) and  $\beta$ -caryophyllene (19.4%), #2 with a content of  $\alpha$ -terpineol up to 59.85% and G4 with a content of carvacrol up to 52.04%.

The content of green pigments was measured spectrophotometrically according to the method of V. F. Gavrilenko et al., 1975 in wavelength 665 and 649 (chlorophylls a and b). The total content of soluble carbohydrates in plants was determined using phenolic compounds according to Dubois M. et al. (1956). The amount of ascorbic acid in the leaves was determined by Okuntsov M.M. et al. (1974), and phenolic compounds by titrimetric method by Zaprometov M.N. (1974).

There were no significant fluctuations in the content of chlorophyll in the vegetative shoots of *O. vulgare* on the 10th day after treatment with a liquid spore culture of the strain *B. thuringiensis* 888. However, a 2-fold decrease of the chlorophyll content in sample #2 and a 1.4-fold increase in its content in the G4 sample was observed on day 20.

The mass fraction of phenolic compounds in all studied varieties of oregano varied within 18.8-19.5 % of the completely dry mass and sugars within 89.6-141.0 % on the 10th day after treatment. Excepted the sample #2, for which the culture of the *B. thuringiensis* 888 strain showed a simultaneous increase in the sugar content to 141.0% (by 30.8% to control) and a decrease in the content of phenolic compounds to 13.03 % (by 20.35% to control). On day 20 after treatment, the strain 888 showed an increase of the phenolic compounds mass fraction in the samples #2 and G4 by 24.9 and 29.8%, respectively, to control. There were no significant fluctuations in the content of compounds in sample # 1 after the treatment with strain 888. The quantity of sugars increased in all the studied samples, especially #1 to 96.2% and #2 to 116.1% of the raw mass (by 28.9 and 37.2 % of the control, respectively).

There is no a significant impact on the ascorbic acid content in the leaves of oregano during the whole experiment. Only in the sample number one we observed the increasing of this compound to 23.6% on day 10 experiment.

Thus, the treatment with *B. thuringiensis* 888 strain of all the *O. vulgare* samples courses the increasing of the sugar content. The sample #2 demonstrated the increasing of ascorbic acid content. So, the treatment can influence the development of ecological plasticity and protector substances of the different chemical nature accumulation in *O. vulgare* plants.

The work was performed within the State tasks of Russian Ministry of education and science AAAA19-119022590066-3 and AAAA16-116022610119-2.

### Comparative analysis of microbial communities from phosphorus-polluted sites from Northern (Russia) and Southern (Israel) latitudes

Kublanovskaya A.A., Zaytsev P.A., Chekanov K.A., Fedorenko T.A., Vasilieva S.G., Solovchenko A.E., Lobakova E.S.  
Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia  
E-mail: annakublanovskaya@gmail.com

**Key message.** the biodiversity of microbial communities from phosphorus-polluted sites from Northern and Southern regions was investigated, groups of microorganisms with biotechnological potential were detected. According to the results, samples from Southern regions were characterized by lower biodiversity than the northern ones.

**Keywords:** microbial communities, metagenomics, phosphorus pollution

Microbial communities formed in inorganic phosphorus-polluted habitats are potential source of microorganism strains capable of luxury phosphorus uptake. These microorganisms hold promise for application in the environmental biotechnologies for phosphorus biocapture from waste streams.

Water and soil samples were collected at two phosphorus-polluted sites near the rock phosphate mines (i) in Russia (67°34'03"N, 33°23'36"E; five samples referred to as Northern samples) and (ii) drying wastewater lagoons in Israel (31°09'00.1"N 35°22'38.3"E; two samples referred to below as Southern samples). The samples were investigated by bright field and luminescent microscopy. Their bacterial biodiversity was studied by 16S rRNA metabarcoding (Illumina sequencing of V4 fragment of 16S rRNA gene amplicons with subsequent analysis of the resulting sequences with QIIME v 1.9.1 and SILVA 119 reference database; the  $\alpha$ - and  $\beta$ -diversity was estimated using VAMPS software).

A significant difference was found between the bacterial biodiversity of the Northern and Southern phosphorus-polluted sites, although their oxygenic phototroph composition exhibited a certain degree of similarity.

The samples from the Northern group displayed a highly similar, rich biodiversity (excepting the sample from an ephemeral reservoir). A broad range of prokaryotes from Proteobacteria, Firmicutes, and Actinobacteria phyla was detected including those from the genera *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, and *Chthoniobacter*.

A narrower biodiversity with a major fraction of cyanobacteria was observed both in dry and liquid Southern samples. Our 16S rRNA metabarcoding study showed the abundance of representatives of Proteobacteria and Bacteroidetes phyla. In their low biodiversity, the Southern samples were similar to the Northern sample from the ephemeral reservoir. It is likely that the limited biodiversity reflects the ephemeral type of these reservoirs. A high cyanobacterial abundance in the Southern samples can be explained by their competitive advantage in warm, phosphorus-enriched waters.

Financial support of Russian Foundation for basic Research (project 18-29-25050) is greatly appreciated.

### Сравнительный анализ микробных сообществ из южных (Израиль) и северных (Россия, г. Апатиты) регионов с повышенным содержанием фосфора в среде

Кублановская А.А., Зайцев П.А., Чеканов К.А., Федоренко Т.А., Васильева С.Г., Соловченко А.Е., Лобакова Е.С.  
Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

**Аннотация.** Изучено биоразнообразие сообществ из регионов северных и южных широт с повышенным содержанием фосфора в среде, выявлены группы микроорганизмов с биотехнологическим потенциалом.

**Ключевые слова:** микробные сообщества, метабаркодинг, фосфор

Микробные сообщества, сформировавшиеся в местообитаниях с повышенным содержанием фосфора в среде, – источник штаммов, потенциально способных к его избыточному поглощению. Такие микроорганизмы перспективны для изучения и последующего применения в биотехнологиях для изъятия фосфора из сточных вод.

Образцы воды и грунта были отобраны в двух регионах с повышенным содержанием фосфатов в среде. В окрестностях г. Апатиты (северный регион, Россия, 67°34'03"N, 33°23'36"E) отобрано пять проб, из пересыхающих водоемов со сточными водами (южный регион, Израиль, 31°09'00.1"N 35°22'38.3"E) – два образца. Оценка биоразнообразия сообществ проведена с помощью световой микроскопии и 16S-метабаркодинга. Анализ библиотек ампликонов проведен с помощью программы QIIME v.1.9.1 и референсной базы SILVA 119. Изучение  $\alpha$ - и  $\beta$ -разнообразия сообществ проведено с помощью онлайн ресурса VAMPS.

Сообщества микроорганизмов, выделенные из северных и южных широт, значительно различались по разнообразию прокариот. Первая группа образцов характеризовалась повышенным биоразнообразием, за исключением пробы эфемерного водоема (тип «лу́жа»). Среди бактерий доминирующими являлись представители филумов Proteobacteria, Firmicutes и Actinobacteria. Общими для данных проб являлись представители родов *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas* и *Chthoniobacter*. По-видимому, данные бактерии являются компонентами корового микробиома фикосферы узкого круга окислительных фототрофных микроорганизмов, отмеченных в сообществах.

Пробы из южного региона характеризовались более низким разнообразием бактерий по сравнению с образцами северных широт. Были отмечены представители филумов Proteobacteria и Bacteroidetes, а также высокое содержание цианобактерий. Сниженное биоразнообразие сближало данные образцы с пробой водоема «лу́жа» из северного региона. По-видимому, это отражает эфемерный характер данных водоемов. Более широкая представленность цианобактерий по сравнению с пробами из северного региона в пробах из южного региона является, вероятно, следствием большей приспособленности цианобактерий к теплым водам с высоким содержанием фосфора.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-29-25050.



### **Hormonal balance of plants and its relationship with changes in plant growth and productivity under the influence of rhizospheric bacteria**

*Kudoyarova G.R., Arkhipova T.N., Veselov D.S., Vysotskaya L.B.*  
Ufa Institute of Biology RAS, Ufa, Russia  
E-mail: guzel@anrb.ru

**Key message.** Here we analyze the dependence of the growth and water relations on the ability of bacteria to influence the content and distribution of abscisic acid (ABA) in plants under different growing conditions.

**Keywords:** rhizobacteria, hormones plant growth, resistance

The ability of rhizospheric bacteria to produce hormones is considered as one of important mechanisms of plant growth promotion by bacteria. However, in vitro evaluation of these properties of bacteria is not enough to predict their effectiveness as plant growth regulators.

The work was aimed at detecting bacteria-induced changes in the level and distribution of ABA in plants and their role in the regulation of water relations and plant growth under stressful conditions.

The effect of a number of rhizobacteria from the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* on the content and distribution of abscisic acid (ABA) in plants was studied. Plants of lettuce, wheat and barley were grown on the background of drought, salinity and oil pollution of the soil.

Treatment with certain bacterial strains reduced the level of ABA accumulation induced by drought in lettuce plants, as did salinization and oil pollution of the soil – in wheat and barley plants, respectively, which was accompanied by activation of plant growth. Stomatal closure known to be induced by this hormone reduces water losses, but this effect disturbs gas exchange and inhibits photosynthesis. Therefore, optimization of the ABA level can help maintaining stomatal conductivity and plant growth under stressful conditions. It is important that under these conditions, bacterial treatment did not lead to a decrease in plant water content, which indicates a balanced evaporation of water by leaves and its influx from the roots. The accumulation of ABA in the roots of plants, recorded by us, in particular, under the effect of salinization on barley plants against the background of their treatment with *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14, could contribute to the flow of water from the roots. The potential role of ABA in this case lies in its ability to increase the number of water channels of aquaporins, as well as to accelerate the deposition of suberin, limiting the possible losses of water during its transport from the roots to the shoot. Optimization of ABA transport under the influence of effective strains of bacteria increases plant stress resistance. The ability of bacteria to influence this process may be used in the selection of potentially effective strains. This work was supported in part by RFBR grants № 18-04-00577, № 18-29-05025 and № 20-04-00305.

### **Гормональный баланс растений и его связь с изменением роста и урожайности растений под влиянием ризосферных бактерий**

*Кудоярова Г.Р., Архипова Т.Н., Веселов Д.С., Высоцкая Л.Б.*  
Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, Россия

**Аннотация.** Проведен анализ зависимости роста и водного обмена растений от способности ризобактерий влиять на содержание и распределение абсцизовой кислоты (АБК) в растениях при разных условиях их выращивания.

**Ключевые слова:** ризобактерии, гормоны, рост растений, устойчивость, урожайность

Способность ризосферных бактерий продуцировать гормоны считается важным механизмом активации под их влиянием роста растений. Однако оценки этих свойств бактерий *in vitro* недостаточно для предсказания их эффективности.

Работа была направлена на выявление вызванных бактериями изменений в уровне и распределении АБК в растениях и их роли в регуляции роста растений в стрессовых условиях.

Изучено влияние ряда ризобактерий из родов *Bacillus* и *Pseudomonas* на содержание и распределение АБК в растениях салата, пшеницы и ячменя, которые выращивали на фоне засухи, засоления и загрязнения почвы нефтью.

Обработка некоторыми штаммами бактерий снижала уровень накопления АБК, индуцированного засухой у растений салата, а также засолением и загрязнением почвы нефтью - у растений пшеницы и ячменя, соответственно, что сопровождалось активацией роста растений. Известно, что вызванное этим гормоном закрытие устьиц снижает потери воды, однако этот эффект нарушает газообмен и ингибирует фотосинтез. Поэтому оптимизация уровня АБК может способствовать поддержанию устьичной проводимости и роста растений в стрессовых условиях. Важно, что в этих условиях бактериальная обработка не приводила к снижению оводненности растений, что свидетельствует о сбалансированности испарения воды листьями и ее притока из корней. Поддержанию притока воды могло способствовать накопление АБК в корнях растений, зарегистрированное нами, в частности, при действии засоления на растения ячменя, обработанные *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14. Потенциальная роль АБК в этом случае заключается в ее способности увеличивать количество водных каналов аквапоринов, а также ускорять отложение суберина, ограничивающего возможные потери воды при ее транспорте из корней в побег. Полученные нами данные свидетельствуют о способности бактерий влиять не только на уровень АБК, но и на ее транспорт по растению, от которого зависит распределение гормона между побегом и корнем. Оптимизация транспорта АБК под влиянием эффективных штаммов бактерий повышает их стресс-устойчивость. Способность бактерий влиять на этот процесс может быть использована при отборе потенциально эффективных штаммов. Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ № 18-04-00577, № 18-29-05025 и № 20-04-00305.

**Characterization of pea (*Pisum sativum* L.) microRNAs**

Kulaeva O.A.<sup>1</sup>, Zorin E.A.<sup>1</sup>, Romanyuk D.A.<sup>1</sup>, Gordon M.L.<sup>1</sup>, Gribchenko E.S.<sup>1</sup>, Shtark O.Y.<sup>1</sup>, Afonin A.M.<sup>1</sup>,  
Tikhonovich I.A.<sup>1,2</sup>, Zhukov V.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia  
E-mail: okulaeva@arriam.ru

**Key message.** Pea microRNAs and their targets were identified, and their differential expression was analyzed during the development of symbiosis with rhizobia and mycorrhizal fungi, and under conditions of abiotic stress caused by cadmium.

**Keywords:** microRNA, pea, symbiosis, gene expression

MicroRNAs play a key role in regulation of gene expression in processes of plant development, biotic and abiotic interactions. Development of high throughput sequencing technologies provides the opportunity to study the full set of small regulatory RNAs even in non-model objects. Pea (*Pisum sativum* L.) is one of the oldest objects of plant genetics and a valuable crop. To date, small regulatory RNAs of pea remain undetected.

The aim of the study was to sequence and to characterize pea microRNAs and their targets, and to analyze changes in their expression level in different conditions.

Libraries of small RNAs isolated from the roots, nodules and shoots of pea plants were prepared and sequenced in GenXPro (Germany). Target genes of microRNAs were analyzed by "degradome" sequencing, which made it possible to identify cleavage sites in transcripts. Different pea lines were used for the analysis of differential expression: wild-type lines Frisson and SGE; supernodulating mutants P88 and P64, obtained after mutagenesis of line Frisson; cadmium-tolerant mutant SGEcdt, obtained after mutagenesis of line SGE.

The analysis revealed 281 microRNAs, of which 140 have conserved sequences. Analysis of degradome revealed 1238 probable target for the identified microRNAs. For a number of transcripts, the regulation by more than one miRNA is shown. It was shown that some pea microRNAs are involved in the regulation of several transcripts.

Constitutive expression of some microRNAs was detected in pea roots and nodules, collected at different stages of development. These microRNAs can be considered as reference sequences for the further study of expression by real-time PCR. A number of microRNAs involved in response to inoculation with rhizobia and mycorrhizal fungi have been identified that are presumably involved in nodule autoregulation processes controlled by the CLAVATA system. Without inoculation, expression of Ps169 and Ps393 microRNA was significantly reduced in the mutant P88, while Ps160 miRNA expression was enhanced in the mutant P64. Rhizobia inoculation reduced the level of expression of a large number of microRNAs in the mutant P88, while during mycorrhization, the level of corresponding microRNAs was reduced in both mutant lines compared to the Frisson genotype. The target genes of the identified microRNAs are associated with the regulation of gene expression, including the Auxin Response Factors family; homologues of NAM (No apical meristem) proteins associated with the meristem formation; components of ribosome; peroxidases and proteins associated with the transmission of intracellular signals. A comparative analysis of gene expression in Frisson, P64, P88 revealed multidirectional expression in response to inoculation with rhizobia and mycorrhizal fungi of a sequence homologous to the MtNF-YA1 - a key transcriptional regulator of nodule development in *Medicago truncatula*. The P64 line showed a reduced level of expression of this gene compared to the P88 line.

We also studied the change in the expression of microRNAs and their targets under abiotic stress caused by heavy metals, in particular cadmium. It was found that cadmium causes a change in the expression of a number of microRNAs, while no difference between the cadmium-sensitive and cadmium-tolerant genotypes was detected. Generally, cadmium caused increase of microRNA expression. Analysis of the targets of the identified microRNAs showed that the processes of response to abiotic stress were the most affected ones.

The work was supported by the Russian Science Foundation (Grant # 17-76-30016).

### Plant-microbial fuel cell with using the lettuce during cultivation by panoponic

Kuleshova T.E.<sup>1,2</sup>, Galushko A.S.<sup>2</sup>, Gall N.R.<sup>1</sup>, Panova G.G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ioffe Institute, St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Agrophysical Research Institute, St. Petersburg, Russia

E-mail: [www.piter.ru@bk.ru](mailto:www.piter.ru@bk.ru)

**Key message.** The experimental plant-microbial fuel cell based on the gradient of bioelectric potentials created in the rhizosphere and compatible with the production of plant products was created and tested.

**Keywords:** plant-microbial fuel cell, bioelectric potential, lettuce, panoponic

Bioelectrochemical systems are an alternative renewable source of energy resources. Currently, the development of technology for generating electricity through the interaction of plants and microorganisms, called the plant-microbial fuel cell (PMFC), is relevant [1].

The purpose of the work was to experimentally study the possibility of organizing PMFC based on bioelectric potentials (BEP) created in the rhizosphere, and to develop an experimental PMFC cell using an agriculturally significant culture.

Lettuce Azart was chosen as an object of study. The tests were carried out under conditions of intense photoculture, HPS lamps were used to illuminate the plants, the irradiation was 70-75 W/m<sup>2</sup>. Knop solution was used for plant nutrition. To remove the generated biocurrents, we used the non-invasive method of automatic recording of BEP developed by us [2], which is also suitable for monitoring the state of plant organisms and recording electrophytograms. When choosing the configuration of PMFC – the location and materials of electrode systems, substrate for plants, the system of plant growth on a thin-layer and low-volume soil analogue – panoponic was taken as the basis [3].

The possibility of using the developed technology for establishing non-invasive contacts to the root systems of plants to create long-lasting plant-microbial fuel cells based on the use of the electrical activity of plants as an electromotive force is shown. Selected electrode materials based on graphite felt are characterized by high electrical conductivity, chemical stability, biocompatibility and do not affect the vital activity of plants. The maximum current value obtained in the prototypes of PMFC was 83 nA per test volume of the plant growth zone of 0.0023 m<sup>3</sup>. The maximum value of the biopotential obtained from one element on the 16th day of the growing season was 250 mV; on average, the BEP was about 150 mV.

Thus, the gradient of bioelectric potentials created in the process of plant growth in the rhizosphere, together with the work of microorganisms, can become an alternative source of environmentally friendly bioelectricity.

### Растительно-микробный топливный элемент на примере салата при культивировании методом панопоника

Кулешова Т.Э.<sup>1,2</sup>, Галушко А.С.<sup>2</sup>, Галль Н.Р.<sup>1</sup>, Панова Г.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>Агрофизический научно-исследовательский институт, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** На основе создаваемого в ризосферной зоне градиента биоэлектрических потенциалов создан и испытан экспериментальный растительно-микробный топливный элемент, совместимый с получением растительной продукции.

**Ключевые слова:** растительно-микробный топливный элемент, биоэлектрический потенциал, салат, панопоника

Биоэлектрохимические системы являются альтернативным возобновляемым источником энергетических ресурсов. В настоящее время актуальным является развитие технологии для выработки электроэнергии посредством взаимодействия растений и микроорганизмов, названной растительно-микробный топливный элемент (РМТЭ) [1].

Цель работы заключалась в экспериментальном изучении возможности организации РМТЭ на основе биоэлектрических потенциалов (БЭП), создаваемого в ризосферной зоне, и разработке экспериментальной ячейки РМТЭ с использованием сельскохозяйственно значимой культуры.

В качестве объекта исследования был выбран салат сорта Азарт. Испытания проводили в условиях интенсивной светокультуры, для освещения растений использовали лампы ДНаТ, облученность составляла 70-75 Вт/м<sup>2</sup>. Для питания растений использовали раствор Кнопа. Для съема генерируемых биотоков применялся разработанный нами неинвазивный метод автоматической регистрации БЭП [2], пригодный также для отслеживания состояний растительных организмов и записи электрофитограмм. При выборе конфигурации РМТЭ – расположения и материалов электродных систем, субстрата для растений за основу была взята система выращивания растений на тонкослойном и малообъемном аналоге почв – панопоника [3].

Показана возможность использования разработанной технологии установления неинвазивных контактов к корневым системам высших растений для создания длительно работающих растительно-микробных топливных элементов, основанных на применении электрической активности растений в качестве электродвижущей силы. Выбранные электродные материалы на основе графитового войлока характеризуются высокой электропроводностью, химической стабильностью, биосовместимостью и не влияют на жизнедеятельность растений. Максимально полученное значение тока в прототипах РМТЭ составило 83 нА на исследуемый объем зоны роста растений 0,0023 м<sup>3</sup>. Максимальное значение биопотенциала, полученное с одного элемента на 16-й день вегетации, составило 250 мВ; в среднем БЭП был порядка 150 мВ.

Таким образом, создаваемый в процессе роста растений градиент биоэлектрических потенциалов в ризосферной зоне совместно с работой микроорганизмов может стать альтернативным источником экологически чистого биоэлектричества.

1. Kabutey F.T., Zhao Q., Wei L., Ding J., Antwi P., Quashie F.K., Wang W. An overview of plant microbial fuel cells (PMFCs): Configurations and applications //Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2019. V. 110. P. 402-414.

2. Кулешова Т.Э., Бушлякова А.В., Галль Н.Р. Неинвазивное измерение биоэлектрических потенциалов растений //Письма в ЖТФ. 2019. Т. 45. №. 5. С. 6-8.

3. Panova G.G., Chernousov I.N., Udalova O.R., Alexandrov A.V., Karmanov I.V., Anikina L.M., Sudakov V.L., Yakushev V.P. Scientific and technical basis year-round obtaining high yields of quality plant products under artificial light //Reports of the Academy of Agricultural Sciences [Doklady RASHN]. 2015. №. 4. P. 17-21.

**Chemically induced mutagenesis of diploid wheat *Triticum sinskajae* A. Filat. et Kurk.**

Kuluev A.R., Zaikina E.A., Kuluev B.R., Chemeris A.V.

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,  
Ufa, Russia

E-mail: kuluev.azat91@mail.ru

**Key message.** Mutagenesis of *Triticum sinskajae* was performed using sodium azide. The optimal concentration was 0.1 mM. Changes were observed in the length of the spike and stem in the experimental plants as compared with the control ones.

**Keywords:** *T. sinskajae*, mutagenesis, sodium azide, selection, ISSR analysis.

The cultivation tradition of eincorn wheat is still preserved in many countries of the world, however, of these wheats only *Triticum sinskajae* A. Filat. et Kurk is easily threshed, but it is this diploid form that is not cultivated in the fields. It is characterized by rapid growth, early maturity and the highest protein content among diploid wheats. It is these qualities that make this type of wheat very attractive for domestication and cultivation. But along with this, *T. sinskajae* lacks genetic polymorphism. To overcome this barrier, chemically induced mutagenesis can be used. The aim of this study is to create mutant forms of *T. sinskajae* to increase its level of polymorphism. We performed chemically induced mutagenesis using sodium azide (NaN<sub>3</sub>) at concentrations from 0.1 mM to 0.6 mM. To evaluate the mutagenic and toxic effects of sodium azide, a morphometric analysis was carried out, consisting in measuring the height of the stem and the length of the spike. To evaluate the total mutagenic effect of sodium azide on *T. sinskajae*, we performed an ISSR analysis of plants exposed to the mutagen. When using a 0.1 mM sodium azide concentration, more than half of all treated seeds emerged, whereas without treatment with mutagen (control in phosphate buffer), the seed germination of *T. sinskajae* approached 100%. In general, among the experimental plants, a decrease in the growth rate and a slowdown in development were observed. The height of the stem of the experimental plants were lower than the control. According to the length of the spike, the experimental plants had a decrease compared with the untreated mutagen control. As a result of the ISSR analysis, there was a clear demarcation between experimental plants and other species and lines, which suggests that chemically induced mutagenesis can be assessed using ISSR analysis. Also, in all our studies, the cluster *T. monococcum* - *T. boeoticum* - *T. sinskajae* was determined, while *T. urartu* was always farther from these species. So, we obtained potentially mutant forms of *T. sinskajae* using by sodium azide. Further development in this direction is the improvement of economically useful signs of *T. sinskajae* for domestication.

**Химически индуцированный мутагенез диплоидной пшеницы *Triticum sinskajae* A. Filat. et Kurk.**

Кулуев А.Р., Заикина Е.А., Кулуев Б.Р., Чемерис А.В.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук,  
Уфа, Россия

Был проведен мутагенез *Triticum sinskajae* при помощи азиды натрия. Оптимальная концентрация составила 0.1 Мм. Наблюдались изменения в длине колоса и стебля у опытных растений по сравнению с контрольными.

**Ключевые слова:** *T. sinskajae*, мутагенез, азид натрия, селекция, ISSR-анализ.

Традиции возделывания пшениц-однозернянок до сегодняшнего дня сохраняется во многих странах мира, однако из этих пшениц лишь *Triticum sinskajae* A. Filat. et Kurk. является легкообмолачиваемой, но именно эта диплоидная форма на полях не выращивается. Она характеризуется быстрым ростом, скороспелостью и наивысшим показателем содержания белка среди диплоидных пшениц. Именно эти качества делают данный вид пшениц весьма привлекательным для доместикации и окультуривания. Но вместе с этим у пшеницы Синской отсутствует генетический полиморфизм. Для преодоления этой преграды можно использовать химически индуцированный мутагенез. Целью данного исследования является создание мутантных форм пшеницы Синской для увеличения ее уровня полиморфизма. Мы проводили химически индуцированный мутагенез с помощью азиды натрия (NaN<sub>3</sub>) при концентрациях от 0,1 мМ до 0,6 мМ. Для оценки мутагенного и токсического эффектов азиды натрия проводили морфометрический анализ, заключающийся в измерении высоты стебля, длины колоса. Чтобы оценить общий мутагенный эффект азиды натрия на *T. sinskajae*, мы провели ISSR-анализ подвергнутых действию мутагена растений. При использовании концентрации азиды натрия 0,1 мМ всходила более половины всех обработанных семян, тогда как без обработки мутагеном (контроль в фосфатном буфере) всхожесть семян пшеницы Синской приближалась к 100%. В целом, среди опытных растений наблюдалось уменьшение скорости роста и замедление развития. По высоте стебля опытные растения оказались ниже контрольных. По длине колоса, у опытных растений было уменьшение по сравнению с необработанным мутагеном контролем. В результате ISSR-анализа было четкое разграничение опытных образцов от остальных видов и линий, что говорит о том, что проведенный химически индуцированный мутагенез можно оценивать с помощью ISSR-анализа. Также во всех наших исследованиях определялся кластер *T. monococcum* – *T. boeoticum* - *T. sinskajae*, в то время как *T. urartu* всегда был дальше от этих видов. Итак, нами при помощи азиды натрия были получены потенциально мутантные формы *T. sinskajae*. Дальнейшее развитие в этом направлении – это улучшение хозяйственно-полезных признаков *T. sinskajae* для доместикации.

### Growth of tobacco hairy roots with constitutive expression of the *NtEXPA5* expansin gene

Kuluev B.R., Musin H.G., Gumerova G.R., Chemeris A.V.

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,  
Ufa, Russia

E-mail: kuluev@bk.ru

**Key message.** Tobacco hairy roots with constitutive expression of the *NtEXPA5* expansin gene were obtained and analyzed, which were characterized by higher growth rates and increased productivity under normal conditions, as well as the action of stress factors.

**Keywords:** expansins, hairy roots, salinity, heavy metals, *Nicotiana tabacum*

Expansins are non-enzymatic proteins involved in the softening of cell walls, the mechanism of action of which is associated with the weakening and breaking of hydrogen bonds between xyloglucans and cellulose microfibrils. Earlier, the protective role of expansins under the influence of stress factors such as drought, heat, and salinity was shown using transgenic plants. In addition to transgenic plants, a promising system for the production of biologically active substances is hairy roots cultures, which in biotechnological production can also be exposed to stress factors associated with changes in the composition of the medium, temperature, etc. Therefore, the creation of not only highly productive, but also stress-resistant hairy roots is very important. Based on this, the goal of our work was to obtain hairy roots of tobacco with constitutive expression of the *NtEXPA5* expansin gene and evaluate their growth parameters under normal cultivation conditions and under the action of stress factors. To obtain hairy roots, transgenic tobacco plants *Nicotiana tabacum* L. cultivars of the Petit Havana strain SR1 line with the constitutive expression of the *NtEXPA5* gene of generation T3, which we obtained earlier, were subjected to *Agrobacterium*-mediated transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. The constitutive expression of the *NtEXPA5* tobacco expansin gene promoted higher growth rates and increased productivity of hairy roots under normal conditions. Tobacco hairy roots overexpressing the *NtEXPA5* gene were characterized by increased tolerance to NaCl, mannitol, cadmium acetate and CuSO<sub>4</sub>. Based on the obtained data, our tested genetic engineering construct with the *NtEXPA5* gene can be proposed for obtaining hairy roots with improved growth parameters and increased productivity under both normal and stress conditions. As part of this work, we are discussed the prospects of using hairy roots of tobacco as a model object for quick testing of targeted genetically engineered constructs designed for creation of transgenic plants.

This work was supported by the RFBR grant No. 18-04-00118 A.

### Рост волосовидных корней табака с конститутивной экспрессией гена экспансина *NtEXPA5*

Кулueв Б.Р., Мусин Х.Г., Гумерова Г.Р., Чемерис А.В.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

**Аннотация.** Были получены и проанализированы волосовидные корни табака с конститутивной экспрессией гена экспансина *NtEXPA5*, которые характеризовались более высокими темпами роста и повышенной продуктивностью при нормальных условиях, а также действию стрессовых факторов.

**Ключевые слова:** экспансины, волосовидные корни, засоление, тяжелые металлы, *Nicotiana tabacum*

Экспансины – это неферментативные белки участвующие в размягчении клеточных стенок, механизм действия которых связан с ослаблением и разрывом водородных связей между ксиланоглюканами и микрофибриллами целлюлозы. Ранее нами на примере трансгенных растений была показана защитная роль экспансинов при действии таких стрессовых факторов как засуха, жара и засоление. Кроме трансгенных растений перспективной системой для продуцирования биологически активных веществ являются культуры волосовидных корней (hairy roots), которые в биотехнологическом производстве также могут подвергаться действию стрессовых факторов, связанных с изменением состава среды, температуры и т.д. Поэтому создание не только высокопродуктивных, но и стрессоустойчивых волосовидных корней также весьма актуально. Исходя из этого, целью нашей работы стало получение волосовидных корней табака с конститутивной экспрессией гена экспансина *NtEXPA5* и оценка их параметров роста при нормальных условиях культивирования и при действии стрессовых факторов. Для получения волосовидных корней использовали трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1 с конститутивной экспрессией гена *NtEXPA5* поколения T3, полученные нами ранее, которые подвергали агробактериальной трансформации при помощи *Agrobacterium rhizogenes*. Конститутивная экспрессия гена экспансина табака *NtEXPA5* способствовала более высоким темпам роста и повышенной продуктивности волосовидных корней при нормальных условиях культивирования. Волосовидные корни табака сверхэкспрессирующие ген *NtEXPA5* отличались повышенной устойчивостью к действию NaCl, маннитола, ацетата кадмия и CuSO<sub>4</sub>. Исходя из полученных данных испытанная нами генно-инженерная конструкция с геном *NtEXPA5* может быть предложена для получения волосовидных корней с улучшенными параметрами роста и повышенной продуктивностью как при нормальных, так и при стрессовых условиях культивирования. В рамках проделанной работы нами обсуждается перспективность использования волосовидных корней табака как модельного объекта для быстрого тестирования целевых генно-инженерных конструкций, предназначенных для создания трансгенных растений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00118 А.

**The influence of malachite green on the level of transcriptional expression of the laccase and DyP-peroxidase genes of the *Azospirillum brasilense***

*Kupryashina M.A., Pylaev T.E., Nikitina V.E.*

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

*E-mail: kupryashina\_m@mail.ru*

**Key message.** Malachite green (MG), a widely-used and recalcitrant dye, has been confirmed to be carcinogenic and mutagenic against many organisms. Herein, we were aimed at the investigation of the hypothetical role of ligninolytic bacterial enzymes similar to fungal ones in the degradation of synthetic dyes. A multiple increase in the laccases and DyP-peroxidases genes expression level was recorded by RT-qPCR for bacteria of the genus *Azospirillum* in the presence of MG.

**Keywords:** *Azospirillum*, biodegradation, malachite green, laccase, DyP-peroxidase, RT-qPCR, relative gene expression.

Triphenyl methane cationic dye MG is widely known as coloring agent in food and textile industries, as an antiseptic drug in clinics, etc. The MG molecules can be involved into the food circuits with possible subsequent carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects on humans. Traditional pollutants cleanup methods are based on the removal of unwanted materials through cyclic sedimentation and filtration steps, followed by chemical treatments such as flocculation, neutralization. Alternatively, biological processes are very promising owing to their cost-effectiveness, low sludge production, environmental safety etc.

Bacteria of the genus *Azospirillum* are able to produce a complex of phenol-oxidizing enzymes, which may be considered as efficient degraders of recalcitrant biopolymers such as MG. This extracellular non-specific enzyme system composed by laccases (Lcc) and high redox peroxidases, such as lignin peroxidase, manganese peroxidase, and new representatives like dye-decolorizing peroxidases (DyP), which function together with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing oxidases. Herein we performed a comparative study of the listed above phenol oxidase complex enzymes-coding genes expression profiles of the *azospirillum*, under cultivation in the presence of MG and in standard conditions. The bioinformatics amino acid sequences search for the putative homologous of Lcc and DyP enzymes was performed based on the comparison of annotated in GenBank (NCBI, USA) data using the Local Alignment Tool algorithm. The obtained data was then translated into the nucleic acid format and served as DNA templates sequences for further PCR-based examination. Then oligonucleotide primers set for Lcc and DyP genes identification were originally designed using the Vector NTI software product (Invitrogen, USA). The genomic DNA (gDNA) was extracted from *azospirillum* bacterial suspensions with MG added to the growth media, the non-treated bacteria served as blanks in all experiments. The matching of designed primers for the desired templates (gDNAs) were firstly checked by conventional PCR using a T-100 thermocycler (Bio Rad, USA) and an agarose-gel ethidium bromide staining detection. Then the cDNA library was obtained from the gDNAs by a standard reverse-transcription (RT) reaction using random oligo-dT primers and a commercial RT kit (Syntol, Russia) following the manufacturers instructions. The RT-qPCR reactions were performed in an CFX-96 thermocycler (Bio Rad, USA), with a SYBR green amplicon detection. A multiple increase in the Lcc and DyP genes normalized relative expression level in response to the addition of MG, referred to the house-keeping genes (gyrase A, glyase A, recombinase A and pykase A) expression value was evaluated using a standard CFX Manager software (Bio Rad, USA). The estimated more significant increase in DyP expression upon exposure to MG suggests that these enzymes play the main role in the biodecolorization of triphenylmethane dyes by *azospirillum*.

### **Selection and characterization of bacteria – the basis of microbial preparation improving quality of lawns**

*Kuptsov V.N., Mandrik-Litvinkovich M.N., Volokhanovich A.A., Kalamiyets E.I.*

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

E-mail: *kuptsov@hotmail.com*

**Key message.** During the study two bacterial strains *Pseudomonas brassicacearum* S-1 and *Flavobacterium johnsoniae* Ч1 were selected to be further used as the basis of microbial preparation to improve the quality of lawns.

**Keywords:** microbial preparation, phytopathogens, herbicide, growth stimulation, lawn

Special attention should be focused on eco-friendly complex microbial preparations as agents upgrading urban lawns.

The aim of this study was selection and characterization of microbial cultures – essential components of microbial preparation for remediation and amelioration of municipal lawns.

Methods. Submerged culture of the studied bacteria was carried out in Erlenmeyer flasks on the shaker-incubator (180 rpm) at temperature 28 °C for 48 hours on Meynell's nutrient medium. Antimicrobial activity of the strains was evaluated by the well's method, nitrogen-fixing and phosphate mobilizing activity – by growth on diagnostic Ashby and Muromtsev media. The effect of bacteria on growth of lawn grasses and the development of fusarial root rot was examined in pots with soil infected with a pure culture of the fungus *Fusarium avenaceum* in concentration  $1 \cdot 10^5$  CFU/g.

Results. As a result, bacterial strain *Pseudomonas brassicacearum* S-1 was selected from the Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms. It possesses high antagonistic activity against root rot pathogens of grasses (the diameter of growth inhibition zones of *Fusarium* fungi is 22-26 mm). Model experiments have shown that bacteria *P. brassicacearum* S-1 display a phytoprotective effect inhibiting the development of *Fusarium* root rot on lawn grasses by 40-50%, and also increase the effectiveness of the chemical herbicide Magnum.

Bacterial strain *Flavobacterium johnsoniae* Ч1 capable of fixing molecular nitrogen and exhibiting phosphate-mobilizing activity was isolated from the rhizosphere of lawn grasses. Treatment with this strain promotes seed germination rate by 10-17%, augments root weight and length of lawn grass seedlings by 7-40 %.

Thus, the strains S-1 and Ч1 were chosen for further experiments in order to develop a microbial preparation upgrading quality of lawns.

### **Селекция и характеристика бактерий – основы микробного препарата для улучшения качества газонов**

*Купцов В.Н., Мандрик-Литвинкович М.Н., Волоханович А.А., Коломиец Э.И.*

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

**Аннотация.** В ходе исследований отобраны два штамма бактерий *Pseudomonas brassicacearum* S-1 и *Flavobacterium johnsoniae* Ч1, которые могут быть использованы в качестве основы микробного препарата для улучшения качества газонов.

**Ключевые слова:** микробный препарат, фитопатогены, гербицид, ростстимуляция, газон

Особенное внимание при оздоровлении газонов, находящихся в черте города, должно уделяться использованию экологически безопасных комплексных микробных препаратов.

Цель. Целью настоящей работы был отбор и характеристика бактериальных культур в качестве основы микробного препарата для оздоровления и улучшения качества газонов.

Методы. Глубинное культивирование исследуемых бактерий осуществляли в колбах Эрленмейера на шейкер-инкубаторе (180 об/мин) при температуре 28 °C в течение 48 часов на питательной среде Мейнелла. Антимикробную активность штаммов определяли методом «лунок», азотфиксирующую и фосфатмобилизующую активность – по росту на диагностических средах Эшби и Муромцева. Влияние бактерий на рост газонных трав и развитие фузариозных корневых гнилей изучали в сосудах с почвой, инфицированной чистой культурой гриба *Fusarium avenaceum* в концентрации  $1 \cdot 10^5$  КОЕ/г.

Результаты. В результате проведенной работы из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов отобран штамм бактерий *Pseudomonas brassicacearum* S-1, обладающий высокой антагонистической активностью к возбудителям корневых гнилей злаковых трав (диаметр зон задержки роста грибов рода *Fusarium* составляет 22-26 мм). В модельных опытах показано, что бактерии *P. brassicacearum* S-1 обладают фитозащитным эффектом, ингибируя развитие фузариозных корневых гнилей газонных трав на 40-50%, а также повышают эффективность действия химического гербицида Магнум.

Из ризосферы газонных трав выделен штамм бактерий *Flavobacterium johnsoniae* Ч1, способный к фиксации молекулярного азота и обладающий фосфатмобилизующей активностью. Обработка указанным штаммом приводит к увеличению всхожести семян на 10-17%, массы корней и длины всходов газонных трав на 7-40 %.

Таким образом, штаммы S-1 и Ч1 отобраны для дальнейшей работы с целью разработки микробного препарата для улучшения качества газонов.

## Production of paper from mushroom raw materials

Kuragina N.S.<sup>1</sup>, Romanovskova A.D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Volgograd state University, Volgograd, Russia; <sup>2</sup>Moscow State Pedagogical University, Moscow, Russia

E-mail: kuragina23@mail.ru

**Key message.** For the first time, ecologically pure A<sub>4</sub> and A<sub>5</sub> paper was obtained from aphylloroid fungi. Classical methods of mycological research and methods of creating paper web were used.

**Keyword.** Aphylloroid fungi, Volgograd oblast, paper

Today, there are many technologies for making the likeness of the paper materials from wood, fallen leaves, straw, etc. For the first time, we obtained paper from aphylloroid basidiomycetes that do not represent nutritional value for the population, but are regularly found on the territory of the Volgograd region on the main forest-forming species of woody plants: *Populus nigra* L., *Quercus Robur* L., *Ulmus laevis* Pall. These are the types of fungi, *Cellulariella warnieri* (Durieu et Mont.) Zmitr. et Malysheva, *Fomes fomentarius* (L.) Fr.

The purpose of our research was to develop an ecological and low-cost technology for producing paper from common, but not used by the population of aphylloroid fungi. Standard methods of mycological research (collection, light microscopy) and methods of paper production (grinding, bleaching, pressing and drying) were used.

Technology of creation of paper:

1. Samples of dried mushroom were swollen in deionized water, after which they were crushed in a laboratory blender. The grinding time was 15 minutes.
2. Cationic starch was added to the fibrous suspension to increase mechanical strength and thoroughly mixed for 20 minutes.
3. The resulting mass is cooked until a liquid mixture is obtained. At the same time, bleaching agents were introduced into the composition of semi-finished products for discoloration in order to discolor natural coloring substances-lignin.
4. The sheets were formed on 100 wire meshes.
5. The grams were reduced to 160 g/m<sup>2</sup> by diluting the suspension if necessary.
6. The sheets were pressed at a pressure of 4.2 bar for 4 minutes.
7. Dried in a frame at a temperature of 105°C for 3 minutes.
8. Testing of sheets: using a micrometer, the grammage, thickness, and specific volume were determined.

In this way, an ecologically pure A<sub>4</sub> and A<sub>5</sub> paper was obtained. For the production of such paper, you can use the aphylloroid fungi *Cellulariella warnieri* and *Fomes fomentarius*.

## Изготовление бумаги из грибного сырья

Курагина Н.С.<sup>1</sup>, Романовскова А.Д.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Волгоградский государственный университет, Волгоград, Россия; <sup>2</sup>Московский педагогический государственный университет, Москва, Россия

**Аннотация.** Впервые была получена экологически чистая бумага формата А<sub>4</sub> и А<sub>5</sub> из афиллофороидных грибов. Применялись классические методы микологических исследований и методы создания бумажного полотна.

**Ключевые слова:** афиллофороидные грибы, Волгоградская область, бумага

На сегодняшний день существует множество технологий изготовления бумагоподобных материалов из древесины, опавших листьев, соломы и т.п.

Нами была впервые получена бумага из афиллофороидных базидиомицетов, не представляющих пищевой ценности для населения, но регулярно встречающихся на территории Волгоградской области на основных лесобразующих видах древесных растений: *Populus nigra* L., *Quercus robur* L., *Ulmus laevis* Pall. Это такие виды грибов, как *Cellulariella warnieri* (Durieu et Mont.) Zmitr. et Malysheva, *Fomes fomentarius* (L.) Fr.

Целью нашего исследования послужила разработка экологичной и дешёвой по себестоимости технологии получения бумаги из часто встречающихся, но не используемых населением афиллофороидных грибов.

В работе применялись стандартные методы микологических исследований (сбор, световое микроскопирование) и методы получения бумаги (измельчение, отбеливание, прессовка и сушка).

Технология создания бумаги:

1. Образцы сухого гриба набухали в деионизированной воде, после чего их измельчали в лабораторном блендере. Время размолта составило 15 минут.
2. В волокнистую суспензию добавили катионный крахмал для повышения механической прочности и тщательно перемешивали в течение 20 минут.
3. Полученную массу варили до получения жидкой смеси. Одновременно в состав полуфабрикатов ввели отбеливающие вещества для обесцвечивания природных красящих веществ, лигнина.
4. Листы формовали на проволочной сетке 100.
5. Граммаж доводили до 160 г/м<sup>2</sup> путём разбавления суспензии при необходимости.
6. Листы подвергали прессованию под давлением 4,2 бар в течение 4 минут.
7. Сушили в раме при температуре 105С в течение 3 минут.
8. Испытание листов: с помощью микрометра определяли граммаж, толщину, удельный объём.

Таким образом, была получена экологически чистая бумага формата А<sub>4</sub> и А<sub>5</sub>. Для производства такой бумаги можно использовать афиллофороидные грибы *Cellulariella warnieri* и *Fomes fomentarius*.



### **Biochar with immobilized free-living N-fixers provides higher N content in soils as compared with mineral fertilizer**

*Kuryntseva P.A., Galitskaya P.Yu., Selivanovskaya S.Yu.*

Kazan Federal University, Kazan, Russia

*E-mail: polinazwerewa@yandex.ru*

**Key message.** *In this work, we determined the possibility of inoculating a biochar with freely living N-fixing bacteria and the effectiveness of using such a biochar as an organo-mineral fertilizer.*

**Keywords:** *biochar, freely living N-fixing bacteria, organo-mineral fertilizer*

It is known that biochar application as soil fertilizer lead to reduce N loss. At the same time because of its porosity biochar is high quality substrate for immobilization microorganisms. The practice of using free-living N fixing bacteria (FLNFB) in organic farming is widely used to increase the nitrogen content in the soil. In this study immobilisation FLNFB on two types of biochar (made of chicken manure and sewage sludge) was applied to increase soil quality and crop productivity. The effectiveness of immobilization has been proven using SEM method: biofilms of FLNFB on the porous surface of both types of biochars are visible in the SEM images. The effectiveness of application 1% by mass biochar with FLNFB was estimated during 30 days vegetation experiment in greenhouse conditions by estimating the chemical composition of the soil (pH, CEC, C<sub>org</sub>, N<sub>tot</sub>), by estimating change the functional activity of the soil microbial community (soil respiration activity, leucine aminopeptidase enzyme activity), by estimating change the structure of the microbial community (qPCR were used to analyze *nifH* and 16S rRNA genes in order to study the total count of bacterial and fungi), by estimating change the plants characteristics (chlorophyll content, germination, root and shoot length, biomass). It was found that application biochar with FLNFB lead to higher content of N<sub>tot</sub> (0.11-0.19%) in soil in the end of the experiment as comparing than that for soil samples with mineral fertilizer (0.09%) and control soil (0.08%). The application biochar with FLNFB lead to significantly increase *nifH*-genes in soil. The soil leucine aminopeptidase and respiration activity have a similar trend for samples with and without biochar. The use of biochar as fertilizer led to increase chlorophyll content (13-22%) and barley biomass (10-84%) and decrease the length of the root (3-33%) in comparison with the control soil.

### **Оценка эффективности применение биочара с иммобилизованными свободноживущими азотфиксаторами в качестве удобрения**

*Курынцева П.А., Галицкая П.Ю., Селивановская С.Ю.*

ФГАУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

**Аннотация.** *В данной работе была определена возможность инокуляции биочара свободно живущими N-фиксирующими бактериями и эффективность применения такого биочара в качестве органо-минерального удобрения.*

**Ключевые слова:** *биочар, свободно живущие N-фиксирующие бактерии, органо-минеральное удобрение*

Известно, что применение биочара как почвенного удобрения приводит к снижению потерь азота. В то же время из-за своей пористости биочар является высококачественным субстратом для иммобилизации микроорганизмов. В тоже время, использование свободно живущих N-фиксирующих бактерий в органическом земледелии широко применяется для увеличения содержания азота в почве. В данной работе была проведена иммобилизация свободно живущих N-фиксирующих бактерий на двух типах биочара (из куриного помета и осадка сточных вод) которые в дальнейшем были внесены в почву для повышения ее качества и продуктивности сельскохозяйственных культур. Эффективность иммобилизации была доказана с помощью метода сканирующей электронной микроскопии (СЭМ): биопленки свободно живущих N-фиксирующих бактерий на пористой поверхности обоих типов биочаров видны на изображениях СЭМ. Эффективность применения 1% по массе биочара с свободно живущими N-фиксирующими бактериями оценивалась в течение 30-дневного вегетационного эксперимента в тепличных условиях путем оценки химического состава почвы (рН, ЕКО, С<sub>орг</sub>, N<sub>общ</sub>), путем оценки изменения функциональной активности микробного сообщества почвы (респираторная активность почвы, активность экзоферментов лейциназы и аминоксипептидазы), по изменению структуры микробного сообщества (метод ПЦР в реальном времени использовали для анализа количества генов *nifH* и общего количества бактерий и микромицет), по изменению характеристик растений (содержание хлорофилла, всхожесть, длина корней и побегов, биомасса). Было установлено, что применение биочара инокулированного свободно живущими N-фиксирующими бактериями приводило к более высокому содержанию N<sub>общ</sub> (0,11-0,19%) в почве в конце эксперимента по сравнению с таковым для образцов почвы с минеральными удобрениями (0,09%) и контрольной почвы (0,08%). Применение биочара со свободно живущими N-фиксирующими бактериями приводило к значительному увеличению *nifH*-генов в почве. Активность аминоксипептидазы и респираторная активность почвы имели сходную тенденцию для образцов с внесенным биочаром и без него. Использование биочара в качестве удобрения привело к увеличению содержания хлорофилла (13-22%) и биомассы ячменя (10-84%) и уменьшению длины корня (3-33%) по сравнению с контрольной почвой.



### Transcriptome analysis of pea (*Pisum sativum* L.) symbiotic nodules using laser capture microdissection

Kusakin P.G.<sup>1</sup>, Serova T.A.<sup>1</sup>, Gogoleva N.E.<sup>2</sup>, Gogolev Yu.V.<sup>2</sup>, Tsyganov V.E.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Kazan Scientific Center of RAS, Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan, Russia; <sup>3</sup>Saint Petersburg Scientific Center RAS, Saint Petersburg, Russia

E-mail: kussakin@gmail.com

**Key message.** Using laser capture microdissection, a comparative analysis of transcriptomes of three histological zones of pea nodules was performed.

**Keywords:** symbiotic nodule, cell differentiation, differential gene expression

The development of the symbiotic nodule of legumes is accompanied by both differentiation of rhizobia into bacteroids and differentiation of the cells infected with rhizobia. The aim of this work was to study changes in transcriptomic profiles associated with the differentiation of the infected cells. Using laser capture microdissection, cells from the early infection zone, the late infection zone and the nitrogen fixation zone were isolated from 11 days old pea wild-type SGE nodule samples. RNA from these samples were sequenced using Illumina HiSeq 2500 platform. Obtained reads were filtered and mapped to the pea reference genome. Differential gene expression analysis (p-value < 0,01; LFC > |1|) and functional analysis were carried out for three comparisons: (1) cells of the late infection zone / cells of the early infection zone; (2) cells of the nitrogen fixation zone / cells of the early infection zone; (3) cells of the nitrogen fixation zone / cells of the late infection zone. For these comparisons, significant differences were found in the expression of genes associated with key biological processes in the plant cell, such as control of cell cycle, response to phytohormones, and polysaccharide metabolism. The authors are very grateful to Alexey Afonin for providing access to the pea reference genome and assistance in conducting the study.

This work was financially supported by the RSF 16-16-10035 grant.

### Транскриптомный анализ симбиотических клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.) с использованием лазерной микродиссекции

Кусакин П.Г.<sup>1</sup>, Серова Т.А.<sup>1</sup>, Гоголева Н.Е.<sup>2</sup>, Гоголев В.Ю.<sup>2</sup>, Цыганов В.Е.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр РАН", Казанский институт биохимии и биофизики, Казань, Россия; <sup>3</sup>Санкт-Петербургский научный центр РАН, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** С помощью лазерной микродиссекции проведен сравнительный анализ транскриптомов трех гистологических зон клубеньков гороха.

**Ключевые слова:** симбиотический клубенек, дифференцировка клеток, дифференциальная экспрессия генов

Развитие симбиотического клубенька Бобовых сопровождается как дифференцировкой ризобий в бактероиды, так и дифференцировкой самих инфицированных ризобиями клеток. Целью данной работы являлось изучение изменений транскрипционных профилей, связанных с дифференцировкой инфицированных клеток. С использованием лазерной микродиссекции из препаратов 11-дневных клубеньков гороха дикого типа SGE были вырезаны клетки из ранней инфекционной зоны, поздней инфекционной зоны, а также зоны азотфиксации. РНК из этих образцов была секвенирована с использованием платформы Illumina HiSeq 2500. Полученные прочтения были очищены и картированы на референсный геном гороха. Анализ дифференциально экспрессирующихся генов (p-value < 0,01; LFC > |1|) и анализ функциональных групп проводился для трёх сравнений: (1) клетки поздней зоны инфекции клубенька / клетки ранней зоны инфекции; (2) клетки зоны азотфиксации / клетки ранней зоны инфекции; (3) клетки зоны азотфиксации / клетки поздней зоны инфекции. Для данных сравнений были обнаружены значительные различия в экспрессии генов, связанных с ключевыми биологическими процессами в растительной клетке, такими как контроль клеточного цикла, клеточный ответ на гормональную регуляцию, а также метаболизм полисахаридов. Авторы выражают благодарность А. М. Афонину за предоставленный доступ к референсному геному гороха и помощь в проведении исследования.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-16-10035.

### Identification black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* with biochemical tests

Kuznetsov M.A.<sup>1</sup>, Scherbakov A.A.<sup>1</sup>, Ivashchenko S.V.<sup>1</sup>, Gorelnikova E.A.<sup>2</sup>, Chervyakova N.S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Saratov, Russia; <sup>2</sup>Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov, Russia

E-mail: microbiology@sgau.ru; rusrapi@microbe.ru

**Key message.** In work considered using API-10S test system for diagnostic and identification black rot pathogen, *Xanthomonas campestris* bacteria.

**Keywords:** *Xanthomonas campestris*, black rot, classification, identification, biochemical activity

Black rot is widespread and harmful infection of *Brassicaceae* farm plants. *Xanthomonas campestris* is pathogen of this infection. This bacterium is most often in wild nature. Pathogen have specific pathogenic activity and causes large crop losses, but investigated insufficiently. It follows that it is necessary identification this microbe in particular pathovar level. The purpose of the work was identification *Xanthomonas* bacteria with compare biochemical activity by means of commercial test-system. Materials and methods. For this work been used API-10S test system with centralized data-base. This system can identify microbe biochemical characteristic faster and most accurate. For work used strains of *X. campestris*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *abony*, *Proteus* sp., *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, and isolated in wild nature strains of *X. campestris* pv. *campestris* from different territories of Saratov-city and Volsk Department of Saratov state. Results. During the work was revealed biochemical activity differences of *X. campestris* strains and most widespread in wild nature microbes. Defined differences of basis biochemical activity characteristics of black rot pathogen – H<sub>2</sub>S production and nitrite reduced – and defined API-10S profile numbers of *X. campestris* strains, allows identification it. Conclusions. Performed work demonstrate possibility using API-10S system for diagnostic and identification different strains of black rot pathogen on pathovar level. Centralized database of profiles numbers and usable interface allow use this type of tests for rating risks for cultivate *Brassicaceae* on territory and control material losses. API-10S test systems can use for classification of strains and pathovars of *X. campestris* and wide knowledge of its characteristics and widespreading.

### Идентификация возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных с применением биохимических тестов

Кузнецов М. А.<sup>1</sup>, Щербakov А. А.<sup>1</sup>, Иващенко С. В.<sup>1</sup>, Горельникова Е. А.<sup>2</sup>, Червякова Н. С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО СГАУ им. Н. И. Вавилова, Саратов, Россия; <sup>2</sup>ФКУЗ РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора, Саратов, Россия

**Аннотация.** В работе рассматривается использование биохимической тест-системы для выявления и идентификации патоваров возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных.

**Ключевые слова:** сосудистый бактериоз крестоцветных, идентификация, классификация, *Xanthomonas campestris*, биохимическая активность

Сосудистый бактериоз крестоцветных является широко распространённым заболеванием, наносящим большой урон народному хозяйству. Возбудитель заболевания – бактерия *Xanthomonas campestris* – широко распространён в дикой природе. Для него характерна высокая специфичность по отношению к объектам заражения. В связи с этим, большое значение имеет не только выявление непосредственно возбудителя, но и его идентификация до уровня патовара. Целью работы является идентификация бактерий рода *Xanthomonas* с использованием сравнительного анализа биохимической активности возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных при помощи коммерческой тест-системы. Материалы и методы. В работе использовалась биохимическая тест-система API-10S. Объектом исследования являлись культуры штаммов семейства *X. campestris* pv. *campestris*, полученных из тканей заражённых растений взятых с приусадебных участков г. Саратова и Вольского района Саратовской области, а также культуры музейных штаммов микроорганизмов *X. campestris*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *abony*, *Proteus* sp., *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*. Результаты. В ходе работы были установлены различия в биохимической активности различных штаммов возбудителя сосудистого бактериоза, в частности связанные с их способностью к восстановлению нитратов и продукции сероводорода. Также, были показаны различия в основных характеристиках *X. campestris* pv. *campestris* и наиболее распространённых в природе близкородственных им видов микроорганизмов и определены уникальные числовые профили, позволяющие в дальнейшем идентифицировать бактерии данного вида. Выводы. Полученные данные говорят о том, что коммерческая тест-система API-10S может быть использована для комплексной диагностики возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных. Благодаря централизованной цифровой базе данных и удобному кодификатору, применение систем данного типа позволяет подробно и быстро описывать и классифицировать микроорганизмы вида *X. campestris* и проводить их сравнение с характерными для определённых видов крестоцветных патоварами для определения рисков культивирования на данной территории тех или иных видов сельскохозяйственных растений этого семейства.

## The joint use of strains of microorganisms and natural growth regulators to increase soy resistance to diseases

Kuznetsova V.A.

N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

E-mail: kuzvika3385@yandex.ru

**Key message.** Growth regulators *EcoLarix* and *ExtraCor* together with a biofungicide based on the strain of the fungus *Trichoderma viride* contributed to the improvement of growth indicators of soybean seedlings healed them from a complex of root rot of various etiologies.

**Keywords:** plant growth regulators, soybeans, *Trichoderma viride*, root rot

Soy is affected by many, mainly fungal, diseases. These diseases lead to thinning of seedlings, inhibition of plants and reduced yield. To combat diseases, it is important to use natural preparations that do not harm the environment, increase the resistance of soybean plants to diseases and increase productivity in difficult agro-climatic conditions. For maximum effectiveness, along with natural preparations, a biological method of combating diseases can also be used. As a biofungicide, it is possible to use the fungus *Trichoderma viride*, which has a positive effect on growth, plant development and inhibitory - on pathogens of phytopathological diseases. In a polluted environment, biological pest control methods can reduce or eliminate the use of chemicals, which is environmentally and cost-effective.

The purpose of research: to establish the effectiveness of the combined use of *ExtraCor* and *EcoLarix* growth regulators obtained from *Daursky Larch* with a biofungicide based on the *Trichoderma viride* strain against a complex of soybean seed diseases.

Diagnosis of soybean seeds for diseases was carried out using the wet chamber method in accordance with GOST 12044-93. Biometric indicators of soybean seedlings significantly improved with the combined use of biological products and growth regulators. The use of a combination of *Trichoderma viride* + *EcoLarix* + *ExtraCor* preparations contributed to the lengthening of the seedling by 22.5%. The growth-promoting effect of the preparations was accompanied by an increase in the physiological resistance of soybean seedlings to root rot. The combination of the studied drugs reduced the prevalence of root rot. *EcoLarix* and *ExtraCor* growth regulators showed the highest efficiency in healing seedlings from root rot. This is due to the wide etiology of root rot symptoms that were caused by *Fusarium*, *Alternaria* and *Mildew*. In this regard, growth regulators increased the overall resistance of seedlings, which explains the significant (75-87.5%) biological effectiveness of growth regulators both in case of single use and in a mixture.

## Совместное использование штаммов микроорганизмов и природных регуляторов роста для повышения устойчивости сои к заболеваниям

Кузнецова В.А.

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Регуляторы роста *ЭкоЛарикс* и *ЭкстраКор* совместно с биофунгицидом на основе штаммов гриба *Trichoderma viride* способствовали улучшению ростовых показателей проростков сои, оздоравливали их от комплекса корневых гнилей различной этиологии.

**Ключевые слова:** регуляторы роста растений, соя, *Trichoderma viride*, корневые гнили

Соя поражается многими, преимущественно грибными, болезнями. Данные болезни приводят к изреживанию всходов, угнетению растений и снижению урожайности. Для борьбы с болезнями актуально использование природных препаратов, которые не наносят вред окружающей среде, способствуют повышению устойчивости растений сои к заболеваниям и увеличивают продуктивность в сложных агроклиматических условиях. Для наибольшей эффективности наряду с природными препаратами также можно применять биологический метод борьбы с болезнями. В качестве биофунгицида возможно использование гриба *Trichoderma viride*, который оказывает положительное влияние на рост, развитие растений и угнетающее – на возбудителей фитозаболеваний. В условиях загрязненной окружающей среды биологические методы борьбы с вредителями позволяют сократить или отказаться от применения химических средств, что экологически и экономически эффективно.

Цель исследований: установить эффективность совместного применения регуляторов роста *ЭкстраКор* и *ЭкоЛарикс*, получаемых из листовницы Даурской, с биофунгицидом на основе штамма *Trichoderma viride* против комплекса заболеваний семян сои.

Диагностику семян сои на заболевания проводили методом влажной камеры по ГОСТ 12044-93.

Биометрические показатели проростков сои достоверно улучшились при совместном применении биопрепаратов и регуляторов роста. Применение комбинации препаратов *Trichoderma viride* + *ЭкоЛарикс* + *ЭкстраКор* способствовало удлинению проростка на 22,5%. Ростостимулирующее действие препаратов сопровождалось усилением физиологической устойчивости проростков сои к корневым гнилям. Комбинация исследуемых препаратов снизила распространенность корневых гнилей. Самую высокую эффективность в оздоровлении проростков от корневой гнили показали регуляторы роста *ЭкоЛарикс* и *ЭкстраКор*. Это связано с широкой этиологией симптомов корневых гнилей, которые были вызваны фузариозом, альтернариозом и плесеньями. В этой связи регуляторы роста повысили общую резистентность проростков, чем и объясняется значительная (75-87,5%) биологическая эффективность регуляторов роста как при моноприменении, так и в смеси.

## Effect of endophytic *Bacillus subtilis* on drought stress tolerance of *Triticum aestivum* L. plants of Steppe Volga and Forest-Steppe West Siberian agroecological groups

Lastochkina O.<sup>1,2</sup>, Garshina D.<sup>2</sup>, Pusenkova L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia; <sup>2</sup>Bashkir Research Institute of Agriculture - Subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: oksanaibg@gmail.com

**Key message.** Physiological responses of wheat to *B. subtilis* under drought depends on the belonging of plants to agroecological groups. *B. subtilis* showed the best positive effect on growth and water status of Steppe Volga agroecological group's wheat.

**Keywords:** endophytic *Bacillus subtilis*, wheat, agroecological groups, tolerance, drought

Drought is one of the major abiotic stresses worldwide leading to inhibition of growth and reduction the crop yield, including wheat. Endophytic bacteria *Bacillus subtilis* are considering as promising bio-safe and eco-friendly strategies to cope with adverse abiotic stresses in plants. However, underlying mechanisms of growth-stimulating and anti-stress physiological programs of *B. subtilis* still far from clear. The aim of this study was to investigate the effect of inoculation with *B. subtilis* (strain 10-4 and 26D) on growth (seed germination, length of roots and shoots) and water-holding capacity (WHC) of wheat plants belonging to different agroecological groups (Steppe Volga (SV) and Forest Steppe West Siberia (FSWS), genetically having different drought stress adaptation strategies) under drought stress conditions. The experiments were carried out on wheat (*Triticum aestivum* L.) plants (cultivars Saratovskaya-55, Ekada-70 - representatives of SV agroecological group and Omskaya-35, Salavat Yulaev - representatives of FSWS agroecological group). The seeds before sowing was inoculated with *B. subtilis* 10-4 ( $10^5$  CFU/ml) and 26D ( $10^8$  CFU/ml) (Lastochkina et al. 2017). Growth parameters and WHC of leaves were determined according to (Mokronosov 1994; Udovenko 1988). Drought stress was modulated by 12% PEG-6000. It was revealed that pre-sowing inoculation with *B. subtilis* 10-4 and 26D exerted a multidirectional character of the effects on the drought tolerance of wheat plants of the studied agroecological groups at the initial stages of ontogenesis. *B. subtilis* (10-4, 26D) contributed to better seed germination, and increased length of roots and shoots of wheat seedlings of the Cv. Saratovskaya-55 and Ekada-70 while practically did not, or, conversely, in some cases, even inhibited the same growth indices for wheat Cv. Omskaya-35 and Salavat Yulaev under drought stress. It was found that the ability of *B. subtilis* (10-4, 26D) to influence on the growth indices of wheat cultivars of different ecotypes has a correlation with *Bacillus*-induced changes in their leaf's WHC. The impact of drought reduced WHC of Cv. Omskaya-35 and Salavat Yulaev plants by 2-2.5 times, while for the Cv. Saratovskaya-55 and Ekada-70, the indices of WHC decreased slightly. Inoculation with *B. subtilis* (10-4, 26D) increased (under normal condition) the WHC of leaf tissues of all studied plants, and the Cv. Saratovskaya-55 and Ekada-70 showed the greatest responsiveness to strains 10-4 and 26D inoculation, both under normal and drought stress conditions. It was revealed that *B. subtilis* 10-4, 26D prevented drought-induced decrease in WHC of leaves for Cv. Saratovskaya-55 and Ekada-70, and reduced for Cv. Omskaya-35 and Salavat Yulaev. Thus, the findings indicate a correlation between the growth parameters and leaf WHC as well as participation of *B. subtilis* in maintaining water status in plants under droughts stress and initiation of protective reactions, especially for Cv. Ekada-70 and Saratovskaya-55, which showed the greatest positive responsiveness in response to *B. subtilis* (10-4, 26D) inoculation under drought stress.

The study was funded by RFBR according to the research project № 19-016-00035.

Lastochkina O., Pusenkova L., Yuldashev R., Babaev M., Garipova S., Blagova D., Khairullin R., Aliniaiefard S. 2017. Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. (wheat) under salinity. Plant physiology and biochemistry. 121:80-88. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.10.020.

Mokronosov A.T. Small workshop on plant physiology/ Ed. Mokronosov A.T. Moscow: MSU. 1994. 184 p.

Udovenko G.V. Diagnosis of plant resistance to stresses: methodological guide/ Ed. Udovenko G.V. Leningrad: VIR. 1988. 227 p.

**Cultivation of *Rhizobium leguminosarum* to produce exopolysaccharide**

Lobanov A.N., Polyudova T.V.

Perm State Agro-Technological University, Perm, Russia

E-mail: lautsir@gmail.com

**Key message.** While studying the bacteria *Rhizobium leguminosarum* from different sources, a strain was isolated. Its growth on a liquid nutrient medium is accompanied by the accumulation of a significant amount of exopolysaccharide substance.

**Keywords:** *Rhizobium*, exopolysaccharides

Despite more than forty years of history, microbial exopolysaccharides (EPS) are still the subject of profound studying. They have several advantages over synthetic and plant polysaccharides, as they are non-toxic, biodegradable, resistant to mechanical and oxidative degradation, temperature and low pH.

The aim of this work was to study the growth parameters of 6 strains of *Rh. leguminosarum* isolated from various sources, with the greatest accumulation of EPS in the medium. Bacteria were cultivated on a bean broth with potassium hydrogen phosphate – 1 g/l, magnesium sulfate – 0.3 g/l and different amounts of sucrose – 5, 10 or 20 g/l. Cultivation was carried out in an orbital shaker (150 rpm) at 23-25°C. To quantify the polysaccharide yield, the viscosity of acellular culture fluids was estimated using a capillary viscometer with a capillary diameter of 0.73 mm.

Out of 6 studied strains the strain *Rh. leguminosarum*, designated as V30, was selected with the growth of which the greatest increase in the level of viscosity of the culture fluid was observed, reaching a value of ~ 70 mm<sup>2</sup>/s. When studying the dynamics of growth of *Rh. leguminosarum* V30 and exopolysaccharide production, it was found that the maximum viscosity was reached by the fifth day of bacterial cultivation, in a liquid nutrient medium with a sucrose content of 1%. A decrease in the amount of sucrose led to a sharp inhibition of the microbial population growth with almost complete suppression of EPS synthesis. With an increase in the amount of sucrose, the dynamics of the growth and EPS production does not differ from those when cultivated on a medium with 1% sucrose.

**Культивирование *Rhizobium leguminosarum* для получения экзополисахарида**

Лобанов А.Н., Полюдова Т.В.

ФГБОУ ВО Пермский государственный аграрно-технологический университет им. академика Д.Н.Прянишникова, Пермь, Россия

**Аннотация.** При изучении бактерий *Rhizobium leguminosarum* изолированных из разных источников, выделен штамм, рост которого на жидкой питательной среде сопровождается накоплением значительного количества экзополисахаридной субстанции.

**Ключевые слова:** *Rhizobium*, экзополисахариды

Несмотря на более чем сорокалетнюю историю, микробные экзополисахариды (ЭПС) до сих пор остаются объектами углубленных исследований. Они имеют ряд преимуществ перед синтетическими и растительными полисахаридами, поскольку нетоксичны, биоразлагаемы, устойчивы к механическому и окислительному разрушению, температуре и низким значениям pH.

Целью настоящей работы явилось изучение параметров роста бактерий 6 штаммов *Rh. leguminosarum*, выделенных из разных источников, при которых происходит наибольшее накопление ЭПС в среде роста. Бактерии культивировали на бобовом отваре с гидрофосфатом калия – 1 г/л, сульфатом магния – 0,3 г/л и разным количеством сахарозы – 5, 10 или 20 г/л. Культивирование проводили на орбитальном шейкере (150 об/мин) при 23-25°C. Для количественного определения выхода полисахаридов производили оценку вязкости бесклеточной культуральной жидкости с помощью капиллярного вискозиметра ВПЖ-2 с диаметром капилляра 0,73 мм.

Из 6 исследованных штаммов был отобран штамм *Rh. leguminosarum*, обозначенный как V30, при росте которого наблюдалось наибольшее повышение уровня вязкости культуральной жидкости, достигающее значения ~70 мм<sup>2</sup>/с. При изучении динамики роста *Rh. leguminosarum* V30 и продукции экзополисахарида было установлено, что максимальное значение вязкости достигается к пятым суткам культивирования бактерий, на жидкой питательной среде с содержанием сахарозы 1%. Снижение количества сахарозы приводило к резкому торможению роста микробной популяции с практически полным подавлением синтеза ЭПС. При увеличении количества сахарозы динамика роста и продукции ЭПС не отличается от таковых при культивировании на среде с 1% сахарозы.

## Variability of female gametophyte of tobacco *in vivo* and *in vitro* under the influence of extreme temperatures and its possible consequences

Lobanova L.P., Kolesova A.Yu.

Saratov National Research State University named after N.G. Chernyshevsky, Saratov, Russia

E-mail: lobanova-lp@yandex.ru

**Key message.** High and low temperatures induce the formation of abnormal embryo sacs (ES). ES with additional cells in the egg cell apparatus and synergids that are similar to an egg sell are capable of producing seeds with additional and haploid embryos.

**Keywords:** tobacco, *in vitro*, temperature, abnormally embryo sacs

The study of the variability of the female gametophyte contributes to the solution of many problems of genetics and selection related to issues of sterility, changes in the level of ploidy, the creation of homozygous forms, and the study of apomixis. The aim of the work was to study the possibility of reconstructing the structure of the female gametophyte by extreme temperatures and to assess the prospects for using the obtained modifications in cytological and genetic studies. The object was a homozygous line of tobacco BG-6. The embryo sacs were exposed to extremely low (9-13°C) and high temperatures (35-40°C) from the stage of mononuclear ES to mature. The studies of the temperature reaction were carried out under different conditions: *in vitro* (on the isolated ovaries) and *in vivo* (on plants in a thermal chamber, in a greenhouse and in a field). It was found that the same temperature effects in the different experimental conditions lead to the same violations of the structure of the ES. The differences are mainly quantitative. The different temperature conditions lead to the formation of the different types of abnormal ES. At low temperatures there are dominant ES with a halt in the development at 2-4 nuclear stages, but among 7-8 nuclear with a frequency of 4-9% there occur the ES with synergids that are similar to egg sells. The greatest variety of types of abnormal ES was at high temperatures. An increase in the number of mitoses in gametogenesis leads to the formation of numerous 9-48-nuclear ES instead of 8-nuclear in the norm. At the temperature of 40°C, cytokinesis is suppressed and coenocyte multinuclear ES dominate. At 37°C among the abnormal ones cellular ES with more than 8 nuclei dominate. In such sacks the additional cells in the egg apparatus with a frequency of 4-11% are formed. The most of abnormal structure ES are sterile. In the ES with the synergids that are similar to the egg sells and additional cells in the egg apparatus the fertilization of 2-3 cells is possible. It is probably that additional embryos develop exactly in these ES, which is confirmed by the results of the seed germination. Twin plants – twins and triplets – were identified among the seedlings. A frequency of polyembryony was 0,1%. Twin plants were diploid and haploid. Thus, the possibility of the implementation of the polyembryony and the haploidy on the basis of the induced variations of the structure ES is shown.

## Изменчивость женского гаметофита табака в условиях *in vivo* и *in vitro* под влиянием экстремальных температур и ее возможные последствия

Лобанова Л.П., Колесова А.Ю.

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

**Аннотация.** Высокие и низкие температуры индуцируют образование аномальных зародышевых мешков (ЗМ). ЗМ с дополнительными клетками в яйцевом аппарате и яйцеклеткоподобными синергидами способны к образованию семян с дополнительными и гаплоидными зародышами.

**Ключевые слова:** табак, *in vitro*, температура, аномальные зародышевые мешки

Изучение изменчивости женского гаметофита способствует решению многих задач генетики и селекции, связанных с вопросами стерильности, изменением уровня плоидности, созданием гомозиготных форм, изучением апомиксиса. Цель работы заключалась в изучении возможности реконструкции структуры женского гаметофита экстремальными температурами и оценке перспектив использования полученных модификаций в цитологических и генетических исследованиях. Объектом послужила гомозиготная линия табака БГ-6. Действию экстремально низких (9-13°C) и высоких температур (35-40°C) подвергались зародышевые мешки от стадии одноядерного ЗМ до зрелого. Исследования температурной реакции проводились в разных условиях: *in vitro* (на изолированных завязях) и *in vivo* (растениях в термокамере, оранжерее и поле). Установлено, что одинаковые температурные воздействия в разных экспериментальных условиях приводят к одинаковым нарушениям структуры ЗМ. Отличия носят в основном количественный характер. Различные температурные условия приводят к образованию разных типов аномальных ЗМ. При низких температурах доминируют ЗМ с остановкой развития на 2-4-ядерной стадиях, а среди 7-8-ядерных с частотой 4-9% встречаются ЗМ с яйцеклеткоподобными синергидами. Наибольшее разнообразие типов аномальных ЗМ было при высоких температурах. Увеличение числа митозов в гаметогенезе приводит к образованию многочисленных 9-48-ядерных ЗМ вместо 8-ядерных в норме. При температуре 40°C подавляется цитокinesis и доминируют ценоцитные многоядерные ЗМ. При 37°C среди аномальных преобладают клеточные ЗМ с числом ядер более 8. В таких мешках с частотой 4-11% образуются дополнительные клетки в яйцевом аппарате. Большинство ЗМ аномального строения стерильны. В ЗМ с яйцеклеткоподобными синергидами и дополнительными клетками в яйцевом аппарате возможно оплодотворение 2-3 клеток. Вероятно, именно в этих ЗМ развиваются дополнительные зародыши, что подтверждается результатами проращивания семян. Среди проростков выявлены близнецовые растения – двойни и тройни. Частота полиэмбрионии составила 0,1%. Близнецовые растения были диплоидными или гаплоидными. Таким образом, показана возможность реализации полиэмбрионии и гаплоидии на основе индуцированных вариаций структуры ЗМ.

## Morphotypic assessment of autochthonous strains of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast on grape varieties Dostoinny Anapo-Taman zone of viticulture

Lobodina E.V., Al-Nakib E.A., Avakimyan A.O.

North Caucasus Federal Scientific Center for Horticulture, Viticulture, Winemaking, Krasnodar, Russia

E-mail: alyona2255@yandex.ru

**Key message.** The article presents the results of the assessment of morphotypes of strains of wine yeast sown from wort and pulp of samples of grape variety Dostoinny, taken in the SEC "Wine Village" of the Anapsky District of the Krasnodar Territory. The separation of *saccharomycetes* and non-*saccharomycetes* by morphotypic features and using an elective test was carried out.

**Keywords:** yeast, morphotype, strain, *saccharomycetes*, non-*saccharomycetes*, elective test

In the modern Russian wine industry, active dry yeast is widely used for the production of grape wines. These industrial strains of wine yeast have their drawbacks. If you choose the wrong yeast race, their use can lead to distortion of the aroma and taste of the wine. In addition, it is widely known that for the production of table wines, it is better to use yeast adapted to specific local conditions [1]. An urgent issue is the search for local strains of wine yeast that are promising for use in winemaking and allow you to obtain high-quality wine materials with unique characteristics. In this regard, the task of the research was to perform a morphotypic assessment as one of the stages of a comprehensive assessment of strains in the selection of the most promising.

Samples of Worthy grapes were taken in sterile containers during harvest maturity in the vineyards of the SEC "Wine village" of the Anapa district of the Krasnodar territory in the amount of 2 kg of grapes per sample. Subsequent fermentation of grapes was carried out under aseptic conditions. Fermentation of the wort was made in 2 versions: fermentation on the wort and fermentation of mezza/must. 30 isolates of pure cultures were obtained from each fermentation variant. The morphotypic features of these isolates were evaluated and seeded on lysine elective culture medium Lysine Medium Base for separation of *Saccharomyces* / non-*Saccharomyces*. The analysis of the elective test showed that in the fermentation variant # 1 (must), the share of *saccharomycetes* was 76.67%, and in the fermentation variant # 2 (Mezza/must) – 58.62%. As a result of morphotypic assessment, 4 morphotypes were identified: 2 – *Saccharomyces* and 2 – non-*Saccharomyces*. Visually, non-*Saccharomyces* colonies differed markedly from *saccharomycetes*.

Morphotypic assessment of autochthonous strains showed a variety of yeast isolates and allowed us to identify 4 morphotypes: 2 – *Saccharomyces* and 2 – non-*Saccharomyces*. The elective test confirmed this division in the assessment of cultural properties, which allows us to conclude that it is promising to use an assessment of a complex of morphological and cultural characteristics for the preliminary selection of strains belonging to the genus *Saccharomyces*.

### Морфотипическая оценка автохтонных штаммов сахаромикетных и несакхаромикетных дрожжей на винограде сорта Достойный Анапо-Таманской зоны виноградарства

Лободина Е.В., Аль-Накиб Е.А., Авакимян А.О.

ФГБНУ Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Краснодар, Россия

**Аннотация.** В статье приведены результаты оценки морфотипов штаммов винных дрожжей, высеванных из сусла и мезги проб сорта винограда Достойный, отобранных в СПК «Винная деревня» Анапского района Краснодарского края. Проведено разделение сахаромикетов и несакхаромикетов по морфотипическим особенностям и с помощью элективного теста.

**Ключевые слова:** дрожжи, морфотип, штамм, сахаромикеты, несакхаромикеты, элективный тест

В современной винодельческой промышленности России для производства виноградных вин широко используют активные сухие дрожжи. Эти промышленные штаммы винных дрожжей имеют свои недостатки. В случае неправильного выбора расы дрожжей их использование может привести к искажению аромата и вкуса вина. К тому же, широко известно, что для производства столовых вин лучше применять дрожжи, адаптированные к конкретным условиям местности [1]. Актуальным является вопрос поиска местных штаммов винных дрожжей, перспективных для использования в виноделии и позволяющих получать высококачественные виноматериалы с уникальными характеристиками. В связи с этим, в задачи исследований входило выполнение морфотипической оценки, как одного из этапов комплексной оценки штаммов при отборе наиболее перспективных.

Пробы винограда сорта Достойный отбирали в стерильную тару, в период уборочной зрелости на виноградниках СПК «Винная деревня» Анапского района Краснодарского края в количестве 2 кг винограда на одну пробу. Последующее сбраживание винограда проводили в асептических условиях. Брожение сусла произвели в 2-х вариантах: брожение на сусле и брожение мезга/сусло. Из каждого варианта сбраживания было получено по 30 изолятов чистых культур. Оценили морфотипические особенности данных изолятов и произвели высев на лизиную элективную питательную среду Lysine Medium Base для разделения *Saccharomyces* / non-*Saccharomyces*. Анализ элективного теста показал, что в варианте сбраживания № 1 (Сусло) доля сахаромикетов составила 76,67%, а в варианте брожения №2 (Мезга/сусло) – 58,62%.

Вследствие морфотипической оценки было выделено 4 морфотипа: 2 – *Saccharomyces* и 2 – non-*Saccharomyces*. Визуально заметно отличались колонии non-*Saccharomyces* от сахаромикетов.

Морфотипическая оценка автохтонных штаммов показала разнообразие дрожжевых изолятов и позволила выделить 4 морфотипа: 2-*Saccharomyces* и 2- non-*Saccharomyces*. Элективный тест подтвердил данное разделение по оценке культуральных свойств, что позволяет сделать вывод о перспективности использования оценки по комплексу морфолого-культуральных характеристик для предварительного отбора штаммов, принадлежащих к роду *Saccharomyces*.

1. Новые штаммы винных дрожжей для производства виноградных вин. Агеева Н.М., Прах А.В., Насонов А.И., Супрун И.И., Токмаков С.В. // Научные труды СКФНЦСВВ.–2018.– Т. 18.–С. 171-175.



**Root rot toxins as a factor in the selection of resistant forms of oats *in vitro***

Lugovtsova S.Yu., Neshumaeva N.A., Stupko V.Yu., Zobova N.V.

Krasnoyarsk Agricultural Research Institute, Federal Research Center “Krasnoyarsk Scientific Center of the SB of the RAS”,  
Krasnoyarsk, Russia

E-mail: nshumaeva@list.ru

**Key message.** The oat regenerants with resistance to the *Fusarium* mycotoxin influence were obtained *in vitro* on selective media with different concentrations of root rot culture filtrate.

**Keywords:** mycotoxines, *in vitro*, regenerants, root rots, culture filtrate

*Fusarium* blight of oat, induced by fungi of the genus *Fusarium*, that produce toxin, is the one of the most frequently reason of yield and seed quality decrease, that made the final agrarian sector product harmful for human and animal health. Method of screening on selective media containing root rot toxins can be used in selection for resistance against fusarium blight. The investigation influence on growth and development of spring oat callus culture of metabolites of different species of pathogens, mentioned above, was conducted in KrasARI.

Classic methods of tissue cultivation *in vitro* were used. Callusogenesis was induced in immature oat embryo culture of different varieties (Tubinskij, Sayan, Kazyr, Sel'ma, Talisman, Zolotoj pochatok, Golec, Tyumenskij golozernyj) on Murashige-Skoog medium with 3mg/l 2,4-D and 2 mg/l IAA. After 30 days calluses were moved to proliferation medium with a half level of 2,4-D. The culture filtrate (CF) (*F. poae*, *F. eqiseti*, *F. oxysporum* and *F. sporotrichioides*) in different concentrations (30%, 40%, 50%) was added to experimental media.

The evaluation of potential capability of selection of plant-regenerants with resistance to micromycete toxic methabolites detected that bioactive substances in culture broth had inhibited the callus proliferation processes and regenerant development of all investigated samples but to a different degree.

The Kazyr variety was considered to be the most tolerant to all root rot toxic metabolites, involved into present investigation, according to the data on several parameters (proliferation, stem formation and rhizogenesis levels). The difference in the strength of the influence of involved fungi isolates on callus culture under all levels of CF in medium indicates that the CF of *F. poae* is the most aggressive. The regenerants, developed on selective media (61 plants with CF of *F. poae* and 72 – with CF of *F. oxysporum*), are of practice interest on own as well as sources of resistance for selection process.

**Токсины корневых гнилей, как фактор отбора устойчивых форм овса в культуре *in vitro***

Луговцова С.Ю., Нешумаева Н.А., Ступко В.Ю., Зобова Н.В.

Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Федеральный исследовательский центр  
«Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Россия

**Аннотация.** На селективных средах, содержащих разные концентрации культуральных фильтратов корневых гнилей, в культуре *in vitro* получены регенеранты овса, устойчивые к воздействию микотоксинов рода *Fusarium*.

**Ключевые слова:** микотоксины, *in vitro*, регенеранты, корневые гнили, культуральный фильтрат

Фузариоз зерна овса, возбудителями которого являются токсиногенные грибы из р. *Fusarium* является частой причиной снижения урожайности и качества зерна, делая конечную продукцию аграрного производства опасной для здоровья человека и сельскохозяйственных животных. В селекции на устойчивость к фузариозам может быть использован подход клеточного отбора на селективных средах с токсинами корневых гнилей. В КрасНИИСХ проведена работа по оценке влияния метаболитов разных видов указанных патогенов на рост и развитие каллусных культур форм ярового овса.

Использованы классические методы культивирования тканей *in vitro*. Каллусогенез индуцировали в культуре незрелых зародышей сортов овса (Тубинский, Саян, Казыр, Сельма, Талисман, Золотой початок, Голец, Тюменский голозерный) на среде Мурасиге-Скуга с добавлением 3 мг/л 2,4-Д и 2 мг/л ИУК. Через 30 дней каллусы пассировали на среду пролиферации со сниженным в два раза уровнем 2,4-Д. В опытный вариант среды добавляли культуральный фильтрат (КФ) (*F. poae*, *F. eqiseti*, *F. oxysporum* и *F. sporotrichioides*) в различных концентрациях (30%, 40%, 50%).

Оценка возможности отбора растений-регенерантов, устойчивых к действию токсических метаболитов микромицетов, выявила, что биологически активные вещества, содержащиеся в культуральных жидкостях, оказывают ингибирующее действие на процессы пролиферации каллусов и образование регенерантов у всех исследуемых образцов, но в разной степени. Наиболее устойчивым к спектру примененных токсических метаболитов корневых гнилей по нескольким параметрам (пролиферация, стебленез и регенерация) по результатам испытаний в разные годы признан сорт Казыр. Отличия по силе воздействия использованных изолятов, проявившиеся на всех уровнях КФ, показало, что наиболее агрессивным является КФ *F. poae*. Регенеранты, полученные на селективных средах (61 растений с КФ *F. poae* и 72 - с КФ *F. oxysporum*), содержащих КФ данных патогенов, представляют большой практический интерес, как самостоятельные объекты, так и в качестве источников устойчивости в селекции.

### **Determination of growth-promoting effectiveness of a biopreparation created on *Pseudomonas* sp. base on wheat plants**

Lukatkin A.A., Lukatkin A.S.

Mordovia State University, Saransk, Russia

E-mail: ussr1960@yandex.ru

**Key message.** Treatment of wheat seeds with various concentrations of a biopreparation based on *Pseudomonas* sp. improved the germination and growth of young plants; the best performance was observed at a dilution of 1: 300 ( $6.3 \times 10^6$  CFU / ml).

**Keywords:** biopreparation, *Pseudomonas* sp., wheat, germination, growth

Modern crop production requires ecological approaches to increase the productivity and resistance of plants. The use of growth regulators of natural origin (including cultures of bacteria or their metabolites) has indisputable advantages over chemical preparations. However, for each culture, it is necessary to know the optimal conditions for use.

Aim. Study of concentration effects of a biopreparation based on *Pseudomonas* sp. on the germination of seeds and growth of wheat.

The object of this study was the biopreparation of bacteria *Pseudomonas* sp. To obtain it, a flask with 100 ml of the liquid fraction of the post-alcohol bard was sowed with a mother culture and grown for 24 hours on a shaker at 150 rpm and a temperature of 25-26 °C. Wheat seeds of cv. Moskovskaya 39 were soaked for 3 hours at various biopreparation concentrations: without dilution ( $1.9 \times 10^9$  CFU / ml), 1: 100, 1: 300, 1: 500 (control - tap water), placed on filter paper in Petri dishes. Germination energy, and seeds germination and axial organs growth were determined on the 3rd and 7th day of germination, respectively.

Seed treatment with a biopreparation in all concentrations lead to better germination energy and seed germination compared to the control; the highest result was shown in variant with biopreparation at a dilution of 1: 300, where the germination energy increased by 13%, and germination by 11% (differences with control are statistically significant). The growth of axial organs of wheat plants was also better when seeds were treated with this dose of the biopreparation. Lower and higher concentrations of the biopreparation showed less efficiency (often only a tendency to exceed the control); this may be associated with a low titer of bacteria or a high viscosity of the solution. Thus, the optimal concentration of the biopreparation for treating wheat seeds was  $6.3 \times 10^6$  CFU / ml.

### **Определение эффективности ростостимулирующего действия биопрепарата на основе *Pseudomonas* sp. на растения пшеницы**

Лукаткин А.А., Лукаткин А.С.

ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева», Саранск, Россия

**Аннотация.** Обработка семян пшеницы различными концентрациями биопрепарата, созданного на основе *Pseudomonas* sp., улучшила всхожесть и рост молодых растений; лучшие показатели наблюдались при разведении 1:300 ( $6,3 \times 10^6$  КОЕ/мл).

**Ключевые слова:** биопрепарат, *Pseudomonas* sp., пшеница, всхожесть, рост

Современное интенсивное растениеводство требует экологических подходов к повышению продуктивности и стрессоустойчивости растений. Использование регуляторов роста природного происхождения (в т.ч. живых культур бактерий или их метаболитов) имеет неоспоримые преимущества перед химическими препаратами. Однако для каждой культуры необходимо знать оптимальные условия их применения.

Цель. Изучение влияния концентраций биопрепарата, созданного на основе *Pseudomonas* sp., на прорастание семян и рост пшеницы.

Объектом исследования служил биопрепарат бактерий *Pseudomonas* sp. Для его получения колбу со 100 мл жидкой фракции послеспиртовой барды засеивали маточной культурой и выращивали 24 ч на качалке при 150 об/мин и температуре 25-26°C. Семена пшеницы сорта Московская 39 замачивали 3 ч в различных концентрациях препарата: без разведения ( $1,9 \times 10^9$  КОЕ/мл), 1:100, 1:300, 1:500 (контроль – водопроводная вода), помещали на фильтровальную бумагу в чашки Петри, определяли энергию прорастания, всхожесть семян и рост осевых органов (на 3-и и 7-е сутки прорастания, соответственно).

Обработка биопрепаратом во всех концентрациях способствовала лучшей энергии прорастания и всхожести семян по сравнению с контролем; максимальный результат выявлен при использовании биопрепарата в разведении 1:300, где энергия прорастания повысилась на 13%, а всхожесть – на 11% (различия с контролем статистически достоверны). Рост осевых органов пшеницы также был лучше при обработке этой дозой биопрепарата. Более низкая или высокие концентрации биопрепарата показали меньшую эффективность, что может быть связано с низким титром бактерий или высокой вязкостью раствора. Таким образом, оптимальная концентрация биопрепарата для обработки семян пшеницы составила  $6,3 \times 10^6$  КОЕ/мл.

**Adaptation of blue honeysuckle microclones to *ex vitro* conditions**Lukjanova E.A.<sup>1</sup>, Antsiferov D.V.<sup>1</sup>, Maslova N.B.<sup>2</sup>, Ivashenko D.A.<sup>1,3</sup>, Danilova E.<sup>3</sup>, Kolomeichuk L.V.<sup>3</sup>, Efimova M.V.<sup>3</sup><sup>1</sup>Darwin LLC, Tomsk, Russia; <sup>2</sup>LLC JV Northern Garden, Tomsk, Russia; <sup>3</sup>National Research Tomsk State University, Tomsk, RussiaEmail: [evgenialukjanova@gmail.com](mailto:evgenialukjanova@gmail.com)

**Key message.** The approaches are identified that increase the survival rate of honeysuckle microclones in the process of adaptation to *ex vitro* conditions up to 98%.

**Keywords:** microclones, honeysuckle, adaptation, hydroponics, biological products

The stage of transfer of plant microclones to non-sterile conditions is the most labor-intensive process. The lack of reliable adaptation technology can lead to large losses of planting material obtained *in vitro*. The death of plants after planting can be associated with many factors, which are based on increased transpiration in test plants and the presence of pathogens in an open environment. The aim of this work was to determine approaches that increase the survival rate of honeysuckle microclones during adaptation. To the honeysuckle microplants provided for the experiment, the roots were poorly developed or even absent. For the development of the root system, part of the plants was placed on a hydroponic. The remaining plants were planted in microgreenhouses with sterile soil, consisting of coconut substrate and vermiculite in a ratio of 1:1. Part of the microgreenhouses before planting was treated with «Bio Plantaxil» and «FungiFors» the fungicidal biological products, the rest were left as controls. For feeding, we used a half salt solution according to Murashige and Skoog. The light intensity was 3500 Lux. 30 days after the start of the experiment, the humidity in greenhouses began to gradually decrease. Some greenhouses were aired once a day with an increase in exposure from 5 minutes to 60 minutes, while in others the number of holes in the lid was increased. After 3 weeks, all the greenhouses opened. In the ventilated greenhouses on the leaves of the plants, damage in the form of dried patches was observed, while in the rest there were no signs of wilting. In control experiments (without biological products), foci of mold appeared on the 5th day after planting. In experiments with biological products, a visible manifestation of molds was not observed throughout the cultivation. Plants treated with a biological product and plants grown on hydroponic had a well-formed branched root system, while in the control it was represented by one central root. The survival rate of transferred plants under *ex vitro* conditions for experiments with a biological product was 98% and in the control 78%. Thus, a gradual decrease in humidity, together with the use of protective biological products, made it possible to increase the survival rate of honeysuckle microplants in the process of adaptation to *ex vitro* conditions.

**Адаптация микроклонов жимолости синей к условиям *ex vitro***Лукьянова Е.А.<sup>1</sup>, Анциферов Д.В.<sup>1</sup>, Маслова Н.Б.<sup>2</sup>, Ивашенко Д.А.<sup>1,3</sup>, Данилова Е.<sup>3</sup>, Коломейчук Л.В.<sup>3</sup>, Ефимова М.В.<sup>3</sup><sup>1</sup>ООО «Дарвин», Томск, Россия; <sup>2</sup>ООО СП «Северный сад», Томск, Россия; <sup>3</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

**Аннотация.** Определены подходы, позволяющие увеличить выживаемость микроклонов жимолости в процессе адаптации к условиям *ex vitro* до 98%.

**Ключевые слова:** микроклоны, жимолость, адаптация, гидропоника, биопрепараты

Этап переноса микроклонов растений в нестерильные условия является наиболее трудоемким процессом. Отсутствие надежной технологии адаптации может привести к большим потерям посадочного материала, полученного в условиях *in vitro*. Гибель растений после высадки может быть связана с большим количеством факторов, основными из которых являются повышенная транспирация у пробирочных растений и присутствие патогенов в открытой среде. Целью данной работы было определить подходы, позволяющие увеличить выживаемость микроклонов жимолости в процессе адаптации. У микрорастений жимолости, предоставленных для эксперимента, корни были слабо развиты или полностью отсутствовали. Для развития корневой системы часть растений была помещена на гидропонную установку. Оставшиеся растения были высажены в микропарники со стерильным грунтом, состоящим из кокосового субстрата и вермикулита в соотношении 1:1. Часть микропарников до высадки обработали фунгицидными биопрепаратами «Bio Plantaxil» и «ФунгиФорс», остальные были оставлены в качестве контрольных. Для подкормки использовали половинный раствор солей по Мурасиге и Скугу. Интенсивность освещения составляла 3500Лк. Через 30 суток после начала эксперимента начали постепенно снижать влажность в парниках. Часть парников один раз в сутки проветривали с увеличением экспозиции от 5 мин до 60 мин, а у других увеличивали число отверстий в крышке. Через 3 недели парники открыли. В проветриваемых парниках на листьях растений наблюдали повреждения в виде высохших участков, тогда как в остальных признаках увядания не было. В контрольных опытах (без биопрепаратов) очаги плесени появились на 5 сутки после высадки растений. В опытах с биопрепаратами видимое проявление плесневых грибов не наблюдалось на всём протяжении культивирования. Растения, обработанные биопрепаратом и растения, выращенные на гидропонике, имели хорошо сформированную разветвленную корневую систему, тогда как у контрольных она была представлена одним центральным корнем. Выживаемость перенесённых растений в условия *ex vitro* для опытов с биопрепаратом составила 98%, в контроле 78%. Таким образом, постепенное снижение влажности совместно с применением защитных биопрепаратов позволило повысить выживаемость микрорастений жимолости в процессе адаптации к условиям *ex vitro*.

### Genetic determinants responsible for growth-promoting properties of the rhizospheric bacterium *Brevibacterium* sp. MG-1

Lutfullin M.T., Pudova D.S., Moiseeva O.E., Zaripova D.L., Mardanova A.M.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

E-mail: lutfullin.marat2012@yandex.ru

**Key message.** The paper presents data on sequencing and genome annotations of the *Brevibacterium* sp. MG-1, capable of synthesizing IAA and siderophores. The genes responsible for the synthesis of ACC deaminase, auxins and hydroxamate type siderophores were identified.

**Keywords:** actinobacteria, *Brevibacterium*, PGPR, sequencing, genome annotation

Actinobacteria capable of promoting plant growth are of great interest due to the wide potential of practical use in agriculture as growth stimulants and biocontrol agents against phytopathogens.

The aim of the work was to characterize the genome and annotate the genes responsible for the growth-promoting properties of the strain *Brevibacterium* sp. MG-1.

Genomic DNA was isolated from cells of strain MG-1 using a Nucleospin® Microbial DNA kit, DNA sequencing was performed using Illumina MiSeq technology via a paired-end method. The quality of sequencing was checked using FastQC\_v0.11.3. The *de novo* assembly and contig analysis was performed using the SPAdes v3.8.1 assembler. The genome was annotated using the RAST server and the NCBI software PGAAP.

The genome-wide sequencing of the MG-1 strain, which was previously isolated from the potato rhizosphere and is associated with tryptophan-dependent auxin synthesis – IAA, was performed. The maximum amount of IAA (16.35 µg/ml) was synthesized on the 4th day in the presence of 500 µg/ml L-tryptophan. The MG-1 strain was shown to produce 124.0 µM of siderophores in 24 hours of growth. The treatment of pea and rye seeds with a suspension of the strain MG-1 stimulates biomass growth of stems by 10-28% and roots by 14-24%. The genome of strain MG-1 consists of 4116 kb pairs with 64.5% GC pairs. 3696 genes were annotated, including 50 tRNA genes, 16 rRNA genes and 60 pseudogenes. The Genome of *Brevibacterium* sp. MG-1 was deposited in the NCBI database under the accession number NZ\_VDMQ00000000.1. Genes encoding proteins and enzymes that determine the growth-promoting properties of this PGPR bacteria were identified in the MG-1 genome, including: genes responsible for the synthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminases, beta- and alpha-chains of tryptophan synthases, and aromatic L-amino acid decarboxylases involved in auxin biosynthesis. In addition, the genes responsible for the synthesis and transport of catechol type siderophores — petrobactin ABC transporters, which mediate the absorption of iron-protein complexes, enterobactin-binding periplasmic protein FepB, and aerobactin — transporters of hydroxamate-type siderophores were also determined.

In conclusion, the strain *Brevibacterium* sp. MG-1 has a high potential for use as a growth stimulator in agriculture.

### Генетические детерминанты, ответственные за ростостимулирующие свойства ризосферной бактерии *Brevibacterium* sp. MG-1

Лутфуллин М.Т., Пудова Д.С., Моисеева О.Э., Зарипова Д.Л., Марданова А.М.

Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

**Аннотация.** В работе представлены данные по секвенированию и аннотации генома *Brevibacterium* sp. MG-1, способного к синтезу ИУК и сидерофоров. Были идентифицированы гены, ответственные за синтез АЦК дезаминазы, ауксинов и сидерофоров гидроксаматного типа.

**Ключевые слова:** актинобактерия, *Brevibacterium*, PGPR, секвенирование, аннотация генома

Актинобактерии, способные стимулировать рост растений, вызывают большой интерес в связи с широким потенциалом практического применения в сельском хозяйстве в качестве ростостимуляторов и агентов биоконтроля против фитопатогенов.

Целью работы являлась характеристика генома и аннотирование генов, ответственных за ростостимулирующие свойства штамма *Brevibacterium* sp. MG-1.

Выделение геномной ДНК из клеток штамма MG-1 проводили с помощью набора Nucleospin® Microbial DNA, секвенирование ДНК – с использованием технологии Illumina MiSeq методом paired-end. Качество секвенирования проверяли с помощью программы FastQC\_v0.11.3. Сборку *de novo* и анализ контигов проводили с использованием ассемблера SPAdes v3.8.1. Геном аннотировали с помощью программы PGAAP NCBI и сервера RAST.

Провели полногеномное секвенирование штамма MG-1, выделенного ранее из ризосферы картофеля и способного к триптофанзависимому синтезу ауксина – ИУК. Максимальное количество ИУК (16.35 мкг/мл) синтезируется на 4 сут в присутствии 500 мкг/мл L-триптофана. Показали, что штамм MG-1 продуцирует 124.0 мкМ сидерофоров на 24 час роста. Обработка семян гороха и ржи суспензией штамма MG-1 стимулирует прирост биомассы стеблей на 10-28% и корней на 14-24%. Геном штамма MG-1 состоит из 4116 т.п.н. (64.5% GC-пар). Аннотировано 3696 генов, в том числе 50 генов тРНК, 16 генов рРНК и 60 псевдогенов. Геном *Brevibacterium* sp. MG-1 был депонирован в базу данных NCBI под номером NZ\_VDMQ00000000.1. В геноме MG-1 нами идентифицированы гены, кодирующие белки и ферменты, определяющие ростостимулирующие свойства бактерий (PGPR). Выявлены гены, ответственные за синтез 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (АЦК) дезаминазы, бета- и альфа-цепитриптофансинтазы, декарбоксилазы ароматической L-аминокислоты, участвующие в биосинтезе ауксина. Также идентифицированы гены, ответственные за синтез и транспорт сидерофоров катехольного типа – петробактин-транспортеры (ABC), которые опосредуют поглощение железо-белкового комплекса, энтробактин-связывающий периплазматический белок FepB и аэробактин – транспортеры сидерофоров гидроксаматного типа.

Таким образом, штамм *Brevibacterium* sp. MG-1 обладает высоким потенциалом использования в качестве ростостимулятора в сельском хозяйстве.

**Determination of the taxonomic affiliation of the native isolate of the pigment-forming bacterium, separated from the Vezelka river of the city of Belgorod**

Lyakhovchenko N.S., Senchenkov V.Yu., Myagkov D.A., Pribylov D.A., Chepurina A.A., Nikishin I.A., Avakova A.A., Goyanov M.A., Gubina E.D., Taptun V.A., Churikova D.A., Sirotnin A.A., Solyanikova I.P.

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Belgorod National Research University», Belgorod, Russia

E-mail: lyakhovchenko@bsu.edu.ru

**Key message.** The paper presents the results of a study of an aboriginal isolate of a pigment-forming bacterium isolated from the Vezelka River in the city of Belgorod, which makes it possible to determine its taxonomic affiliation.

**Keywords:** taxonomic affiliation, aboriginal isolate, pigment-forming bacteria, identification

Microorganisms and their consortia, which are part of biocenoses, are characterized by a variety of ongoing biochemical processes that represent biotechnological potential. Isolation and study of the properties of new microorganisms and their consortia contributes both to deepening fundamental knowledge about the processes occurring in biotopes and their individual cells, and to meeting the practical needs of a biotechnological cluster by constructing new, based on the knowledge gained on existing, metabolic pathways that allow one to obtain products necessary for the person. The aim of the study is to determine the taxonomic affiliation of the native bacterial isolate, followed by a search for its biotechnological potential.

Thus, an indigenous pigment-forming bacterium from the Vezelka River in the city of Belgorod, Belgorod Region, was represented, represented by gram-negative, pigment-forming blue-violet, facultatively anaerobic, catalase-positive, does not form indole bacilli with such characteristic properties as the ability to grow at 4 ° C, the manifestation of lecithinase activity, but not H<sub>2</sub>S, the presence of cytochrome oxidase, the absence of lipolytic activity and capsule formation. Based on the detected signs, the primary taxonomic affiliation of the selected microorganism to the genus *Chromobacterium* was determined.

The isolated bacterium was able to exhibit antagonistic properties against phytopathogens such as *Alternaria brassicicola* F-1864 and *Aspergillus unguis* F-1754, which may include its biotechnological potential as an active agent of plant protection products.

The work was supported by Grant RFBR-China № 20-54-53023.

**Определение таксономической принадлежности аборигенного изолята пигментообразующей бактерии, выделенной из реки Везёлка города Белгорода**

Ляховченко Н.С., Сенченков В.Ю., Мягков Д.А., Прибылов Д.А., Чепурина А.А., Никишин И.А., Авакова А.А., Гоянов М.А., Губина Е.Д., Талтун В.А., Чурикова Д.А., Сиротин А.А., Соляникова И.П.

ФГАО ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Россия

**Аннотация.** В работе представлены результаты исследования аборигенного изолята пигментообразующей бактерии, выделенной из реки Везёлка города Белгорода, позволяющие определить её таксономическую принадлежность.

**Ключевые слова:** таксономическая принадлежность, аборигенный изолят, пигментообразующие бактерии, идентификация

Микроорганизмы и их консорциумы, входящие в состав биоценозов, характеризуются разнообразием протекающих в них биохимических процессов, представляющих биотехнологический потенциал. Выделение и изучение свойств новых микроорганизмов и их консорциумов способствует как углублению фундаментальных знаний о происходящих процессах в биотопах и входящих в них отдельных клетках, так и удовлетворению практических нужд биотехнологического кластера за счет конструирования новых, на основании полученных знаний о существующих, путях метаболизма, позволяющих получать необходимые человеку продукты. Целью проведенного исследования является определение таксономической принадлежности аборигенного изолята бактерий с оценкой его биотехнологического потенциала.

Так, из реки Везёлка, протекающей по территории города Белгорода, была изолирована аборигенная бактерия, представленная грамтрицательными, образующими сине-фиолетового цвета пигмент, факультативно анаэробными подвижными, каталазоположительными, индолнеобразующими палочками с такими характерными свойствами, как способность расти при 4°C, проявление лецитиназной активности, образование аммиака, но не H<sub>2</sub>S, наличие цитохромоксидазы, отсутствие липолитической активности и образования капсул. Исходя из обнаруженных признаков, определена первичная таксономическая принадлежность выделенного микроорганизма к роду *Chromobacterium*.

Выделенная бактерия проявляла антагонистические свойства по отношению к таким фитопатогенам, как *Alternaria brassicicola* F-1864 и *Aspergillus unguis* F-1754, в чем может заключаться её биотехнологический потенциал в качестве действующего агента средств защиты растений.

Работа поддержана грантом РФФИ-Китай № 20-54-53023.

### Search for *Rpv3* and *Rpv12* genes in genotypes of table and seedless grape varieties using DNA-markers

Makarkina M.V., Ilnitskaya E.T., Tokmakov S.V.

Federal State Budget Scientific Institution “North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Wine-making”, Krasnodar, Russia

E-mail: [ilnitskaya79@mail.ru](mailto:ilnitskaya79@mail.ru)

**Key message.** DNA-marker analysis of grape genotypes for the presence of downy mildew resistance genes *Rpv3* and *Rpv12* was performed. Table and seedless grapes varieties and forms carrying these resistance genes were identified according to the DNA-marker evaluation.

**Keywords:** grapes, DNA-markers, downy mildew resistance genes, *Rpv3*, *Rpv12*

The biotrophic oomycete of *Plasmopara viticola* Berl.et de Toni. causes one of the most common and harmful diseases of grapes in the world – downy mildew. Cultivation of resistant grape varieties allows to restrain the active development of the pathogen, to reduce the number of treatments of plantings with pesticides, which is particularly important for viticulture of table varieties. Genotypes that are resistant to downy mildew belong to the grapes of North America and Asia. Currently, more than 20 loci of grape resistance to *P. viticola* are known. The genes *Rpv3* (inherited from North American species) and *Rpv12* (derived from *V. amurensis*) are among the most effective and have an additive effect. Creating resistant table varieties with high consumer properties is an urgent task of modern grape breeding. Seedless table varieties are particularly in demand. The purpose of this work is to search for donors of downy mildew resistance genes *Rpv3* and *Rpv12* in the gene pool of table and seedless grape varieties and forms using DNA-markers. The study is performed by PCR with analysis of the results on an automatic genetic analyzer ABI Prism 3130. Microsatellite markers recommended for DNA- identification of the studied genes are used: *Rpv3* - UDV305, UDV737 (Di Gaspero et al., 2012), *Rpv12* – UDV343, UDV360 (Venuti et al., 2013). Seedless and table grapes genotypes that are promising for use in breeding as initial forms for a number of economically valuable traits were included in the study. As controls, we used the DNA of varieties in which these genes were found, according to published data. According to the results of DNA-marker analysis, table varieties and forms were determined, including seedless ones, whose genotypes contain alleles of genes that determine resistance to downy mildew. One genotype with both *Rpv3* and *Rpv12* was also identified – the Rochefort grape variety. The obtained molecular and genetic data correspond to information about the pedigree of varieties and forms. The results of this work can be used in the development of breeding programs for creating grape forms with combined resistance genes.

The reported study was funded by RFBR and the Administration of Krasnodar Region, according to the research project № 19-416-230051 r\_a.

### Поиск генов *Rpv3* и *Rpv12* в генотипах столовых и бессемянных сортов винограда с помощью ДНК-маркеров

Макаркина М.В., Ильницкая Е.Т., Токмаков С.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Краснодар, Россия

**Аннотация.** Выполнен ДНК-маркерный анализ генотипов винограда на наличие генов устойчивости к милдью *Rpv3* и *Rpv12*. Выявлены столовые и бессемянные сорта и формы винограда, несущие указанные гены устойчивости по данным ДНК-маркерной оценки.

**Ключевые слова:** виноград, ДНК-маркеры, гены устойчивости к милдью, *Rpv3*, *Rpv12*

Биотрофный оомицет *Plasmopara viticola* Berl.et de Toni. вызывает одно из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний винограда в мире – милдью. Возделывание устойчивых сортов винограда позволяет сдерживать активное развитие патогена, сокращать количество обработок насаждений пестицидами, что особо значимо для виноградарства столовых сортов. Генотипы, обладающие устойчивостью к милдью, принадлежат винограду Северной Америки и Азии. В настоящее время известно более 20 локусов устойчивости винограда к *P. viticola*. Гены *Rpv3* (наследуется от северо-американских видов) и *Rpv12* (происходит из *V. amurensis*) являются одними из наиболее эффективных и имеют аддитивный эффект. Создание устойчивых столовых сортов с высокими потребительскими свойствами – актуальная задача современной селекции винограда. Бессемянные столовые сорта особо востребованы. Цель выполняемой работы - поиск доноров генов устойчивости к милдью *Rpv3* и *Rpv12* в генофонде столовых и бессемянных сортов и форм винограда с помощью ДНК-маркеров. Исследование проводится методом ПЦР с анализом результатов на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 3130. В работе использованы микросателлитные маркеры, рекомендованные для ДНК-идентификации изучаемых генов: *Rpv3* – UDV305, UDV737 (Di Gaspero et al., 2012), *Rpv12* – UDV343, UDV360 (Venuti et al., 2013). В исследование были включены бессемянные и столовые генотипы винограда, перспективные для использования в селекции в качестве исходных форм по ряду хозяйственно-ценных признаков. В качестве контролей использовали ДНК сортов, в которых обнаружены указанные гены, согласно опубликованным данным. По результатам ДНК-маркерного анализа определены столовые сорта и формы, в том числе и бессемянные, в генотипах которых присутствуют аллели генов, определяющие устойчивость к милдью. Также выявлен один генотип, обладающий и *Rpv3* и *Rpv12* – сорт винограда «Рошфор». Полученные молекулярно-генетические данные соответствуют сведениям о родословной сортов и форм. Результаты работы могут быть использованы при разработке селекционных программ по созданию форм винограда с объединенными генами устойчивости.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Краснодарского края в рамках научного проекта № 19-416-230051 p\_a.

## A study of the genetic polymorphism of *Plasmopara viticola* in the vineyards of the Krasnodar Territory

Makarkina M.V., Tokmakov S.V., Ilnitskaya E.T.

Federal State Budget Scientific Institution “North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Wine-making”, Krasnodar, Russia

E-mail: konec\_citatu@mail.ru

**Key message.** The genetic diversity of the pathogen downy mildew (*Plasmopara viticola*) in the vineyards of the Krasnodar Territory was studied. It was shown that populations of *P. viticola* are variable on different varieties and at different geographical points.

**Keywords:** grapes, downy mildew, *Plasmopara viticola*, DNA markers, genetic diversity

Downy mildew is one of the most harmful diseases of grapes, caused by the oomycete *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berl. et de Toni. The relevance of studying the biodiversity of *P. viticola* in different zones of viticulture is determined not only by fundamental goals, but also by the practical importance of such works to better understand the epidemiological cycle of *P. viticola* and to clarify disease prediction models. The aim of the work is to study the genetic diversity of *P. viticola* in the vineyards of the Krasnodar Territory on grape varieties with different levels of resistance to downy mildew. The study was carried out on pathogen samples collected on various grape varieties that are resistant to downy mildew (Augustine, Kishmish 342, Bianca, Kunleany, Vanessa Sidless) and unstable genotypes (Kishmish luchisty, Kishmish belyi kruglii, Kishmish rozovyi, Attica, Merlot noir, Cabernet Sauvignon) affected by downy mildew in the active phase. The collection of material was carried out in May-August 2019 at various points in the Krasnodar Territory. 48 samples of *P. viticola* DNA were analyzed (three samples from each cultivar/geographical point). DNA was isolated using the CytoSorb kit (Synthol, Russia). We used DNA markers BER, ISA, CES, GOB, PV91, PV137, PV143, PV144, recommended for studying the genetic diversity of *P. viticola*. The work was performed by PCR. Using the GOB DNA marker, 37 alleles of different sizes were identified, PV144 – 20, CES – 10, BER – 3, PV91 – 3, PV137 – 2, ISA – 1, PV143 – 1. ISA and PV143 markers did not reveal polymorphism in the studied sampling. According to the results of this work, it was shown that populations of *P. viticola* are variable on different varieties and at different geographical points. The study of *P. viticola* samples parasitizing on varieties with different degrees of resistance to downy mildew growing in the same and at different geographical points did not reveal any regularities. The work continues, it is planned to expand the sample of the examined grape varieties, as well as to attract additional markers used in the study of *P. viticola* to get a clearer picture of the genetic structure of the pathogen populations. This study was conducted in the Krasnodar Territory for the first time.

The reported study was funded by RFBR and the Administration of Krasnodar Region, according to the research project № 19-416-233038 r\_mol\_a.

## Исследование генетической полиморфности *Plasmopara viticola* на виноградниках Краснодарского края

Макаркина М.В., Токмаков С.В., Ильницкая Е.Т.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Краснодар, Россия

**Аннотация.** Изучено генетическое разнообразие возбудителя милдью (*Plasmopara viticola*) на виноградниках Краснодарского края. Показано, что популяции *P. viticola* варьируются на разных сортах и в разных географических точках.

**Ключевые слова:** виноград, милдью, *Plasmopara viticola*, ДНК-маркеры, генетическое разнообразие

Милдью одно из наиболее вредоносных заболеваний винограда, возбудителем которого является оомицет *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berl. et de Toni. Актуальность изучения биоразнообразия *P. viticola* в различных зонах виноградарства определяется не только фундаментальными целями, но и практическим значением подобных работ для лучшего понимания эпидемиологического цикла *P. viticola* и для уточнения моделей прогнозирования заболевания. Цель работы – изучить генетическое разнообразие *P. viticola* на виноградниках Краснодарского края на сортах винограда с различным уровнем устойчивости к милдью. Исследование проведено на образцах патогена, собранных на различных сортах винограда, обладающих устойчивостью к милдью (Августин, Кишмиш 342, Бианка, Кунлеань, Ванесса Сидлесс) и неустойчивых генотипах (Кишмиш лучистый, Кишмиш белый круглый, Кишмиш розовый, Аттика, Мерло, Каберне-Совиньон) пораженных милдью в активной фазе. Сбор материала проведен в мае-августе 2019 г. в различных точках Краснодарского края. Проанализировано 48 образцов ДНК *P. viticola* (по три образца с каждого сорта/географической точки). ДНК выделена набором ЦитоСорб (Синтол, Россия). Использовали ДНК-маркеры BER, ISA, CES, GOB, PV91, PV137, PV143, PV144, рекомендованные для изучения генетического разнообразия *P. viticola*. Работа выполнена методом ПЦР. С помощью ДНК-маркера GOB удалось выявить 37 аллелей разного размера, PV144 – 20, CES – 10, BER – 3, PV91 – 3, PV137 – 2, ISA – 1, PV143 – 1. Маркеры ISA и PV143 не выявили полиморфизма в исследуемой выборке. По результатам проведенной работы показано, что популяции *P. viticola* варьируются на разных сортах и в разных географических точках. Изучение образцов *P. viticola*, паразитирующих на сортах с различной степенью устойчивости к милдью, произрастающих в одной и в разных географических точках не выявило каких-либо закономерностей. Работа продолжается, планируется расширить выборку исследуемых сортов винограда, а также привлечь дополнительные маркеры, используемые в изучении *P. viticola*, чтобы получить более ясную картину генетической структуры популяций патогена. Данное исследование в Краснодарском крае проведено впервые.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Краснодарского края в рамках научного проекта № 19-416-233038 p\_mol\_a.

**Endophytic bacteria and plant immunity**  
*Maksimov I.V., Shein M.Yu., Khairullin R.M.*  
Institute of Biochemistry and genetics UFRC RAS  
E-mail: igor.mak2011@yandex.ru

**Key message.** Diseases annually cause significant crop losses and reduced quality of agricultural products. The development strategy of new environmentally friendly plant protection products should consider the role of the microbiome in host defense.  
**Keywords:** Plant-growth regulating microorganisms, systemic resistance of plants, biological products, priming

The formation of a stress-resistant and cost-effective agrocenosis is one of the urgent tasks and its solution will allow the formation of adaptive crop production technology, which fundamentally differs from methods based on intensive use of pesticides. One of the potential objects to the manufacture of biological products for plant protection are endophytic strains of bacteria of the genus *Bacillus*, among which unique strains with high fungicidal, insecticidal, nematocidal and antiviral activities have been found. The issues of the direct effect of bacterial metabolites on pests and viruses, as well as mediated through the activation of the phytoimmune system inhibiting their growth and development, are discussed. Attention will be given to the possibility of forming an artificial consortium of plants with endophytic microorganisms with complex biocidal activity against pathogens, pests and viruses, as well as immunomodulatory activity. Such a protective effect exhibited by endophytic bacteria to plants promotes the possibility of developing preparations for plant protection with a prolonged action, effective not only in the conditions of their vegetative growth in the field, but also during storage.

This work was supported by joint international grant from the Russian Science Foundation and the Department of Science and Technology (DST) of the Government of India №19-46-02004.

**Эндوفитные бактерии и фитоиммунитет**  
*Максимов И.В., Шейн М.Ю., Хайруллин Р.М.*

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, 450054, Россия,

**Аннотация.** Болезни ежегодно вызывают значительные потери урожая и заметное снижение качества сельскохозяйственной продукции. По мнению авторов, стратегия разработки новых экологически безопасных препаратов для защиты растений должна учитывать роль микробиома в устойчивости хозяина к вредным организмам.

**Ключевые слова:** стимулирующие рост растений микроорганизмы, системная устойчивость растений, биопрепараты, праймирование

Формирование современного агроценоза, одновременно устойчивого к стрессовым факторам среды и рентабельного – одна из актуальных задач, решение которой позволит сформировать технологию адаптивного растениеводства, в корне отличающуюся от основанных на интенсивной химизации методов. Одними из наиболее привлекательных объектов для промышленного производства биопрепаратов для защиты растений, являются эндوفитные штаммы бактерий рода *Bacillus*, среди которых обнаружены уникальные штаммы, характеризующиеся высокой фунгицидной, инсектицидной, нематодцидной и антивирусной активностями. Обсуждаются вопросы прямого воздействия бактериальных метаболитов на вредные организмы и вирусы, а также опосредованное через активацию фитоиммунной системы ингибирования их роста и развития. Особое внимание в сообщении будет уделяться возможности формирования искусственного консорциума растений с эндوفитными микроорганизмами с комплексной биоцидной активностью против вредных организмов и вирусов, а также иммуномодулирующей – в отношении растений. Такой защитный эффект, проявляемый эндوفитными бактериями, к растениям способствует возможности разработки препаратов для защиты растений с пролонгированным действием, эффективным не только в условиях вегетативного их роста в полевых условиях, но и при хранении.

Работа выполнена в рамках совместного международного гранта РФФИ и Департамента науки и техники (DST) правительства Индии № 19-46-02004.



### Microbial preparation for soil bioremediation and crop yield increase

Mandrik-Litvinkovich M.N.<sup>1</sup>, Orlovskaya P.I.<sup>1</sup>, Kislushko P.M.<sup>2</sup>, Kalamiyets E.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus; <sup>2</sup>Institute of Plant Protection, Minsk, Belarus

E-mail: biocontrol@mbio.bas-net.by

**Key message.** A microbial preparation based on bacteria with enzymatic, antimicrobial and growth-stimulating activities effectively reduces residual amounts of herbicides of sulfonylurea series and imidazolinones and promotes productivity of agricultural crops.

**Keywords:** microbial preparation, herbicides, crop yield, bioremediation

Intensive mechanization and chemization of agriculture modify the structure of microbial communities and disbalance the natural processes maintaining fertility and productivity in agrophytocenoses. Toxic components are accumulating in soil, the resistance of pathogens to chemical control agents is induced and diseases of the fungal and bacterial origin are rapidly spread. The application of complex microbial preparations with enzymatic, phytoprotective and growth-stimulating action is one of the ways of soil remediation and production eco-safe agricultural products.

Objective: to evaluate the effect of a complex microbial preparation on decomposition of herbicides in soil and increase of crop yields.

The standard microbiological, biochemical research methods were used in the study.

The microbial preparation based on consortium of bacteria *Bacillus*, *Rahnella* and *Rhodococcus* with degrading, growth-stimulating and antimicrobial properties, under model conditions, accelerates the decomposition of herbicides (imazamox, chlorimuron-ethyl, metsulfuron-methyl) by 40–80% and eliminates phytotoxic action of residual herbicides on seeds (the germination of radish seeds of Zhara variety is stepped up by 35–45%). The field test demonstrated that the application of microbial preparation (expense dose 4 l/ha) razed the degradation rate of herbicides of the sulfonylurea (chlorosulfuron) group in the soil by 10.3–17.9%, and of imidazolinones (imazamox) by 7.0–27.2%. The supply of microbial preparation increases the productivity of spring wheat by 2.5–6.2 c/ha and peas by 6.1–7.4 c/ha. The obtained results evidence attractive prospects of the developed microbial preparation for soil bioremediation and crop yield improvement.

### Микробный препарат для биоремедиации почвы и повышения урожайности сельскохозяйственных культур

Мандрик-Литвинкович М.Н.<sup>1</sup>, Орловская П.И.<sup>1</sup>, Кислушко П.М.<sup>2</sup>, Коломиец Э.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь; <sup>2</sup>РУП «Институт защиты растений», Минск, Беларусь

**Аннотация.** Микробный препарат на основе бактерий с ферментативной, антимикробной, азотфиксирующей, фосфатмобилизующей и ростстимулирующей активностями эффективно снижает остаточные количества гербицидов класса сульфонилмочевины и имидазолинонов, а также способствует повышению урожайности сельскохозяйственных культур

**Ключевые слова:** микробный препарат, гербициды, урожайность, биоремедиация

Интенсивная механизация и химизация земледелия приводят к изменению структуры микробных сообществ и нарушению природных сбалансированных процессов поддержания плодородия и продуктивности в агрофитоценозах. Наблюдается накопление токсических компонентов в почве, повышение устойчивости патогенов к химическим средствам защиты и стремительное развитие болезней грибной и бактериальной этиологии. Одним из способов оздоровления почв и получения экологически безопасной сельхозпродукции является использованием комплексных микробных препаратов с ферментативным, фитозащитным и ростстимулирующим действием.

Цель работы: оценить влияние комплексного микробного препарата на разложение гербицидов почве и повышение урожайности сельскохозяйственных культур.

В работе использованы общепринятые микробиологические, биохимические методы исследования.

Установлено, что микробный препарат, созданный на основе консорциума бактерий родов *Bacillus*, *Rahnella* и *Rhodococcus* с деструктивными, ростстимулирующими и антимикробными свойствами, в модельных условиях повышает скорость разложения гербицидов (имазамокс, хлоримурон-этил, метсульфурон-метил) на 40–80% и устраняет фитотоксическое действие остаточных количеств гербицидов на семена (всхожесть семян редиса сорта Жара увеличивается на 35–45%). В полевом опыте показано, что при внесении препарата (норма расхода 4 л/га) скорость разложения гербицидов группы сульфонилмочевины (хлорсульфурона) в почве повышается на 10,3–17,9 %, а имидазолинонов (имазамокса) на 7,0–27,2 %. Применение препарата способствует повышению урожайности яровой пшеницы на 2,5–6,2 ц/га и гороха на 6,1–7,4 ц/га. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования разработанного микробного препарата для биоремедиации почвы и повышения урожайности сельскохозяйственных культур.

## The influence of associations of endophytic bacteria and meteorological conditions on the productivity of beans depending on cultivars characteristics

Markova O.V.<sup>1</sup>, Garipova S.R.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Bashkir State University, Ufa, Russia; <sup>2</sup>Bashkir Research Institute of Agriculture, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: o-ksana@list.ru

**Key message.** The effect of endophytic bacterial associations on the productivity of bean cultivars was studied. It was shown that the efficiency of inoculation with microorganisms depended on the cultivar of beans and climatic environmental factors.

**Keywords:** endophytic bacteria, beans, inoculation, productivity, hydrothermal coefficient

Endophytic bacteria are a promising object of agrobiotechnology.

The aim of the research was to study the interaction of endophytic bacterial associations with bean plants under various agro-climatic conditions.

In the research we used bean plants of the Zolotistaya, Ufimskaya, Elsa cultivars, and bacterial associations (F4, F5, F6) isolated from nodules of bean plants. Field experiments were carried out in 2007-2010 in the conditions of the South Urals. The hydrothermal coefficient (HTC) was used to reflect the meteorological conditions of the growing season.

The results of in vitro experiments showed that the isolated from nodules associations included both rhizobia and *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*. Inoculation of seeds with bacterial associations improved the root development of plants. Bacteria suppressed the development of *Fusarium oxysporum* and showed neutralism to the model strain of *R. leguminosarum* 2630. All bacterial associations contributed to an increase in the number of nodules on bean roots by 33-76% compared with the untreated control.

In the field, plants of the Zolotistaya cultivar responded positively to inoculation with associations F4 and F6 in a wide range of climatic conditions (HTC = 0.3–1.6): the mass of seeds increased by 19–28%. Plants of the Ufimskaya cultivar, inoculated with bacteria of the F5 association, increased seed productivity by 29% compared with the untreated control at HTC = 1.0, but not in conditions of moisture deficiency (HTC <1.0). Inoculation of the Elsa cultivar did not have a positive effect on the crop. Endophytic bacteria suppressed the development of root rot. A disease reduction of 23-54% was noted in all treatment variants in plants of the Ufimskaya cultivar and by 21-30% in the Zolotistaya and Elsa cultivars when treated with the F5 association. Bean plants of all studied cultivars formed nodules with HTC ≥1, but under conditions of moisture deficiency (HTC = 0.9), only the F5 association activated nodule formation.

The results obtained indicate the need to take into account the cultivar specificity of beans, identify mechanisms and conditions that determine the mutualistic nature of the interaction of plants with endophytic bacteria.

## Влияние ассоциаций эндофитных бактерий и метеорологических условий на продуктивность фасоли в зависимости от сортовых особенностей

Маркова О.В.<sup>1</sup>, Гарипова С.Р.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия; <sup>2</sup>Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Уфимского Федерального исследовательского центра РАН, г. Уфа, Россия

**Аннотация.** Исследовано влияние эндофитных бактериальных ассоциаций на продуктивность сортов фасоли. Показано, что эффективность инокуляции микроорганизмами зависела от сорта фасоли и климатических факторов среды.

**Ключевые слова:** эндофитные бактерии, фасоль, инокуляция, продуктивность, гидротермический коэффициент

Эндофитные бактерии – перспективный объект агrobiотехнологии.

Цель исследований – изучение взаимодействия эндофитных бактериальных ассоциаций с растениями фасоли в различных агроклиматических условиях.

В работе использовали растения фасоли сортов Золотистая, Уфимская, Эльза, и бактериальные ассоциации (Ф4, Ф5, Ф6), выделенные из клубеньков растений фасоли. Полевые опыты проводили в 2007-2010 гг. в условиях Южного Предуралья. Для отражения метеорологических условий использовали гидротермический коэффициент (ГТК) за вегетационный период. Результаты экспериментов in vitro показали, что в состав ассоциаций наряду с ризобиями входили *Bacillus megaterium* и *B. subtilis*. Инокуляции ими семян улучшала у растений развитие корней. Бактерии оказывали фунгистатическое воздействие на *Fusarium oxysporum* и проявляли нейтраллизм к модельному штамму *R. leguminosarum* 2630. Все бактериальные ассоциации способствовали увеличению количества клубеньков на корнях фасоли на 33-76% по сравнению с необработанным контролем.

В полевых условиях растения сорта Золотистая положительно отзывались на инокуляцию ассоциациями Ф4 и Ф6 в широком диапазоне климатических условий (ГТК=0.3–1.6) – масса семян увеличилась на 19-28%. Растения сорта Уфимская, инокулированные бактериями ассоциации Ф5, увеличили семенную продуктивность на 29% по сравнению с необработанным контролем при ГТК=1.0, но не в условиях дефицита влаги (ГТК<1.0). Инокуляция сорта Эльза не оказала положительного действия на урожай. Эндофитные бактерии способствовали подавлению развития корневых гнилей. Отмечено снижение болезней на 23-54% во всех вариантах обработок у растений сорта Уфимская и на 21-30% – на сортах Золотистая и Эльза при обработке ассоциацией Ф5. Растения фасоли всех изученных сортов формировали клубеньки при ГТК≥1, но в условиях дефицита влаги (ГТК=0.9) только ассоциация Ф5 активизировала образование клубеньков.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости учета сортовой специфичности фасоли, выявления механизмов и условий, определяющих мутуалистический характер взаимодействия растений с эндофитными бактериями.

### The nature of the carbon source as a modulator of the response of bacteria to biologically active compounds (for example, colchicine and protatranes)

Markova Yu.A.<sup>1</sup>, Belovezhets L.A.<sup>2</sup>, Tretyakova M.S.<sup>1</sup>, Cheremnykh A.M.<sup>1</sup>, Levchuk A.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Irkutsk, Russia; <sup>2</sup>A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk, Russia

E-mail: juliam06@mail.ru

**Key message.** When assessing the impact of biological active compounds (colchicine and protatranes) on *Rhodococcus erythropolis* against the background of various carbon sources, an unusual effect of low concentrations of colchicine was revealed, that expressed in sharp stimulation of bacterial metabolism.

**Keywords:** *Rhodococcus erythropolis*, colchicine, protatranes, carbon sources

The resistance of bacteria to the action of biologically active compounds (BAC) is due, on the one hand, to their genetic characteristic and, on the other hand, to environmental conditions. Depending on the carbon source in the bacterial cell, the redistribution of metabolic pathways occurs, which leads to a change in its physiological status, thereby modulating resistance (1, 2). This phenomenon is actively studied in the interaction of bacteria with antibiotics, but it also occurs in the case of other BAC. We found an unusual effect of low concentration of colchicine on *Rhodococcus*, expressed in a sharp stimulation of bacterial metabolism. In microorganisms formed in an environment with glucose, the participation of colchicine stimulates catabolic processes, which is expressed in the activation of respiration without significant bio-stimulation and influence on biofilm formation. With growth on inositol and naphthalene, short-term activation of respiration occurs, probably due to self-destruction of cells, therefore, an oxidative explosion was observed in the first hours of cultivation. However, with growth on inositol, biofilm formation increases, therefore, most of the cells decrease metabolic activity. Whereas when using naphthalene as a substrate, colchicine does not affect the formation of biofilms. At the same time, significant stimulation of the growth rate may be associated with accelerated destruction of naphthalene by *Rhodococcus* in the presence of colchicine. The study was supported by a grant from Russian Foundation for Basic Research, project № 20-016-00114 A and the integration program «Fundamental Research and Breakthrough Technologies as Basis for the Development of the Baikal Region and its Interregional Relations».

### Природа источника углерода как модулятор ответа бактерий на биологически активные соединения (на примере колхицина и протатранов)

Маркова Ю. А. <sup>1</sup>, Беловежец Л. А. <sup>2</sup>, Третьякова М. С. <sup>1</sup> Черемных А. М. <sup>1</sup>, Левчук А. А. <sup>2</sup>

<sup>1</sup>СИФИБР СО РАН, Иркутск, Россия; <sup>2</sup>ИрИХ СО РАН, Иркутск, Россия

**Аннотация.** При оценке влияния БАС (колхицина и протатранов) на *Rhodococcus erythropolis* на фоне различных источников углерода, обнаружено необычное воздействие низких концентраций колхицина, выражающееся в резкой стимуляции метаболизма бактерии.

**Ключевые слова:** *Rhodococcus erythropolis*, колхицин, протатраны, источник углерода

Устойчивость бактерий к действию биологически активных соединений (БАС) обусловлена с одной стороны их генетическими особенностями, а с другой условиями внешней среды. В зависимости от источника углерода в бактериальной клетке происходит перераспределение метаболических потоков, что приводит к изменению ее физиологического статуса, тем самым модулируя резистентность (1, 2). Это явление активно изучается при взаимодействии бактерий с антибиотиками, однако оно имеет место и в случае использования других БАС. Нами обнаружено необычное воздействие низких концентраций колхицина на *Rhodococcus*, выражающееся в резкой стимуляции метаболизма бактерии. У микроорганизмов, культивируемых в среде с глюкозой, внесение колхицина стимулирует катаболические процессы, что выражается в активации дыхания без значимого прироста биомассы и влияния на биопленкообразование. При росте на инозите и нафталине происходит кратковременная активация дыхания, вероятно за счет саморазрушения клеток, поэтому окислительный взрыв наблюдался в первые часы культивирования. Однако, при росте на инозите биопленкообразование возрастает, следовательно, большая часть клеток снижает метаболическую активность. Тогда как при использовании в качестве субстрата нафталине, колхицин не влияет на образование биопленок. В то же время значимая стимуляция скорости роста может быть связана с ускоренной деструкцией нафталина родококком в присутствии колхицина. Исследование поддержано грантом РФФИ, проект № 20-016-00114 А и интеграционной программой «Фундаментальные исследования и прорывные технологии как основа опережающего развития Байкальского региона и его межрегиональных связей».

1. Su Y. et al. Pyruvate cycle increases aminoglycoside efficacy and provides respiratory energy in bacteria //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – Т. 115. – №. 7. – С. E1578-E1587.

2. Meylan S. et al. Carbon sources tune antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* via tricarboxylic acid cycle control //Cell chemical biology. – 2017. – Т. 24. – №. 2. – С. 195-206.



## Research of the effect of a biological preparation based on the association of nitrogen-fixing bacteria on a legume culture

Martynenko V.V., Rysbek A.B., Kurmanbayev A.A., Baigonusova Zh.A.

RSE "National Center for Biotechnology" SC MES RK, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan

E-mail: vitalya2497@gmail.com

**Key message.** A field experiment with a biological preparation based on the association of nitrogen-fixing bacteria was carried out. As a result, the biological preparation had a positive effect on germination, length and vegetative mass of peas.

**Keywords:** biological preparation, nitrogen-fixing bacteria, peas, bacterial associations, productivity

Bacterial fertilizers allow you to take the natural potential of environment to improve mineral nutrition and plant protection. They are completely safe for humans and the environment, exclude environmental risks and make it possible to reduce the doses of applied agrochemicals and mineral fertilizers. The goal of this work is to create a biological product that increases the yield of legumes.

The cultivation of strains of nitrogen-fixing bacteria was carried out in a modified Burke's medium on a rotary shaker at 180-200 rpm and 28 °C for 48 hours [1]. Field experiments were laid on stubble of field № 5. Soft spring wheat was the predecessor. Field preparation and implementation of experiments are carried out according to the relevant recommendations of KazNIIZH [2-3], with some additions and changes accepted at the SPC GF of A.I. Baraev.

The composition of the biological preparation for legumes included an association of microorganisms (*Rhizobium* sp. strain Rh-1 + *Azotobacter chroococcum* strain Az 34 + *Agrobacterium* sp. strain Az 6 + *Agrobacterium* sp. strain Az 4). The ratio in the association is 7: 1: 1: 1, which ensures its stable work due to the symbiotic relationship of microorganisms.

To assess the effectiveness of biological preparation was conducted experiment on the fields of the LLP SPC of grain farming named after A.I. Baraev on an area of 300,000 m<sup>2</sup>. For pre-sowing treatment, 10 liters of suspension concentrate (10<sup>9</sup> CFU/ml) were used. The biological preparation was diluted five times to treat 6000 kg of pea seeds of the "Aksai Usatii-55" variety.

The growing season for peas in the field experiment was 86 days on average. The period from germination to flowering was 36-37 days for the studied samples. In the experimental field, there was not a complete harvest yet, because the ripening of peas was delayed due to the dry of 1-2 decades. However, in the experiment and control variants maturation was uneven.

Despite the unfavorable weather and soil conditions, the biological preparation provided an increase in the grain yield of peas of the "Aksaysky Usatii 55" variety by 1.38 centner/ha compared to the control variant. The structural indicators of pea plants also demonstrate the effectiveness of the preparation: early flowering, the plant height is 15.4 cm higher than in the control variant; the number of seeds per plant was 141.03, and the weight of seeds per plant was 198.2 g; while in control - 116.38 pcs. with weight of 190.2 g.

Thus, according to the results of the field experiment, the biological preparation provided the grain yield of peas equal to 13.00 centner/ha, which exceeded the control variant without treatment by 12%.

This work implemented within the BR06349586 project, funded by the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan.

1. Ibatullina R.P. Ekologicheskie aspekty primeneniya biopreparatov v Respublike Tatarstan, avtoref. kand. biol. nauk: 03.02.08. - Kazan', 2011. – 24 s.
2. Sistema zemledeliya opytnogo hozyajstva / VNIIZKH im. A.I. Baraeva. – Shortandy, 1986 g. – S. 4-6.
3. Metody izucheniya kollekcii zernobobovyh kul'tur. - L., - 1968. – 173 s.

### The role of genes of agrobacterial origin in the evolution of plants

Matveeva T.V.<sup>1</sup>, Sokornova S.V.<sup>2</sup>, Khafizova G.V.<sup>1</sup>, Dymo A.M.<sup>1</sup>, Isaeva I.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>All-Russian Research Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

Email: radishlet@gmail.com

**Key message.** The paper summarizes the latest data on naturally transgenic plants, the most conserved genes of cT-DNA, their possible functions and evolutionary role.

**Keywords:** horizontal gene transfer, naturally transgenic plants, plast genes, opine synthesis genes

In recent years, the role of horizontal gene transfer in the evolution of eukaryotes has been increasingly discussed. One of the most interesting examples of gene transfer from bacteria to eukaryotes are plants that have DNA fragments of agrobacterial origin (cT-DNA) in their genomes. The list of such plants was significantly expanded in the year 2019 [1], which opens new insight at the problem of biosafety of GMOs, and also outlined new areas of research. The aim of this work is to generalize the available data on the structure, distribution of various variants of cT-DNA, as well as the effect of some T-DNA genes on the biochemical composition of plants. Bioinformatics, molecular biological (PCR, cloning, sequencing), biochemical (TLC, GC-MS) methods were used in this work. Based on a comparison of the structures of cT-DNA, conclusions were drawn about strains of bacteria that transformed different taxa. In the course of biochemical analysis of naturally transgenic plants, contrasting in the expression of T-DNA genes, as well as transgenic plants carrying T-DNA gene homologs under an inducible promoter, it was shown that *rolC* homologs affect plant carbohydrate metabolism. In addition, the influence of T-DNA *plast*-genes on the synthesis of alkaloids in tobacco and irridoids in toadflax was noted, however, the mechanisms underlying it remain controversial.

This work was supported by the RFBR grant 18-016-00118 using the equipment of the resource center «Development of molecular and cellular technologies» of St. Petersburg State University.

### Роль генов агробактериального происхождения в эволюции растений

Матвеева Т.В.<sup>1</sup>, Сокоорнова С.В.<sup>2</sup>, Хафизова Г.В.<sup>1</sup>, Дымо А.М.<sup>1</sup>, Исаева И.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ "Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений", Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** В работе обобщены последние данные о природно-трансгенных растениях, наиболее консервативных генах клТ-ДНК, их возможных функциях и эволюционной роли.

**Ключевые слова:** горизонтальный перенос генов, природно-трансгенные растения, *plast*-гены, гены синтеза опинов

В последние годы все чаще обсуждают роль горизонтального переноса генов в эволюции эукариот. Одним из наиболее интересных примеров переноса генов от бактерий к эукариотам являются растения, имеющие в геноме фрагменты ДНК агробактериального происхождения (клТ-ДНК). Список таких растений в 2019 году был заметно расширен [1], что позволило по-новому взглянуть на проблему биобезопасности ГМО, а также наметило новые направления исследований. Целью данной работы является обобщение имеющихся данных о структуре, распространении различных вариантов клТ-ДНК, а также влиянии некоторых генов Т-ДНК на биохимический состав растений. В работе использованы биоинформатические, молекулярно-биологические (ПЦР, клонирование, секвенирование), биохимические (ТСХ, ГХ-МС) методы. На основе сравнения структур клТ-ДНК, были сделаны выводы о штаммах бактерий, трансформировавших разные таксоны. В ходе биохимического анализа природно-трансгенных растений, контрастных по экспрессии генов Т-ДНК, а также трансгенных растений, несущих гомологи генов Т-ДНК под индуцируемым промотором, было показано, что гомологи *rolC* влияют на углеводный метаболизм растений. Кроме того, отмечено влияние онкогенов Т-ДНК на синтез алкалоидов у табака и ирридоидов у льнянок, однако, механизмы, лежащие в его основе, остаются дискуссионными.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-016-00118 с использованием оборудования ресурсного центра «РМКТ» СПбГУ.

Matveeva T.V., Otten, L. (2019) Widespread occurrence of natural genetic transformation of plants by *Agrobacterium*. *Plant Mol Biol* 101: 415.

## Features of mycorrhiza *Trifolium pratense* L. in various phytocenoses

Mazurek B.G., Zhebrak I.S.

Yanka Kupala State University of Grodno, Belarus

E-mail: coryne@mail.ru

**Key message.** In four meadow phytocenoses after the restoration of anthropogenic biotopes, a high degree of mycotrophy of *Trifolium pratense* was established. Arbuscular mycorrhizal fungi (arbuscules, vesicles, free and intra-root nonseptic mycelium) and dark-colored septic endophytic fungi (sporocarpies and free septic mycelium) were revealed in the roots of the studied plants.

**Keywords:** arbuscular mycorrhiza, meadow clover, phytocenosis

Arbuscular mycorrhizal fungi play an important role in the development and stress resistance of plants. Understanding the development of arbuscular mycorrhiza during the restoration of anthropogenic landscapes is an important condition in the management of phytosystems.

The aim is to study the mycotrophy of *Trifolium pratense* meadow phytocenoses at different stages of succession after the restoration of anthropogenic biotopes.

In four phytocenoses that were at different stages of succession, 25 specimens of meadow clover plants with roots were selected. After washing, maceration and staining with aniline blue, preparations were prepared from the roots (15 fragments (1 cm) on a glass slide). The rate of occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi (F, %), the intensity of mycorrhization (M, %), and the abundance of arbuscules (A, %) were determined by the etching method [1; 2].

A high degree of mycotrophy of *Trifolium pratense* was established, which increased in phytocenoses at later stages of succession. The frequency of occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi (AMH) was 69.14-96.37%, the rate of mycorrhization was 9.01-64.69%, and the abundance of arbuscules was 7.47-56.72%. Arbuscular mycorrhiza Arum-type was revealed in all roots of meadow clover. AMGs formed arbuscules, vesicles, free and intra-root nonseptic mycelium. The vesicles in the roots of *Trifolium pratense* had round and oval shapes; in different phytocenoses, their size varied from small to large with a double shell. In phytocenosis at the initial stage of succession, clover fungi were found in meadow clover, which were represented by microsclerotia and free mycelium.

Thus, *Trifolium pratense* has a high degree of mycotrophy, which increases its stress resistance, competitiveness and allows you to participate in the process of natural overgrowth of disturbed biotopes, improve the conditions for the growth of other plants.

## Особенности микотрофности *Trifolium pratense* L. в различных фитоценозах

Мазурек Б.Г., Жебрак И.С.

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

**Аннотация.** В четырех луговых фитоценозах после восстановления антропогенных биотопов установили высокую степень микотрофности *Trifolium pratense*. В корнях исследуемых растений выявлены арбускулярные микоризные грибы (арбускулы, везикулы, свободный и внутрикорневой несептированный мицелий) и темноокрашенные септированные эндофитные грибы (спорокарпии и свободный септированный мицелий).

**Ключевые слова:** арбускулярная микориза, клевер луговой, фитоценоз

Арбускулярные микоризные грибы играют важную роль в развитии и стрессоустойчивости растений. Понимание развития арбускулярной микоризы в процессе восстановления антропогенных ландшафтов является важным условием в управлении фитосистемами.

Цель: изучить микотрофность *Trifolium pratense* луговых фитоценозов, находящихся на разных стадиях сукцессии после восстановления антропогенных биотопов.

В четырех фитоценозах, которые находились на разных стадиях сукцессии, отбирали 25 экземпляров растений клевера лугового с корнями. После промывания, мацерации и окрашивания анилиновым синим из корней готовили препараты (по 15 фрагментов (1 см) на предметное стекло). Методом Травло определяли частоту встречаемости арбускулярных микоризных грибов (F, %), интенсивность микоризации (M, %) и обилие арбускул (A, %) [1; 2].

Установили высокую степень микотрофности *Trifolium pratense*, которая увеличивалась в фитоценозах на более поздних стадиях сукцессии. Частота встречаемости арбускулярных микоризных грибов (AMГ) составляла 69,14-96,37%, интенсивность микоризации – 9,01-64,69%, обилие арбускул – 7,47-56,72%. Во всех корнях клевера лугового выявили арбускулярную микоризу Arum-тип. AMГ формировали арбускулы, везикулы, свободный и внутрикорневой несептированный мицелий. Везикулы в корнях *Trifolium pratense* имели округлые и овальные формы, в разных фитоценозах их размер менялся от мелких до крупных с двойной оболочкой. В фитоценозе на начальной стадии сукцессии у клевера лугового обнаружили темноокрашенные септированные грибы, которые были представлены микросклероциями и свободным мицелием.

Таким образом, *Trifolium pratense* имеет высокую степень микотрофности, что повышает его стрессоустойчивость, конкурентоспособность и позволяет участвовать в процессе естественного зарастания нарушенных биотопов, улучшать условия для роста других растений.

1. Лабутова, Н.М. Методы исследования арбускулярных микоризных грибов / Н.М. Лабутова. – С-Пб.: Всесоюз. науч.-исслед. ин-т с.-х. микробиол., 2000. – 24 с.
2. Trouvelot A. Mesure du taux de mycorrhization VA d, un systeme racinaire. Recherche de methods d, estimation ayant une signification fonctionnelle / A. Trouvelot, J.L. Kough, V. Gianinazzi-Pearson // Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Paris. – 1986. – P. 217-221.

## Changes in the taxonomic structure of the microbiome of chernozem southern of the rhizosphere *Triticum aestivum* L. under the influence of associative bacteria strains

Melnichuk T.<sup>1</sup>, Egovtseva A.<sup>1</sup>, Abdurashitov S.<sup>1</sup>, Andronov E.<sup>2</sup>, Abdurashitova E.<sup>1</sup>, Radchenko A.<sup>1</sup>, Ganotskaya T.<sup>1</sup>, Radchenko L.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>FSBSI “Research Institute of Agriculture of Crimea”, Simferopol; <sup>2</sup>FSBIS “All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology”, St. Petersburg, Russia  
E-mail: melnichuk7@mail.ru

**Key message.** The influence of strains associated with *Triticum aestivum* L. has been established on the taxonomic structure of the rhizosphere of the southern chernozem of Crimean Steppe. Seventeen dominant families and 126 families with a minor share are defined in the prokaryotic biome.

**Keywords:** associative bacteria, *Triticum aestivum* L., rhizosphere, prokaryotic biome, families

The search for effective microsymbionts and the introduction of strains into the rhizosphere of plants are relevant and promising areas of research for solving the problem of biologization of agricultural technologies for growing wheat, which occupies a leading position in the southern regions. The aim is to study the taxonomic structure of the microbiome of the southern chernozem of rhizosphere *Triticum aestivum* L. under the influence of associative bacteria strains.

Bacterial strains associated with *Triticum aestivum* L. were isolated by a method based on obtaining roots isolated from the external environment in a Leonard vessel. The influence of five of them on the taxonomic structure of the rhizosphere of winter wheat of the Ermak variety was evaluated in the conditions of the Chernozem of the southern Steppe of Crimea. The taxonomic structure of the prokaryotic rhizosphere biome was studied using high-performance sequencing of 16S rRNA gene libraries.

The influence of strains on their representation is shown at the level of the dominant seventeen families. A decrease in the proportion of archaea of the *Nitrososphaeraceae* family, bacterial families *Bacillaceae* and *Beijerinckiaceae*, while an increase in the proportion of *Microscillaceae* and *Chitinophagaceae*, which is an indicator of increased nutrients in the soil, was observed in all variants, except for the L1 strain. An increase in the representation of the *Sphingomonadaceae* family that reacts to arable conditions by 1.1-1.3 times was found under the influence of all the studied strains.

126 families with a minor share not exceeding 1 %, the total amount of which was from 19.47 to 21.78% in the prokaryotic biome of the wheat rhizosphere. Inoculation with the P4 strain contributed to the appearance in the rhizosphere of representatives of the families *Methanomicrobiaceae* and *Phycisphaeraceae*, in their absence in the control, and, conversely, to a decrease in the proportion of *Deinococcaceae* and *Trueperaceae* to 0.0 %, while the L1 strain increased them by 1.4 and 4.0 times, respectively, in comparison with the control. Bacteria of the *Chthoniobacteraceae* family serve as an indicator of a rich environment and favorable soil conditions, the share of their representatives in the chernozem southern of rhizosphere of wheat tended to increase under the influence of P4 and M3 strains.

The work was carried out within the framework of the state task of fundamental research No. 0834-2019-0005 and with the support of the RFBR grant A18-016-00197.

## Изменения в таксономической структуре микробиома чернозема южного ризосферы *Triticum aestivum* L. под влиянием ассоциативных штаммов бактерий

Мельничук Т.Н.<sup>1</sup>, Еговцева А.Ю.<sup>1</sup>, Абдурашитов С.Ф.<sup>1</sup>, Андронов Е.Е.<sup>2</sup>, Абдурашитова Э.Р.<sup>1</sup>,  
Радченко А.Ф.<sup>1</sup>, Ганоцкая Т.Л.<sup>1</sup>, Радченко Л.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», Симферополь; <sup>2</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** На черноземе южном Степи Крыма установлено влияние ассоциативных с *Triticum aestivum* L. штаммов на таксономическую структуру ризосферы. В прокариотном биоме определено семнадцать доминирующих семейств и 126 семейств с минорной долей.

**Ключевые слова:** ассоциативные бактерии, *Triticum aestivum* L., ризосфера, прокариотный биом, семейства

Поиск эффективных микросимбионтов и интродукция штаммов в ризосферу растений являются актуальными и перспективными направлениями исследований для решения проблемы биологизации агротехнологий выращивания пшеницы, занимающей лидирующие позиции в южных регионах. Цель – изучить таксономическую структуру микробиома чернозема южного ризосферы *Triticum aestivum* L. под влиянием ассоциативных штаммов бактерий.

Ассоциативные с *Triticum aestivum* L. штаммы бактерий выделяли, используя основанный на получении изолированных от внешней среды корней в сосуде Леонарда метод. Влияние пяти из них на таксономическую структуру ризосферы озимой пшеницы сорта Ермак оценивали в условиях чернозема южного Степи Крыма. Изучение таксономической структуры прокариотного биома ризосферы проводили с использованием высокопроизводительного секвенирования библиотек гена 16S рРНК.

На уровне доминирующих семнадцати семейств показано влияние штаммов на их представительство. Во всех вариантах, кроме штамма L1, отмечено уменьшение доли архей семейства *Nitrososphaeraceae*, бактериальных семейств *Bacillaceae* и *Beijerinckiaceae*, при этом увеличение доли *Microscillaceae* и *Chitinophagaceae*, являющегося индикатором повышения питательных веществ в почве. Увеличение представительства семейства *Sphingomonadaceae*, реагирующего на пахотные условия, в 1,1-1,3 раза установлено под влиянием всех исследуемых штаммов.

В прокариотном биоме чернозема южного ризосферы пшеницы определено 126 семейств с минорной долей, не превышающей 1 %, общая сумма которых составила по вариантам от 19,47 до 21,78 %. Инокуляция штаммом P4 способствовала появлению в ризосфере представителей семейств *Methanomicrobiaceae* и *Phycisphaeraceae*, при их отсутствии в контроле и, наоборот, снижению доли среди *Deinococcaceae* и *Trueperaceae* до 0,0 %, тогда как штаммом L1 – их увеличению в 1,4 и 4,0 раза соответственно в сравнении с контролем. Показателем богатой среды и благоприятных почвенных условий служат бактерии семейства *Chthoniobacteraceae*, доля их представителей в черноземе южном ризосферы пшеницы имела тенденции к увеличению под влиянием штаммов P4 и M3.

Работа выполнена в рамках государственного задания фундаментальных исследований № 0834-2019-0005 и при поддержке гранта РФФИ A18-016-00197.



### Transformation of plants with target gene encoding glutathione S-transferase to induce stress resistance

Mikhaylova E.V., Shein M.Yu., Alexeev V. Yu., Baimukhametova E.A., Musin Kh.G., Nikonorov Yu.M., Kuluev B.R.

Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, Ufa, Russia

E-mail: mikhale@list.ru

**Key message.** Transgenic plants *Nicotiana tabacum*, *Brassica napus*, *B. rapa*, *Eruca sativa* with target gene *AtGSTF11* were created. Their stress resistance is being studied.

**Keywords:** *AtGSTF11*, *Nicotiana tabacum*, *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Eruca sativa*

Glutathione S-transferases (GSTs) play an important role in plant response to stress because they catalyze the conjugation of glutathione with toxic molecules [1]. In *Arabidopsis thaliana* alone there are seven clades of *GST* genes [2]. Functions and role of many of these genes remain uncertain.

Gene *AtGSTF11* was chosen as a target gene, because in our experiments its expression was induced by drought and salinity stress, and decreased under heat stress, which suggests that this gene is involved in the formation of plant defense reaction. There is also data on its role in the synthesis of glucosinolates [2] that protect plants of family *Brassicaceae* from pests and diseases.

Genetic construct with target gene *AtGSTF11* was made on the basis of 1301 pCAMBIA vector. It was cloned to *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. Bacteria were used for transformation of *N. tabacum* explants *in vitro* and rapeseed *B. napus*, turnip *B. rapa*, arugula *E. sativa* by floral dip method (*in planta*). This technique is universal for the plants of family *Brassicaceae*.

Transgenic plants demonstrated increased resistance to stress factors, however the framework of these factors was different in each species. Most probably, the product of *AtGSTF11* gene helps the plant to manage oxidative stress of different origin.

Research was supported by grant of President of Russian Federation MK-1146.2020.11 and partially by state assignment № АААА-А16-116020350028-4

### Создание трансгенных растений с целевым геном, кодирующим глутатион-S-трансферазу, для повышения их стрессоустойчивости

Михайлова Е.В., Шейн М.Ю., Алексеев В.Ю., Баймухаметова Э. А., Мусин Х.Г., Никонов Ю.М., Кулуев Б.Р.

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

**Аннотация.** Получены трансгенные растения видов *Nicotiana tabacum*, *Brassica napus*, *B. rapa*, *Eruca sativa* с целевым геном *AtGSTF11*. Проводится оценка их устойчивости к стрессу.

**Ключевые слова:** *AtGSTF11*, *Nicotiana tabacum*, *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Eruca sativa*

Глутатион-S-трансферазы (GST) играют важную роль в обеспечении устойчивости растений к стрессу благодаря тому, что катализируют реакции связывания глутатионом токсичных молекул [1]. Только в *Arabidopsis thaliana* различают семь семейств генов *GST* [2]. Функции и роль многих из них до сих пор не исследованы.

Ген *AtGSTF11* был выбран в качестве целевого, поскольку в наших исследованиях его экспрессия в арабидопсисе возрастала в условиях засухи и солевого стресса, а при высокотемпературном стрессе — снижалась, что говорит об участии данного гена в формировании защитной реакции растения. Также имеются данные о его роли в синтезе глюкозинолатов [2], которые защищают растения семейства Капустных от вредителей и различных заболеваний.

На основе вектора pCAMBIA 1301 была создана генно-инженерная конструкция с целевым геном *AtGSTF11*. Методом электропорации конструкция была клонирована в *Agrobacterium tumefaciens*, которые в дальнейшем использовались для трансформации эксплантов табака *N. tabacum in vitro* и рапса *B. napus*, репы *B. rapa*, руколы *E. sativa* методом погружения цветков (*in planta*). Данный метод является универсальным для растений семейства *Brassicaceae*.

У трансгенных растений наблюдалось повышение устойчивости к стрессовым факторам, однако спектр этих факторов различался у разных биологических видов. Вероятно, продукт гена *AtGSTF11* помогает растению справляться с окислительным стрессом разной природы.

Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ МК-1146.2020.11 и частично по государственному заданию № АААА-А16-116020350028-4.

1. Kuluev, B. R., Berezhneva, Z. A., Mikhaylova, E. V., Postrigan, B. N., Knyazev, A. V. (2018). Productivity and Stress-Tolerance of Transgenic Tobacco Plants with a Constitutive Expression of the Rapeseed Glutathione Synthetase Gene BnGSH. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 8(2), 190-196.
2. Krajewski, M. P., Kanawati, B., Fekete, A., Kowalski, N., Schmitt-Kopplin, P., Grill, E. (2013). Analysis of *Arabidopsis* glutathione-transferases in yeast. *Phytochemistry*, 91, 198-207.



**Genetic and phenotypic diversity of rare species of genus *Iris* L in the Southern Urals**Mikhaylova E.V.<sup>1</sup>, Mustafina A.N.<sup>2</sup><sup>1</sup>Institute of biochemistry and genetics UFRC RAS, Ufa, Russia; <sup>2</sup>South Ural Botanical Garden UFRC RAS, Ufa, Russia

E-mail: mikhele@list.ru

**Key message.** We studied 11 populations of rare species *Iris pumila* and *I. scariosa* in Southern Urals. Sequencing of four different genetic markers was performed for the first time.

**Keywords:** *Iris scariosa*, *Iris pumila*, *trnL-F*, *atpF-atpH*, *rpS4-trnT*

While *I. pumila* is widely used in breeding of new varieties of irises, *I. scariosa* is a poorly studied species, rarely mentioned in the literature. In Russia both species are considered rare and included in the Red List of threatened species. We earlier estimated genetic diversity of the samples from 11 different populations of *Iris* in Southern Urals using RAPD and ISSR markers [1]. Unfortunately, the results obtained by these methods can not be compared to literature data. In databases there are available full chloroplast sequences of *I. gatesii*, *I. missouriensis*, *I. sanguinea*, as well as sequences of several chloroplast markers of other iris species. So, sequencing allows to estimate uniqueness of local populations in global scale.

DNA from plant material was extracted using salt method [1]. Universal primers [2] were used for amplification of *trnL-F*, *atpF-atpH*, *rpoC1* and *rpS4-trnT* markers. Sequencing results demonstrated that both species from Southern Urals are closer related to *I. gatesii* и *I. bicapitata*. *TrnL-F* is the most suitable marker to study polymorphism between *I. pumila* and *I. scariosa*, however there were no differences between these species in *rpoC1* sequence. To evaluate the possibility of hybridization between them, additional sequencing of nuclear markers is required. In The Southern Urals environmental factors affect the phenotype of *Iris* species the most. Anthropogenic impact results in reduction of the biomass, decrease in the number of flowers and yield. There is an urgent demand for special protected areas to save rare species of *Iris*.

This work was supported by the RFBR grant mol\_a 18-34-00022.

**Генотипическое и фенотипическое разнообразие редких видов рода *Iris* L. на Южном Урале**Михайлова Е.В.<sup>1</sup>, Мустафина А.А.<sup>2</sup><sup>1</sup>Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия; <sup>2</sup>Южно-Уральский ботанический сад-институт УФИЦ

РАН, Уфа, Россия

**Аннотация.** Изучены редкие виды ирисов *Iris pumila* и *I. scariosa*, произрастающие на Южном Урале. Впервые проведено секвенирование четырех различных генетических маркеров у образцов из 11 популяций.

**Ключевые слова:** *Iris scariosa*, *Iris pumila*, *trnL-F*, *atpF-atpH*, *rpS4-trnT*

Тогда как *I. pumila* — растение, широко используемое для получения новых культурных сортов ирисов путем гибридизации, *I. scariosa* — малоизученный вид, который крайне редко упоминается в литературе. В России они считаются редкими и занесены в Красную книгу. Ранее генетическое разнообразие образцов из 11 популяций на Южном Урале, относящихся к этим двум видам, было оценено нами при помощи RAPD и ISSR маркеров [1]. Однако этот метод не позволяет провести сравнение с результатами других исследований. В базах данных доступны полные сиквенсы хлоропластного генома *I. gatesii*, *I. missouriensis*, *I. sanguinea*, а также последовательности хлоропластных маркеров некоторых других видов. Таким образом, секвенирование дает возможность оценить уникальность местных популяций в мировом масштабе.

ДНК из растительных образцов выделяли солевым методом [1]. Для амплификации целевых последовательностей *trnL-F*, *atpF-atpH*, *rpoC1* и *rpS4-trnT* использовали универсальные праймеры [2]. Результаты секвенирования показали, что оба Южноуральских вида имеют наибольшее генетическое сходство с *I. gatesii* и *I. bicapitata*. Наилучшим для оценки генетического полиморфизма между *I. pumila* и *I. scariosa* является маркер *trnL-F*, тогда как в последовательности *rpoC1* между двумя видами различий не наблюдалось. Для оценки возможности гибридизации между ними необходимо дополнительное секвенирование ядерных маркеров. На изменение фенотипа ирисов на Южном Урале влияют экологические факторы: при усилении антропогенной нагрузки растения мельчают, хуже цветут и плодоносят. Имеется необходимость в создании специальных ООПТ для охраны редких видов ирисов.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ мол\_a № 18-34-00022.

1. Mikhaylova, E. V., Mustafina, A. N., Golovanov, Y. M., Kryukova, A. V. (2019). Rare species *Iris scariosa* and *I. pumila* in the Southern Urals. *Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology*, 24, 156.

2. Matveeva, T. V., Pavlova, O. A., Bogomaz, D. I., Demkovich, A. E., Lutova, L. A. (2011). Molecular markers for plant species identification and phylogenetics. *Ecological genetics*, 9(1), 32-43.

**Microbial composition with the properties of plant growth promoter, biofertilizer and biological fungicide**Mikhailouskaya N.A.<sup>1</sup>, Voitka D.V.<sup>2</sup>, Yuzefovitch E.K.<sup>2</sup><sup>1</sup>RUP “Institute for Soil Science and Agrochemistry”, Minsk; <sup>2</sup>RUP “Institute of Plant Protection”, Priluki, Belarus

E-mail: bionfi@yandex.ru, voitka@tut.by

**Key message.** Microbial composition *A. brasilense*+*B. circulans*+*T. longibrachiatum* (MC) is effective inoculant for grain crops growing in erosion agrolandscaps. MC reveals the properties of plant growth promoter, biological fertilizer and biological fungicide. Poly functional positive action of three-component MC resulted in the increase of grain crops yield and improvement of its quality in stress conditions in erosion agrolandscaps.

**Keywords:** microbial composition, growth promotion, biocontrol, barley, rye, crop yield

Actual technique for making crop production ecological is application of microbial preparation of highly action spectrum. The purpose of investigation was to estimate microbial composition's (MC) potential to increase crop yield and its quality as well as to protect grain crops from root infections. Influence of rhizobacteria on plant developments at earlier phases of ontogenesis was studied in laboratory experiments. Effectiveness of MC was studied in field experiments with spring barley and winter rye growing on sod-podzolic eroded soils. Microbial composition contains three components: *Azospirillum brasilense* 2(b)3 + *Bacillus circulans* K-81 + *Trichoderma longibrachiatum* L-7. Plant growth stimulation is one of the most important effects of inoculation. Combined application of rhizobacteria *A. brasilense* + *B. circulans* (*in vitro*) induced significant hormonal effect. Roots dry mass was increased by 28%, roots length per plant – by 25%, stem dry mass – by 33%. Treatment of barley sowing by microbial composition provided the reduction of root rot incidence by 52.0 – 58.0%, disease development – in 2.6 – 2.9 times, biological efficiency was 66.3 – 69.5%. Treatment of winter rye sowing resulted in the reduction of disease incidence by 42.4 – 45.0%, disease development – in 2.0 – 2.6 times, biological efficiency – 50.2 – 61.2% accordingly to soil-erosion catena. Application of microbial composition provided barley grain responses: 5.2 c ha<sup>-1</sup> (9.3%), 4.9 c ha<sup>-1</sup> (9.2%) and 2.5 c ha<sup>-1</sup> (4.8%), winter rye responses – 3.8 c ha<sup>-1</sup> (7.0%), 3.8 c ha<sup>-1</sup> (7.4%) and 4.5 c ha<sup>-1</sup> (9.8%) on watershed, weakly- and moderately eroded soils. Effective biological control of root infections is of great importance in order to prevent crop yield losses. Reliable increase of protein content in grain was obtained. The components of microbial composition directly or indirectly improve adaptation potential of grain crops growing in erosion agrolandscaps. Rhizobacteria stimulate root development and mobilization of nitrogen, phosphorus and potassium from atmosphere, soil and fertilizers. Antagonistic fungi provide effective biological control of pathogens. Microbial composition reveals the properties of plant growth promoter, biological fertilizer and biological fungicide. Poly functional positive action of three-component microbial inoculant resulted in the increase of grain crops yield and improvement of its quality in stress conditions of cultivation in erosion agrolandscaps.

**Микробная композиция, сочетающая свойства регулятора роста, биоудобрения и биофунгицида**Михайловская Н.А.<sup>1</sup>, Войтка Д.В.<sup>2</sup>, Юзефович Е.К.<sup>2</sup><sup>1</sup>Институт почвоведения и агрохимии, Минск, Беларусь; <sup>2</sup>Институт защиты растений, Прилуки, Беларусь

**Аннотация.** Микробная композиция *A. brasilense*+*B. circulans*+*T. longibrachiatum* (МК) – эффективный инокулянт для ячменя ярового и ржи озимой при возделывании на эродированных почвах. Компоненты МК стимулируют развитие корневой системы растений, мобилизацию азота, фосфора и калия из атмосферы, почвы и удобрений, обеспечивают эффективный биологический контроль фитопатогенов. Аддитивное действие компонентов МК повышает урожайность и качество продукции зерновых культур.

**Ключевые слова:** микробная композиция, стимуляция роста, биоконтроль, ячмень, рожь

Актуальным приемом экологизации растениеводства является применение микробных препаратов широкого спектра действия. Цель работы – оценка потенциала микробной композиции (МК) по повышению урожайности и качества продукции, защите зерновых культур от корневых инфекций. Влияние ризобактерий на развитие растений на ранних этапах онтогенеза изучено в *in vitro* экспериментах. Эффективность МК на посевах ячменя ярового и ржи озимой установлена в полевом стационаре на эродированных почвах. Микробная композиция включает штаммы гриба-антагониста *Trichoderma longibrachiatum* L-7, азотфиксирующей (*Azospirillum brasilense* 2(b)3) и калиймобилизующей (*Bacillus circulans* K-81) ризобактерий. Совместное применение ризобактерий *A. brasilense* + *B. circulans* оказывало значимый гормональный эффект: стимуляция сухой массы корней – 28%, суммарной длины корешков/растение – 25%, сухой массы проростков – 33%. Обработка посевов МК снижала распространенность корневой гнили ячменя ярового на 52,0, 54,0 и 58,0%, развитие болезни (восковая спелость) – в 2,9, 2,8 и 2,6 раза, биологическая эффективность МК – 69,5, 66,3 и 67,6%, на посевах ржи озимой (молочная спелость) – на 45,0%, 42,4% и 42,9%, развитие болезни – в 2,6, 2,1 и 2,0 раза, биологическая эффективность – 61,2%, 52,5% и 50,2% на незэродированной, слабо- и среднеэродированной почвах соответственно. Применение МК обеспечило прибавки урожайности зерна ячменя ярового – 5,2 (9,3%) и 4,9 (9,2%) ц/га, ржи озимой – 7,0%, 7,4% и 9,8% на незэродированной, слабо- и среднеэродированной почвах. При использовании МК отмечено достоверное повышение содержания белкового азота в зерне ячменя ярового и ржи озимой. Компоненты МК прямо или косвенно повышают адаптивный потенциал зерновых культур при возделывании на эродированных почвах. Бактериальные компоненты стимулируют развитие корневой системы растений и улучшают мобилизацию азота, фосфора и калия из атмосферы, почвы и удобрений. Грибной компонент МК обеспечивает эффективный биологический контроль фитопатогенов. Полифункциональное положительное действие составных компонентов микробной композиции повышает продуктивный статус, урожайность и качество продукции зерновых культур в условиях стресса при возделывании в эрозионных агроландшафтах.

**Effect of wheat seed bacterization on the peroxidase activity under high temperature**Minaeva O.M.<sup>1,2</sup>, Akimova E.E.<sup>1,2</sup>, Zyubanova T.I.<sup>1,2</sup>, Tereshchenko N.N.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Tomsk State University, Tomsk, Russia; <sup>2</sup>Siberian Research Institute of Agriculture and Peat, Tomsk, Russia

E-mail: mom05@mail.ru

**Key message.** The paper shows the possibility of using *Aeromonas media* and *Pseudomonas extremorientalis* to reduce the negative effects of elevated temperatures on wheat, which was evaluated through peroxidase activation.

**Keywords:** ROS, peroxidase, abiotic stress, bacterization

Peroxidases play a key role in the cell to maintain molecules in the reduced state, which is necessary for the normal existence of living organisms. Under negative abiotic factors, such as elevated temperature and lack of moisture, oxidative stress, associated with an increase in the content of reactive oxygen species and activation of peroxidase activity, arises in plant cells. It is known that bacterization of plants reduces the negative effects of stress, accelerates their growth and development, and increases crop productivity.

The aim of this research was to study the effect of bacterization of wheat seeds on the activity of guaiacol-dependent peroxidases in the tissues of wheat plants under elevated temperatures and low humidity.

The objects of the research were 12-day wheat plants (*Triticum aestivum* L., Iren cultivar) and a liquid 24-hour bacterial culture (*Aeromonas media* GS4 and *Pseudomonas extremorientalis* PhS1). Plants were grown in a climate chamber (Growth Chamber GLK-300, Korea) in plastic containers with sand. The light intensity was 200  $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2 \text{ s})$  of PAR with a 16-hour photoperiod at 18–20°C (day) and 14–16°C (night) and 75% humidity for the first 6 days and a temperature of 30–31°C and 23–24°C, respectively, and humidity 40% further on. The peroxidase activity in the leaves and roots of plants was determined spectrophotometrically and calculated according to Chance and Maehly (1955).

It was found that bacterization of seeds increases the peroxidase activity in wheat tissues, reducing the negative effects of stress, which was detected in a decrease in plant damage by root rot pathogens (3–5 times in relation to control) and an increase in plant height (up to 10%). The peroxidase activity in plant leaves increased by 38.7% ( $p < 0.05$ ) during bacterization of *A. media* GS4 and by 34.7% for the *P. extremorientalis* PhS1 with respect to the enzyme activity of the nonbacterized plants. The peroxidase activity during bacterization increased by 82.3% and 2.1 times, respectively ( $p < 0.05$ ) in roots. Thus, the possibility of using experimental bacterial strains to increase the wheat resistance to abiotic stress caused by high temperatures and low humidity under model conditions has been shown.

**Влияние бактериализации семян пшеницы на активность пероксидаз в условиях повышенных температур**Minaeva O.M.<sup>1,2</sup>, Akimova E.E.<sup>1,2</sup>, Zyubanova T.I.<sup>1,2</sup>, Терещенко Н.Н.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия; <sup>2</sup>СибНИИСХиТ – филиал СФНЦА РАН, Томск, Россия

**Аннотация.** Показана возможность применения *Aeromonas media* и *Pseudomonas extremorientalis* для уменьшения негативных последствий повышенных температур на пшеницу, которое оценивали через активизацию пероксидаз.

**Ключевые слова:** АФК, пероксидаза, абиотический стресс, бактериализация

В клетке пероксидазы играют ключевую роль в поддержании молекул в восстановленном состоянии, что необходимо для нормального существования живых организмов. При воздействии абиогенных неблагоприятных факторов, таких как повышенная температура и недостаток влаги, в клетках растений развивается окислительный стресс, связанный с увеличением содержания активных форм кислорода и активизацией деятельности пероксидаз. Известно, что бактериализация растений приводит к уменьшению негативных последствий стресса, ускорению их роста и развития и увеличению продуктивности культур.

Цель работы: изучить влияние бактериализации семян пшеницы на активность гваякол-зависимых пероксидаз в тканях растений пшеницы в условиях повышенных температур и пониженной влажности.

Объекты исследования: 12-ти дневные растения пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Ирень) и жидкая 24-часовая культура бактерий (*Aeromonas media* GS4 и *Pseudomonas extremorientalis* PhS1). Растения выращивали в климатокамере (Growth Chamber GLK-300, Корея) в пластиковых контейнерах с песком. Интенсивность освещения – 200  $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2 \text{ сек})$  ФАР с 16-часовым фотопериодом при 18–20°C (дневные температуры) и 14–16°C (ночные) и влажности 75% в течение первых 6 суток и температурой 30–31°C и 23–24°C соответственно и влажности 40% далее. Активность пероксидаз в листьях и корнях растений определяли спектрофотометрическим методом, рассчитывали по методу Chance and Maehly (1955).

Установлено, что бактериализация семян повышает активность пероксидаз в тканях пшеницы, уменьшая негативные последствия стресса, что выражалось в снижении пораженности растений возбудителями корневых гнилей (в 3–5 раз по отношению к контролю) и увеличении длины растений (до 10%). Активность пероксидаз в листьях растений увеличивалась на 38,7% ( $p < 0,05$ ) при бактериализации *A. media* GS4 и на 34,7% для варианта с *P. extremorientalis* PhS1 по отношению к активности фермента контрольных растений. В корнях активность пероксидаз при бактериализации увеличивалась на 82,3% и в 2,1 раза соответственно ( $p < 0,05$ ). Таким образом, показана возможность применения экспериментальных бактериальных штаммов для увеличения резистентности пшеницы к абиотическому стрессу, вызванному высокими температурами и пониженной влажностью, в модельных условиях.

**Strain *Aspergillus niger* AM1 – a living organism resistant to white phosphorus**Mindubaev A.Z.<sup>1</sup>, Babynin E.V.<sup>2</sup>, Badeeva E.K.<sup>1</sup>, Akosah Y.A.<sup>2</sup><sup>1</sup>A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences; <sup>2</sup>Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

E-mail: mindubaev-az@yandex.ru

**Key message.** Copper sulphate has no effect on the growth of aspergill in a media with white phosphorus. We compared the white phosphorus resistance of *A. niger* AM1 with three strains from the All-Russian Collection of Microorganisms. Highest resistance was observed in AM1.

**Keywords:** biodegradation, white phosphorus, *Aspergillus niger*, bacteria, minimal inhibitory concentration, culture media

Despite the duration and depth of research on the biodegradation of white phosphorus, until recently there were still doubts whether the biodegradation really did occur. White phosphorus reacts with ions of divalent copper even at room temperature. And the Pridham-Gottlieb medium, which we have chosen for our purposes, contains copper sulfate in its composition. The addition of an emulsion of white phosphorus led to the formation of a black precipitate, which is evidence that a chemical reaction took place. Thus, the growth of microorganisms occurred in the presence of not so much white phosphorus as the products of its chemical transformations, and the experiments were not completely clean. Therefore, in the present study, we carried out further modification of the Pridham-Gottlieb nutrient medium, excluding from it not only phosphates as a source of phosphorus, but also copper sulfate. In addition, we compared the white phosphorus resistance of our *A. niger* strains AM1 and AM2, with three strains from the All-Russian Collection of Microorganisms (ARCM) (strains FW-650, FW-2664 and FW-2731), as well as four different bacterial species. Though highest resistance was observed in strain AM1, the three strains of *A. niger*, sent from ARCM, also showed a higher resistance to white phosphorus than the bacteria. It was shown that exclusion of copper sulfate from the composition of the nutrient medium with white phosphorus does not prevent the growth of fungi. In addition, white phosphorus does not react with the formation of a precipitate and remains for a longer period under these conditions. This fact is a serious argument in favor of biodegradation and has practical applicability in the method of microbial detoxification of white phosphorus. However, a higher resistance of AM1 in comparison to the ARCM strains was only observed in a medium with copper. Apparently, strain AM1 is most resistant to the toxic products from the reaction of white phosphorus with Cu<sup>2+</sup>.

**Штамм *Aspergillus niger* AM1 - живой организм, устойчивый к белому фосфору**Mindubaev A.Z.<sup>1</sup>, Бабынин Э.В.<sup>2</sup>, Бадеева Е.К.<sup>1</sup>, Акосах Й.А.<sup>2</sup><sup>1</sup>Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия; <sup>2</sup>ГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

**Аннотация.** Показано, что сульфат меди не влияет на рост аспергиллов в средах с белым фосфором. Мы сравнили устойчивость к белому фосфору штамма *A. niger* AM1 и трех штаммов из Всероссийской коллекции микроорганизмов. У штамма AM1 она выше.

**Ключевые слова:** биодegradация, белый фосфор, *Aspergillus niger*, бактерии, минимальная ингибирующая концентрация, культуральные среды.

Несмотря на длительность и глубину исследований биодegradации белого фосфора, до последнего времени оставались сомнения в том, что биодegradация существует. Белый фосфор даже при комнатной температуре реагирует с ионами двухвалентной меди, а среда Придхем-Готтлиба, которую мы выбрали для наших целей, содержит в своем составе сульфат меди. При добавлении в эту среду эмульсии белого фосфора выпадал осадок черного цвета, т.е. реакция действительно происходила. Таким образом, рост микроорганизмов происходил в присутствии не столько белого фосфора, сколько продуктов его химических превращений, и эксперименты оказывались не вполне чистыми. Поэтому, в представленной работе мы осуществили дальнейшую модификацию питательной среды Придхем-Готтлиба, исключив из нее не только фосфаты в качестве источника фосфора, но и сульфат меди. Помимо этого, мы сравнили устойчивость к белому фосфору нашего штамма черного аспергилла AM1 и трех штаммов из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) (FW-650, FW-2664 и FW-2731), а также четырех видов бактерий. Три штамма *A. niger*, присланные из ВКМ, так же продемонстрировали более высокую устойчивость к белому фосфору, чем бактерии. Но у штамма AM1 она все равно выше. Показано, что исключение из состава питательной среды с белым фосфором сульфата меди не препятствует росту грибов, хотя белый фосфор в этих условиях не вступает в реакцию с образованием осадка и сохраняется более длительное время. Этот факт является серьезным аргументом в пользу биодegradации и практической применимости метода детоксикации белого фосфора микроорганизмами. Тем не менее, более высокая устойчивость AM1 по сравнению с штаммами из ВКМ проявляется в среде с медью. По-видимому, он наиболее устойчив именно к токсичным продуктам реакции белого фосфора с Cu<sup>2+</sup>.

### **Taxonomic diversity of lipolytic bacteria isolated at oil refineries in Krasnodar that is promising for bio-preparation**

Moiseeva E.V., Bobrikova L.P., Karaseva E.V., Khudokormov A.A., Samkov A.A., Volchenko N.N.  
Kuban State University, Krasnodar, Russia  
E-mail: moisieieva97@inbox.ru

**Key message.** From the lipid-containing wastes, 20 strains of bacteria were isolated. According to MALDI, their taxonomic identity is established, the 13 most active lipolytic strains are classified as 8 genera, the dominant is the genus *Pseudomonas*.

**Keywords:** lipolytic bacteria, waste, lipids, screening

The intensive growth of food production, as well as the increase in the number of catering establishments, lead to the formation and accumulation of waste containing fats and oils. These wastes belong to the fourth hazard class and are subject to mandatory disposal. Due to their hydrophobicity and high density, the lipid-containing wastes adversely affect the capacity and other physico-chemical characteristics of the soil. One of the promising methods of their destruction is biotechnological. It is safe, environmentally friendly, economically viable and does not require expensive equipment. The disadvantages of this method include the increase in the time required for the biodegradation process.

This problem can be solved by selecting strains of lipolytic enzyme producers. The search for strains was carried out at the enterprises of the food industry, producing drawings of the city of Krasnodar. Samples of soils contaminated with lipids were taken, as well as samples of fat shoulder straps. To isolate lipolytic microorganisms, the sample of each sample was cultivated on a liquid mineral medium with sunflower oil for 24 hours. Colony of microorganisms on solid mineral media with oil were obtained by the method of maximum reconnaissance. Subsequent screening on solid and liquid media with different concentrations of oil and fat, as well as on the formation of an opaque zone, lipases are released on a medium with tween-80. The active lipid destructors were 13 strains that were identified by the MALDI-TOF method. Ninety-two numbers of isolated strains belong to the phylum *Proteobacteria*. One strain of the genus *Agrobacterium* was belonging from the class *Alphaproteobacteria*, and a 2 strain of the genus *Burkholderia* from the class *Betaproteobacteria*. Nine cultures belonging to 5 genera belong to the class *Gammaproteobacteria*. One strain belongs to the phylum *Firmicutes*. Active lipid destructors were representatives of the genus *Pseudomonas*. Some of these strains, when evaluating their biotechnological properties, can be used as potential destructors of lipid-containing waste.

### **Таксономическое разнообразие бактерий липолитиков, выделенных на маслоперерабатывающих предприятиях города Краснодара, перспективных для создания биопрепарата**

Моисеева Е.В., Бобрикова Л. С., Карасева Э.В., Худокормов А.А., Самков А.А., Волченко Н.Н.  
ФГБОУ ВО Кубанский Государственный университет, Краснодар, Россия

**Аннотация.** Из липидсодержащих отходов выделено 20 штаммов бактерий. По MALDI установлена их таксономическая принадлежность, 13 наиболее активных штаммов липолитиков отнесены к 8 родам, доминирующим является род *Pseudomonas*.

**Ключевые слова:** бактерии липолитики, отходы, липиды, скрининг

Интенсивный рост производства пищевых продуктов, а также увеличение числа предприятий общественного питания, приводят к образованию и накоплению отходов, содержащих жиры и масла. Эти отходы относятся к четвертому классу опасности и подлежат обязательной утилизации. Из-за гидрофобности и высокой плотности, липидсодержащие отходы отрицательно влияют на пропускную способность и другие физико-химические характеристики почвы. Один из перспективных методов их деструкции это биотехнологический. Он безопасен, экологичен, экономически выгоден и не требует дорогостоящего оборудования. К недостаткам этого метода можно отнести увеличение времени, необходимого на процесс биодegradации.

Данную проблему можно решить путем подбора штаммов продуцентов липолитических ферментов. Поиск штаммов осуществляли на предприятиях пищевой промышленности, расположенных в черте города Краснодара. Были взяты пробы почв, загрязненных липидами, а также отобраны образцы жировых поганов, порошка фильтровального и воды из жироловушек. Для выделения микроорганизмов-липолитиков навеска каждой пробы культивировалась на жидкой минеральной среде с подсолнечным маслом в течение 24 часов. Методом предельных разведений были получены изолированные колонии микроорганизмов на плотных минеральных средах с маслом. Путем последующего скрининга на плотных и жидких средах с разной концентрацией масла и говяжьего жира, а также по образованию непрозрачной зоны выделения липаз на среде с твином-80 произвели отбор перспективных штаммов. Активными деструкторами липидов оказались 13 штаммов, которых идентифицировали методом MALDI-TOF. Девяносто два процента выделенных штаммов относятся к филуму *Proteobacteria*. Из класса *Alphaproteobacteria* выделен один штамм рода *Agrobacterium*, из класса *Betaproteobacteria* 2 штамма рода *Burkholderia*. Девять культур, входящих в 5 родов, принадлежат классу *Gammaproteobacteria*. Один штамм принадлежит к филуму *Firmicutes*. Активными деструкторами липидов были представители рода *Pseudomonas*. Некоторые из этих штаммов при дальнейшей оценке их биотехнологических свойств, могут быть использованы в качестве потенциальных деструкторов липидсодержащих отходов.



### Editing of genes coding protein involved in maize gamete membrane interaction and fusion

Moiseeva Ye.M., Gusev Yu.S., Volokhina I.V., Fadeev V.V., Mazilov S.I., Chumakov M.I.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

E-mail: em-moiseeva@mail.ru

**Key message.** An agrobacterial transformation of maize was performed using a CRISPR/Cas9 vector for knockout the *Zm\_gex2* and *Zm\_gsc1* genes.

**Keywords:** CRISPR/Cas9, *Zea mays*, gamete interaction, membrane fusion

In the case of gynogenesis (parthenogenesis) one of the sperm does not fuse with the egg and only the egg nucleus is involved in the subsequent embryo development, forming a matrocline haploid. However, the molecular genetic mechanism of gynogenesis is unknown. In 2017 for the first time we discovered and described the maize *Zm\_gex2* and *Zm\_gsc1* genes that presumably control the gamete interaction and membranes fusion (Volokhina et al., Russ. J. Development. 2017.2:134-139).

The aim of the work is to obtain maize plants with mutations in the gamete membranes interaction and fusion genes.

We used CRISPR/Cas9 technology for editing the *Zm\_gex2* and *Zm\_gsc1* genes. 1645 immature maize embryos were isolated from ovaries at 10-15-days after pollination and were subjected for agrobacterial transformation. 65 maize plants were transformed by the *in planta* method.

We prepare CRISPR/Cas9 constructs containing gRNA to the target *Zm\_gsc1* and *Zm\_gex2* genes. The specific gRNA to several sites of *Zm\_gsc1* and *Zm\_gex2* genes were synthesized and cloned to the CRISPR/Cas9 vector pKir1.1 expressing non-coding RNA (gRNA) and Cas9 nuclease. The CRISPR/Cas9-constructs were introduced into the genetically labeled KM maize line genome using agrobacterial transformation by the *in planta* and *in vitro* methods. In 2019 we obtained 2094 and 5191 maize grains after agrobacterial transformation in *in planta* method using CRISPR/Cas9 constructs with gRNA for the *Zm\_gsc1* and *Zm\_gex2* genes, respectively. T-DNA insertion by PCR method was performed.

This work was carried out in a part by the program of Fundamental scientific research of the state academies of sciences for 2020 (№ АААА-А17-117102740101-5) and Russian Foundation for Basic Research (№20-016-00020 А) (*Zm\_gex2*) and -no.20-316-80020 mol-ev-a (*Zm\_gsc1*).

### Редактирование генов, кодирующих белки взаимодействия и слияния мембран гамет кукурузы

Моисеева Е.М., Гусев Ю.С., Волохина И.В., Фадеев В.В., Мазиллов В.И., Чумаков М.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

**Аннотация.** Проведена агробактериальная трансформация кукурузы с использованием CRISPR/Cas9-вектора с целью нокаутирования генов *Zm\_gex2* и *Zm\_gsc1*, кодирующих белки взаимодействия и слияния мембран.

**Ключевые слова:** CRISPR/Cas9, кукуруза, слияние мембран гамет

При нарушении двойного оплодотворения у кукурузы, в случае гиногенеза (партеногенеза) один из спермиев не сливается с яйцеклеткой, и в последующем развитии зародыша участвует только ядро яйцеклетки, образуя матроклинный гаплоид. Однако молекулярно-генетический механизм возникновения гиногенеза у кукурузы неизвестен. В 2017 г. мы впервые обнаружили и описали в геноме кукурузы гены *Zm\_gex2* и *Zm\_gsc1* предположительно контролирующее взаимодействие и слияние мембран гамет кукурузы (Волохина с соавт., Онтогенез. 2017. 2:134–139).

Целью работы является получение растений кукурузы с мутациями у генов взаимодействия и слияния мембран гамет. Использовали CRISPR/Cas9 технологию, позволяющую нокаутировать определенные гены кукурузы. Агробактериальной трансформации подвергали 1645 незрелых зародышей кукурузы, выделенных из завязей через 10-15 суток после опыления методом *in vivo*. Трансформации методом *in planta* было подвергнуто 65 растений кукурузы.

В ходе работы мы получили CRISPR/Cas9-конструкции, содержащие гид-РНК, опознающие конкретные последовательности ДНК генов-мишеней *ZM\_gsc1* и *Zm\_gex2* кукурузы. Специфические последовательности гид-РНК к нескольким участкам этих генов синтезированы и клонированы в CRISPR/Cas-вектор pKir1.1, экспрессирующий некодирующую РНК (sgRNA, гид-РНК) и нуклеазу Cas9. Полученные CRISPR/Cas9- конструкции введены в геном генетически маркированной кукурузы KM, используя технологию агробактериальной трансформации кукурузы методами *in planta* и *in vitro* (на незрелых зародышах). В 2019 г. было получено 2094 и 5191 зерен кукурузы после агробактериальной трансформации *in planta* при использовании CRISPR/Cas9-конструкции с гид-РНК к генам *ZM\_gsc1* и *Zm\_gex2*, соответственно. Анализ встройки Т-ДНК проводился методом ПЦР со специфическими праймерами.

Работа выполнена по Программе фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2020 г. (№ гос. регистрации АААА-А17-117102740101-5) и при финансовой поддержке грантов РФФИ №20-016-00020а (*Zm\_gex2*) и №20-316-80020 мол-эв-а (*Zm\_gsc1*).

## The regulation of growth parameters of potato microclones by jasmonic acid

Mukhamatdinova E.A., Kovtun I.S., Efimova M.V.

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

E-mail: muhamatdinowa.ewg@yandex.ru

**Key message.** The microclones of potato (variety Lugovskoy) were grown on the modified Murashige-Skoog (MS) agar medium in the absence (control) or presence of JA at concentrations of 0.001, 0.1, and 10  $\mu\text{M}$ . We evaluated plant growth parameters such as the length of the axial organs, the number of stolons, leaves, the area of the assimilating surface, and the wet and dry mass of aboveground and underground organs. For the first time, has been demonstrated, that jasmonic acid (0.1 and 10  $\mu\text{M}$ ) was showed a pronounced growth-stimulating effect on potato plants.

**Keywords:** jasmonic acid, growth-stimulating effect, potato

It is known, that the hormonal system of plants regulates all life processes, from seed germination to crop formation. Jasmonic acid and its derivatives, called jasmonates, are important molecules in the control of many physiological processes. First of all, jasmonic acid is involved in the response of plants to biotic and abiotic stresses [1, 2]. However, an increasing number of studies demonstrate the participation of jasmonates in the modulation of plant growth and development.

The purpose of this study was to analyze the effect of jasmonic acid on growth parameters potato plants.

The research was carried out on potato plants (*Solanum tuberosum* L.) of the middle-ripening Lugovskoy variety.

The plant-regenerants were grafted and grown in test tubes for 28 days on the modified Murashige–Skoog agar medium in absence (control) or presence of JA at concentrations of 0.001; 0.1 and 10  $\mu\text{M}$ . Growth parameters were evaluated in accordance with the methods described earlier [3]. The results were processed statistically using non-parametric Kruskal-Wallis test (ANOVA by Ranks) by means of the Statistica 10 software.

JA in optimum growing conditions stimulated total dry mass accumulation of plants at the expense of intensive growth of aboveground parts of plants – increase in shoot length and total leaf area.

The maximum effect was shown for the hormone at 10  $\mu\text{M}$  concentration; the length of the stems increased by 2 times, the biomass of plants by 65%, in addition. There was an intensive growth of leaves and the laying of new tiers.

Reducing of JA concentration in 100 times contributed to an increase in the length of the stem and the total biomass of plants by only 30%.

The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project no. 20-54-00013-Bel\_a.

## Регуляция роста микроклонов картофеля жасмоновой кислотой

Мухаматдинова Е.А., Ковтун И.С., Ефимова М.В.

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия;

**Аннотация.** Микроклоны картофеля сорта Луговской выращивали на модифицированной агаризованной среде Мурасиге-Скуга в отсутствие (контроль) или в присутствии ЖК в концентрациях 0.001; 0.1 и 10 мкМ. Оценивали ростовые показатели растений такие как: длина осевых органов, количество столонов, листьев, площадь ассимилирующей поверхности, сырая и сухая масса надземных и подземных органов. Впервые показано, что жасмоновая кислота (0,1 и 10 мкМ) проявляла выраженный ростостимулирующий эффект на растениях картофеля.

**Ключевые слова:** жасмоновая кислота, ростостимулирующий эффект, картофель

Известно, что гормональная система растений регулирует все процессы жизнедеятельности, начиная от прорастания семян, заканчивая формированием урожая. Жасмоновая кислота и ее производные, называемые жасмонатами, являются важными молекулами в контроле многих физиологических процессов. Прежде всего, жасмоновая кислота участвует в ответе растений на биотические и абиотические стрессы [1, 2]. Однако все большее число исследований демонстрируют участие жасмонатов в модуляции роста и развития растений.

Целью настоящего исследования было проанализировать влияние жасмоновой кислоты на ростовые показатели картофеля.

Исследования проводили на растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L.) среднеспелого сорта Луговской. Растения-регенеранты черенковали и культивировали в пробирках в течение 28 суток на модифицированной агаризованной среде Мурасиге-Скуга в отсутствие (контроль) или в присутствии ЖК в концентрациях 0.001; 0.1 и 10 мкМ.

Оценку ростовых показателей проводили в соответствии с методиками, описанными ранее [3]. Статистическую достоверность данных оценивали с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса (Anova by Ranks) с использованием программы Statistica 10.

ЖК в оптимальных условиях выращивания стимулировала накопление суммарной массы растения за счёт интенсивного роста надземной части растений – увеличения длины побега и суммарной площади листьев. Максимальный эффект был показан для гормона в концентрации 10 мкМ; длина стеблей увеличилась в 2 раза, биомасса растений – на 65%, кроме того, наблюдался интенсивный рост листьев и закладка новых ярусов. Снижение концентрации ЖК в 100 раз способствовало увеличению длины стебля и общей биомассы растений только на 30%.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ проекта 20-54-00013-Бел\_a).

1. Efimova M.V., Mukhamatdinova E.A., Kovtun I.S., Kabil F.F., Medvedeva Yu.V., Kuznetsov V.V. Jasmonic acid enhances the potato plant resistance to the salt stress *in vitro* // Doklady Biological Sciences. 2019. Vol. 488. P. 149-152.
2. Siddiqi K. S., Husen A. Plant response to jasmonates: current developments and their role in changing environment // Bulletin of the National Research Centre. 2019. Vol. 43. P. 153.
3. Efimova, M.V., Kolomeichuk L.V., Boyko E.V., Malofii M.K., Vidershpan A.N., Plyusnin I.N., Golovatskaya I.F., Murgan O.K., Kuznetsov V.I.V. Physiological mechanisms of *Solanum tuberosum* L. plants' tolerance to chloride salinity // Russian Journal of Plant Physiology. 2018. Vol. 65. P. 394-403.

### Phylogenetic analysis of vertically and horizontally acquired genes responsible for salt tolerance in nitrogen-fixing alphaproteobacteria

Muntyan V.S., Muntyan A.N., Simarov B.V., Roumiantseva M.L.

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology (ARRIAM), St. Petersburg, Russia

E-mail: vucovar@yandex.ru

**Key message.** The analysis of salt tolerance genes in the genomes of N-fixing  $\alpha$ -proteobacteria showed that different groups of genes could be multicopied, located on several replicons, and horizontally and / or vertically transferred and acquired.

**Keywords:** salt tolerance, N-fixing  $\alpha$ -proteobacteria, phylogenetic analysis, gene groups

Plant-microbial N-fixing systems under modern conditions of global climate change are suffered from a such abiotic stress factor as soil salinization. At the same time, knowledge about the effect of salt stress on soil bacteria is weakly known. The mechanisms of the salt tolerance of microorganisms are quite fully studied on the model object *E. coli*. It has been shown that genes involved in shock and prolonged salt expose are encoding proteins. The aim of the study was structural and phylogenetic analysis of groups of genes responsible for salt tolerance in nitrogen-fixing representatives of  $\alpha$ -proteobacteria, which genomes were sequenced.

Groups of genes involved related to salt shock and prolonged salt stress were studied in the 14 strains representatives of nitrogen-fixing  $\alpha$ -proteobacteria: *Sinorhizobium* spp., *Rhizobium* spp., *Mesorhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp. And *Azorhizobium caulinodans*. Groups of studied genes which are responsible for: synthesis of aquaporins (*aqp*), potassium accumulation (*kup*, *kdp* and *trk*) and its excretion (*kef*), responding to shock stress and for the accumulation of osmoprotectors (*tre*, *ots*, *opu* / *cho*, *pro*, *bet*), which are important for prolonged salt stress.

It was been established that genes *aqp*, *kup*, *trk*, *tre*, *bet* are present in several copies in studied genomes; genes *aqp*, *kup*, *trk*, *kef*, *ots*, *opu*, *pro*, *bet* (except for *kdp* and *tre*) are located on different replicons and they are not organized into operons and showed different levels of amino acid sequence homology (compared to *E. coli* from 34 to 80%). It was established that *betB* / *betB2* can have orthologous copies, which were probably obtained as a result of horizontal (*betC*) and vertical transfer (*betABI*).

N-fixing alphaproteobacteria are mutualistic symbionts and endophytes of legumes and cereals, the combination of saprophytic and symbiotic lifestyles led to the accumulation of a large number of genes, probably of different origin, which products have structural differences, while confirmation of their functional differences requires additional studies.

The full-genome sequencing of native strains of *Sinorhizobium meliloti* was done by financial support of RSF 17-16-01095, a comparative genomic analysis of the genes was carried out by financial support of RFBR 18-04-01278.

### Филогенетический анализ вертикально и горизонтально наследуемых генов, ответственных за солеустойчивость азотфиксирующих альфа-протеобактерий

Мунтян В.С., Мунтян А.Н., Симаров Б.В., Румянцева М.Л.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии (ARRIAM), Санкт-Петербург, Россия.

**Аннотация.** Анализ генов солеустойчивости в геномах N-фиксирующих  $\alpha$ -протеобактерий, показал, что разные группы генов могли быть многокопийными, расположенными на нескольких репликалах, горизонтально и/или вертикально перенесенными.

**Ключевые слова:** солеустойчивость, N-фиксирующие  $\alpha$ -протеобактерии, филогенетический анализ, группы генов

Растительно-микробные N-фиксирующие системы в современных условиях глобального изменения климата все чаще оказываются под влиянием абиотического фактора - засоление почв. Вместе с тем, знания о влиянии солевого стресса непосредственно на почвенные бактерии фрагментарны. Механизмы солеустойчивости микроорганизмов достаточно полно изучены на модельном объекте *E. coli*. Показано, эти системы представляют собой систему генов, кодирующих белки, участвующие в этапах (шок и длительный солевой стресс) ответа на солевой стресс. Цель исследования заключалась в структурном и филогенетическом анализе групп генов, вовлеченных в формирование солеустойчивости, у азотфиксирующих представителей  $\alpha$ -протеобактерий, геномы которых секвенированы.

Изучены группы генов, вовлеченные в стадии солевого стресса (шок и длительный солевой стресс), у 14 штаммов – представителей N-фиксирующих  $\alpha$ -протеобактерий: *Sinorhizobium* spp., *Rhizobium* spp., *Mesorhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp. И *Azorhizobium caulinodans*. Группы исследованных генов: кодируют аквапорины (*aqp*), системы накопления (*kup*, *kdp* и *trk*) и выделения калия (*kef*), ответственные за ответ на шоковый стресс и за накопление осмопротекторов (*tre*, *ots*, *opu*, *pro*, *bet*), функционирующие во время длительного солевого стресса.

Установлено, что гены *aqp*, *kup*, *trk*, *tre*, *bet* представлены в нескольких копиях в геноме; гены *aqp*, *kup*, *trk*, *kef*, *ots*, *opu*, *pro*, *bet* (кроме *kdp* и *tre*) расположены на разных репликалах, не организованы в опероны, имеют разные уровни гомологии аминокислотных последовательностей (по сравнению с *E.coli* от 34 до 80%). Показано, что *betB*/*betB2* могут иметь ортологичные копии, которые, вероятно, были получены в результате горизонтального (*betC*) и вертикального переноса (*betABI*).

N-фиксирующие  $\alpha$ -протеобактерии являются мутуалистическими симбионтами и эндофитами бобовых и злаковых трав, сочетание сапрофитного и симбиотического образа жизни привело к накоплению большого количества генов, вероятно, различного происхождения, продукты которых имеют структурные различия, в то время как подтверждение их функциональных различий требует дополнительных исследований.

Полногеномное секвенирование штаммов *Sinorhizobium meliloti* финансово поддержано РФ 17-16-01095, сравнительный геномный анализ генов – РФФИ 18-04-01278.





## Inactivation of genes *lysR* and *mtfA* increases antagonistic activity of bacteria *Pseudomonas brassicacearum* S-1

Muratova A.A., Valentovich L.N.

Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

E-mail: [anya.muratova.93@mail.ru](mailto:anya.muratova.93@mail.ru)

**Key message.** Genes *lysR* and *mtfA* localized in chromosome of bacteria *P. brassicacearum* S-1 were inactivated. The role of these genes in the expression of strain antagonistic activity against several bacterial and fungal pathogens was investigated. The technique of markerless mutagenesis of bacteria *P. brassicacearum* was optimized.

**Keywords:** mutagenesis, antimicrobial activity, *Pseudomonas brassicacearum*, sequencing

Modern methods of genetic engineering and advances in functional genomics enable to formulate biopreparations of novel generation to stimulate growth and development of agricultural crops rather than simply screen promising variants among natural isolates. Molecular-genetic and functional analysis of the genome allows to raise activity of biotechnologically valuable bacteria in the directed manner [1]. Aim of this study was molecular-genetic analysis of genes *lysR* and *mtfA* encoding synthesis of transcription factor LysR and metalloproteinase M90, respectively, and their role in expression of antagonistic activity of bacteria *P. brassicacearum* S-1.

Natural bacterial strain *P. brassicacearum* S-1 – antagonist of crop phytopathogens served as object of study. Transposon [2] and site-directed mutagenesis [3] methods were used to derive mutant strains of bacteria *P. brassicacearum*. Evaluation of antimicrobial activity was carried out using delayed antagonism technique.

Earlier we deciphered full nucleotide sequence of *P. brassicacearum* S-1 bacterial genome. Major metabolites and enzymes involved in expression of strain antagonistic activity were putatively revealed. Transposon mutagenesis was engaged to detect genes not belonging to the principal clusters but affecting strain activity. The analysis of 100 mutants enabled to sort out bacterial variants with improved parameters of antagonistic activity toward phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae*, *Pectobacterium carotovorum* and fungi *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lupini*. Transposon miniTn5 insertion sites were determined in the selected variants as well as genes *lysR* and *mtfA* responsible for synthesis of the transcription factor LysR and metalloproteinase M90 were localized. The modified strains carried in chromosomes the mobile genetic element - transposon miniTn5, not securing stability of acquired characteristics since earlier we demonstrated translocation of miniTn5 across chromosome of strain *P. brassicacearum* S-1. Further on, markerless mutagenesis was engaged in relation to genes *lysR* and *mtfA*. As a result variants with sole mutations of genes *lysR* or *mtfA* and variant with dual mutation of both genes were derived. These variants preserved improved antagonistic properties in regard to the tested phytopathogens.

The study enabled to optimize the method of markerless mutagenesis of *P. brassicacearum* S-1 and to select bacterial variants with upgraded characteristics. The role of genes *lysR* and *mtfA* in expression of antagonistic activity in bacteria *P. brassicacearum* S-1 was originally ascertained.

1. Haas, D. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads / D. Haas, G. Défago // Nat. Rev. Microbiol. - 2005. - Vol. 3, No. 4. - P. 307-319.
2. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. / V. de Lorenzo [et al.] // J. Bacteriol. - 1990. - Vol. 172, No. 11. - P. 6568-6572.
3. *Pseudomonas putida* KT2440 markerless gene deletion using a combination of  $\lambda$  Red recombineering and Cre / loxP site-specific recombination / X. Luo [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. - 2016. - Vol. 363, No. 4.

**Effect of heavy metals and hydrocarbons on rhizosphere microbial communities of *Miscanthus × giganteus***Muratova A.Yu.<sup>1</sup>, Nurzanova A.A.<sup>2</sup>, Turkovskaya O.V.<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Saratov, Russia; <sup>2</sup>Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan  
E-mail: muratova\_a@ibppm.ru

**Key message.** Microbiological analysis of soil from the root zone of *Miscanthus × giganteus* revealed differences in the physiological and taxonomic structure of the rhizosphere microbial community under the influence of soil contamination with zinc and oil sludge.

**Keywords:** *Miscanthus × giganteus*, rhizosphere microflora, zinc, oil sludge

*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu is a promising bioenergy plant species that can grow on marginal and neglected fallow lands, maintaining its high productivity and manifesting the ability to clean-up soils from organic and inorganic pollutants. The study of the development of the rhizospheric microbial community, which promotes plant growth in adverse conditions and remediation of contaminated soil, is an important aspect of assessing the possibility of planting miscanthus on contaminated soil.

The objective of this study was to assess the effect of organic (oil sludge) and inorganic (zinc) pollutants on the formation of the microbial community in the rhizosphere of *Miscanthus × giganteus*.

Plants were grown in experimental pots filled with leached chernozem contaminated with zinc (1500 mg/kg) or oil sludge (15 g/kg), or both at the concentrations indicated. After 6 months of cultivation, microbiological analysis of rhizosphere soil was conducted. Using traditional cultural methods, the main groups of soil microorganisms (bacteria, actinomycetes, fungi) were counted. Using the metagenomic analysis of rhizosphere samples on the 16S rRNA gene, the taxonomic structure of rhizosphere microbial communities was studied.

It was shown that zinc contamination of the soil inhibited the actinomycetes and bacteria populations and stimulated the micromycetes population in the rhizosphere of *Miscanthus*. These effects were more pronounced under the mixed contamination conditions. Under the influence of zinc, the part of *Actinobacteria* phylum increased in the total taxonomic structure of rhizospheric microflora, and oil sludge contamination stimulated the development of *Proteobacteria* phylum. Oil sludge and zinc, both individually and in a mixture, contributed to an increase in the part of *Sphingomonadaceae* in the microbial population, which suggests that members of this family are able to participate in the decontamination of the soil from oil sludge, to be resistant to the metal as associated pollutant, and can effectively survive in the rhizosphere of *Miscanthus*. A deeper study of this taxonomic group of bacteria along with isolation of pure cultures may be promising for the creation of a biological product that promotes plant growth and remediation of mixed contaminated soil.

This work was financially supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (project #AR05131473).

**Влияние тяжелых металлов и углеводородов на ризосферное микробное сообщество *Miscanthus × giganteus***Muratova A.Yu.<sup>1</sup>, Нуржанова А.А.<sup>2</sup>, Турковская О.В.<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия; <sup>2</sup>Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан

**Аннотация.** Микробиологический анализ почвы из корневой зоны *Miscanthus × giganteus* выявил различия в формировании физиологической и таксономической структуры ризосферного микробного сообщества под влиянием загрязнения почвы цинком и нефтешламом.

**Ключевые слова.** *Miscanthus × giganteus*, ризосферная микрофлора, цинк, нефтешлам

Мискантус гигантский (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu) – перспективный биоэнергетический вид, способный произрастать на маргинальных и заброшенных залежных землях, сохраняя свою высокую продуктивность и проявляя способность к очистке почв от органических и неорганических загрязнителей. Изучение формирования ризосферного микробного сообщества, обеспечивающего рост растения в неблагоприятных условиях и ремедиацию загрязненного грунта, является важным аспектом оценки возможности выращивания мискантуса на загрязненной почве.

Целью настоящего исследования являлась характеристика влияния органического (нефтешлам) и неорганического (цинк) загрязнителей на формирование ризосферного микробного сообщества *Miscanthus × giganteus*.

Растения выращивали в вегетационных сосудах с выщелоченным черноземом, загрязненным цинком (1500 мг/кг) или нефтешламом (15 г/кг), или и тем и другим в указанных концентрациях. Через 6 мес. культивирования проводили микробиологический анализ ризосферной почвы. С использованием традиционных культуральных методов учитывали основные группы почвенных микроорганизмов (бактерий, актиномицетов, грибов). При помощи метабеномного анализа образцов по гену 16S рРНК проводили исследование таксономической структуры ризосферных микробных сообществ.

Установлено, что загрязнение почвы цинком вызывало ингибирование популяции актиномицетов и бактерий и стимулирование популяции актиномицетов в ризосфере мискантуса. Эти эффекты были более выраженными при смешанном загрязнении. Под влиянием цинка в ризосферной микрофлоре увеличивалась доля *Actinobacteria*, а загрязнение нефтешламом стимулировало развитие *Proteobacteria*. Нефтешлам и цинк, как по отдельности, так и в смеси, способствовали увеличению в микробной популяции доли *Sphingomonadaceae*, на основании чего предполагается, что представители этого семейства способны участвовать в очистке почвы от нефтешлама, проявляя устойчивость к сопутствующему загрязнителю – металлу и эффективно приживаясь в ризосфере мискантуса. Более глубокое изучение этой группы микроорганизмов и выделение чистых культур может быть перспективно для создания биопрепарата, способствующего росту растения и ремедиации загрязненного грунта.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан (проект AP05131473).

**Accumulation of toxigenic species of micromycetes as a factor of high phytotoxicity of urban soils**Nazarenko N.N.<sup>1</sup>, Koretskaya I.I.<sup>2</sup>, Svistova I.D.<sup>2</sup><sup>1</sup>Voronezh state agrarian University, Voronezh, Russia; <sup>2</sup>Voronezh state pedagogical University, Voronezh, Russia

E-mail: i.svistova@mail.ru

**Key message.** Indicator for urban load species of soil micromycetes synthesize mycotoxins of a wide range of toxic effects and cause a significant increase in phytotoxic activity of the soil in the transport zone of the city.

**Keywords:** urban soils, phytotoxic activity, toxigenic micromycetes

Phytotoxic activity of the soil is used as a parameter of biomonitoring of anthropogenic impact, the main factor of its growth is considered to be the accumulation of pollutants. The aim of the work was to study the role of soil micromycetes in the formation of phytotoxic activity of the soil of urban areas of the city of Voronezh.

Soil samples were taken by category of urban land. The number, species composition, and structure of the soil micromycetes complex were determined by spatial and temporal occurrence indicators. The phytotoxic activity of the soil was evaluated by the method of biotests on soil plates (test - radish plant).

The number of micromycetes in transport zones of the city was reduced by 3-4 times compared to recreation, and the phytotoxic activity of the soil increased by 5-6 times.

The species structure of the micromycete complex in urbollandscape soils is disturbed. The proportion of typical species of fungi increased in transport zone by comparison the recreation zone, which indicates a "concentration of dominance" and a decrease in diversity. In transport zones, the coefficient of similarity with the control amount only 0.2. Stenotopic species disappear: epiphytes, phytopathogens and saprotrophs that decompose plant residues: *Cepalosporium acremonium*, *Acremonium alternatum*, *Paecilomyces lilacinum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Trichoderma koningii*, *Aspergillus ustus*, *Penicillium daleae*, *Mucor stolonifer*.

The second group of species, rare or random in control, sharply increased the rank of dominance in the soils of urban landscapes: *Aspergillus clavatus*, *A. alliaceus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *Penicillium funiculosum*, *P. notatum*, *P. rubrum*, *P. purpurogenum*, *P. velutinum*, *P. viridicatum*, *Stachybotrys chartarum*, *Alternaria alternata*, *botryotrichum pipuliferum*, they are indicative of urban load.

Common properties of indicator species are their ability to synthesize mycotoxins. The part of toxigenic species of micromycetes amount (%): in control 11-14, in recreation 15-18, in residential zones 49-62, in transport zones 98-100. Strains isolated from the soil of Voronezh synthesize mycotoxins with a wide range of biological effects: antibiotic, fungicidal and phytotoxic, which determines their gain in the intensifying competition or the introduction of species in the depleted complex of urban soils.

Thus, the high phytotoxic activity of urbollandscape soils is determined not only by the accumulation of pollutants, but also by the biotic factor, namely, the accumulation of toxigenic species of micromycetes.

**Накопление токсигенных видов микромицетов как фактор высокой фитотоксичности городских почв**Назаренко Н.Н.<sup>1</sup>, Корецкая И.И.<sup>2</sup>, Свистова И.Д.<sup>2</sup><sup>1</sup>Воронежский государственный аграрный университет, Воронеж, Россия; <sup>2</sup>Воронежский государственный педагогический университет, Воронеж, Россия

**Аннотация.** Индикаторные на городскую нагрузку виды почвенных микромицетов синтезируют микотоксины широкого спектра токсического действия и обуславливают значительный рост фитотоксической активности почвы в транспортной зоне города.

**Ключевые слова:** городские почвы, фитотоксическая активность, токсигенные микромицеты

Фитотоксическая активность почвы используется как параметр биомониторинга антропогенного воздействия, основным фактором ее роста считается накопление поллютантов. Целью работы было изучение роли почвенных микромицетов в формировании фитотоксической активности почвы городских зон города Воронежа.

Пробы почвы отбирали по категориям городских земель. Определяли численность, видовой состав и структуру комплекса почвенных микромицетов по показателям пространственной и временной встречаемости. Фитотоксическую активность почвы оценивали методом биотестов на почвенных пластинах (тест-растение редис).

Численность микромицетов в транспортных зонах города снижена в 3-4 раза по сравнению с рекреациями, а фитотоксическая активность почвы возростала в 5-6 раз.

Видовая структура комплекса микромицетов в почвах урболандшафтов нарушена. Доля типичных видов грибов возростала в ряду рекреации < селитебная зона < транспортная зона, что свидетельствует о «концентрации доминирования» и снижении разнообразия. В транспортных зонах К сходства с контролем составлял 0,2. Исчезают стенотопные виды: эпифиты, фитопатогены и сапротрофы, разлагающие растительные остатки: *Cepalosporium acremonium*, *Acremonium alternatum*, *Paecilomyces lilacinum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Trichoderma koningii*, *Aspergillus ustus*, *Penicillium daleae*, *Mucor stolonifer*.

Вторая группа видов, редкие или случайные в контроле, резко повышала ранг доминирования в почвах урболандшафтов: *Aspergillus clavatus*, *A. alliaceus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *Penicillium funiculosum*, *P. notatum*, *P. rubrum*, *P. purpurogenum*, *P. velutinum*, *P. viridicatum*, *Stachybotrys chartarum*, *Alternaria alternata*, *Botryotrichum pipuliferum*, они являются индикаторными на городскую нагрузку.

Общими свойствами индикаторных видов является их способность к синтезу микотоксинов. Доля токсигенных видов микромицетов составляла (в %): в контроле 11-14, в рекреациях 15-18, в селитебных зонах 49-62, в транспортных зонах 98-100. Изоляты, выделенные из почвы г. Воронежа, синтезируют микотоксины с широким спектром биологического действия: антибиотического, фунгицидного и фитотоксического, что определяет их выигрыш в обостряющейся конкурентной борьбе или внедрение заносных видов в обедненный комплекс городских почв.

Таким образом, высокая фитотоксическая активность почв урболандшафтов определяется не только накоплением поллютантов, важный вклад вносит биотический фактор, а именно накопление токсигенных видов микромицетов.

**Studying the properties of rhizosphere strain *Streptomyces* sp. 8A13 for phytopathogens biocontrol**

Nazarova Ya.I., Bakulina A.V., Shirokikh I. G., Blinova A.L.

Federal Agricultural Research Center of the North-East, Kirov, Russia

E-mail: drugaeann1@rambler.ru

**Key message.** The species identification of the rhizosphere strain *Streptomyces* sp. 8A13 was done, studied its antagonistic properties, the ability to produce phytohormones, and optimized the cultivation conditions.

**Keywords:** *Streptomyces*, identification, cultivation, antagonistic properties, biocontrol

Bacteria of the genus *Streptomyces* are of considerable interest as biocontrol agents of phytopathogens, because they are able to produce a variety of antibiotic substances and at the same time effectively colonize plants (Colombo et al., 2019). *Streptomyces* sp. strain 8A13 was isolated from the rhizosphere of *Nicotiana tabacum* L. (cultivar Samsun), which is characterized by antagonistic properties to a number of bacteria (*Arthrobacter simplex*, *Pseudomonas putida*, *Erwinia rhapontici*) and phytopathogenic fungi (*Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria* sp., *Spacelia segetum*, *Fusarium* sp. K-15, *F. oxysporum*, *F. avenaceum* 7/2, *F. culmorum* T8, *F. proliferatum* AC). The studied strain was assigned to the species *S. castelarensis* as a result of comparison of cultural and morphological properties and data of molecular genetic analysis of the 16S rRNA gene sequence (GenBank access number MT114717). Previously, strong antifungal properties were established by us for another strain of this species (*S. castelarensis* A4), not only in the laboratory, but also in field experiments (Shirokikh et al., 2020). In addition to antagonistic properties in *S. castelarensis* 8A13 showed cellulolytic activity and the ability to synthesize indolyl-acetic acid (up to 9.7 mcg / ml). Thus, the strain of *S. castelarensis* 8A13 undoubtedly requires further study and is evaluated as promising from the point of view of developing a biological preparation based on it. For this purpose, the optimal conditions for the growth and antifungal activity of this strain (rocking culture, temperature 37C, pH 8.0) and the culture medium (Chapek with starch) were determined.

**Изучение свойств ризосферного штамма *Streptomyces* sp. 8A13 для биоконтроля фитопатогенов**

Назарова Я.И., Бакулина А.В., Широких И.Г. Блинова А.Л.

Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого, Киров, Россия

**Аннотация.** Проведена видовая идентификация ризосферного штамма *Streptomyces* sp. 8A13, изучены его антагонистические свойства, способность к продукции фитогормонов, а также оптимизированы условия культивирования.

**Ключевые слова:** *Streptomyces*, идентификация, культивирование, антагонистические свойства, биоконтроль

Бактерии рода *Streptomyces* представляют значительный интерес как биоконтрольные агенты фитопатогенов, т.к. способны продуцировать разнообразные антибиотические вещества и при этом эффективно колонизировать растения (Colombo et al., 2019). Из ризосферы *Nicotiana tabacum* L. сорта Самсун выделен штамм *Streptomyces* sp. 8A13, который характеризуется выраженными антагонистическими свойствами к ряду бактерий (*Arthrobacter simplex*, *Pseudomonas putida*, *Erwinia rhapontici*) и фитопатогенных грибов (*Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria* sp., *Spacelia segetum*, *Fusarium* sp. K-15, *F. oxysporum*, *F. avenaceum* 7/2, *F. culmorum* T8, *F. proliferatum* AC). Исследуемый штамм в результате сопоставления культурально-морфологических свойств и данных молекулярно-генетического анализа последовательности гена 16S рНК (GenBank Accession number MT114717), был отнесен к виду *S. castelarensis*. Ранее сильные антифунгальные свойства были установлены нами для другого штамма этого вида (*S. castelarensis* A4), причем не только в лабораторных, но и в полевых экспериментах (Широких и др., 2020). Помимо антагонистических свойств у *S. castelarensis* 8A13 выявлены целлюлозолитическая активность и способность к синтезу индолилуксусной кислоты (до 9,7 мкг/мл). Таким образом, штамм *S. castelarensis* 8A13, несомненно, требует дальнейшего изучения и оценивается как перспективный с точки зрения разработки на его основе биопрепарата. С этой целью определены оптимальные условия для роста и проявления антифунгальной активности данного штамма (качалочная культура, температура 37C, рН 8,0) и среда культивирования (Чапека с крахмалом).

**The effect of sodium selenite on the secondary metabolism of cell culture *Lychnis chalcedonica* in vitro**

Nechaeva M.V., Golovatskaya I.F.  
Tomsk State University, Tomsk, Russia  
E-mail: ven\_dy@sibmail.com

**Key message.** We studied the effect of sodium selenite (Se) on the secondary metabolism of *Lychnis chalcedonica* L. cell culture in vitro. It was found that low concentrations of Se reduce the flavonoid content, but do not change the content of saponins.

**Keywords:** *Lychnis chalcedonica*, cell culture, sodium selenite, saponins, flavonoids

The study of the secondary metabolites of medicinal plants is important for obtaining biologically active substances from plants and plant cell cultures for their practical use in various fields of human activity. Medicinal plants are most commonly used in pharmaceutical preparations enriched with trace elements, including selenium. From this it follows that there is a need to evaluate the effect of selenium on the properties of plants and cell culture. Despite the fact that the main Se metabolism is believed to have been lost in higher plants, it is likely that Se benefits the plant by nonspecific entering the functional metabolites. The effect of selenium on the secondary metabolism of cell culture *Lychnis chalcedonica* L. has not been sufficiently studied. In this regard, the aim of this study was to investigate the effect of sodium selenite on the secondary metabolism of cell culture *Lychnis chalcedonica* L. in vitro. The object of the study was the callus cell culture *L. chalcedonica*, obtained by the authors. Subculturing was performed in the dark on solid culture medium Murashige-Skoog (MS) containing sucrose, vitamins and hormones naphthylacetic acid and 6-benzylaminopurine in a ratio of 4/1 (control) and MS + 0.01  $\mu\text{M}$  Se or MS + 1.00  $\mu\text{M}$  Se (experience). As a result, it was shown that the presence in the nutrient medium of 0.01 or 1.00  $\mu\text{M}$  Se increased the dry mass of the culture, which indicated its positive effect on growth. The action of Se did not significantly change the content of saponins. At the same time observed a dose-dependent effect of Se on the level of the amount of flavonoids. The presence in the nutrient medium of 0.01 and 1.00  $\mu\text{M}$  Se reduced the total flavonoid content in the culture by 19 and 50%, respectively. It is known that flavonoids play an antioxidant role in the plant and their level increases with leaf age. The introduction into the nutrient medium low concentrations of Se, which plays a similar role, reduces the oxidative status of culture cells and activates their growth. Under conditions of reducing oxidative stress, the culture does not need to increase the level of secondary metabolites that negatively control cell growth processes.

**Влияние селенита натрия на вторичный метаболизм клеточной культуры *Lychnis chalcedonica* in vitro**

Нечаева М.В., Головацкая И.Ф.  
Томский государственный университет, Томск, Россия

**Аннотация.** Изучали влияние селенита натрия (Se) на вторичный метаболизм клеточной культуры *Lychnis chalcedonica* L. in vitro. Установили, что низкие концентрации Se снижают содержание флавоноидов, но не меняют содержания сапонинов.

**Ключевые слова:** *Lychnis chalcedonica*, клеточная культура, селенит натрия, сапонины, флавоноиды

Изучение вторичных метаболитов лекарственных растений имеет важное значение для получения биологически активных веществ из растений и клеточных культур для их практического использования в разнообразных областях человеческой деятельности. Лекарственные растения чаще всего используют в виде лекарственных препаратов, обогащенных микроэлементами, в том числе и селеном. Из этого следует, что возникает необходимость оценки влияния селена на свойства растений и клеточной культуры. Несмотря на то, что основной метаболизм Se, как полагают, был утрачен в высших растениях, вероятно, что Se приносит пользу растению, неспецифично входя в функциональные метаболиты. Недостаточно изучено влияние селена на вторичный метаболизм клеточной культуры *Lychnis chalcedonica* L. В связи с этим целью данного исследования было изучить влияние селенита натрия на вторичный метаболизм клеточной культуры *Lychnis chalcedonica* L. in vitro. Объектом исследования служила каллусная клеточная культура *L. chalcedonica*, полученная авторами. Субкультивирование проводили в темноте на твердой среде Мурасиге-Скуга (МС), содержащей сахарозу, витамины и гормоны нафтилуксусную кислоту и 6-бензиламинопуридин в соотношении 4/1, (контроль) и МС + 0,01 мкМ Se или МС + 1,00 мкМ Se (опыт). В результате показано, что присутствие в питательной среде 0,01 или 1,00 мкМ Se увеличило сухую массу культуры, что свидетельствовало о его положительном влиянии на рост. Действие Se существенно не изменило содержание сапонинов. В тоже время отмечено дозо-зависимое действие Se на уровень суммы флавоноидов. Присутствие в питательной среде 0,01 и 1,00 мкМ Se снижало содержание суммы флавоноидов в культуре на 19 и 50% соответственно. Известно, что флавоноиды играют антиоксидантную роль в растении и их уровень увеличивается с возрастом листьев. Введение в питательную среду низких концентраций Se, выполняющую аналогичную роль, снижает окислительный статус клеток культуры и активизирует их рост. В условиях снижения окислительного стресса у культуры отсутствует необходимость в увеличении уровня вторичных метаболитов, отрицательно контролирующих ростовые процессы клеток.

**Mycoflora of ergot (*Claviceps purpurea*) sclerotia as a source of potential biocontrol agents of phytopathogens**

Neshumaeva N.A., Timina M.A.

Krasnoyarsk Agricultural Research Institute, Federal Research Center “Krasnoyarsk Scientific Center of the SB of the RAS”,  
Krasnoyarsk, Russia

E-mail: nnesumaeva@list.ru

**Key message.** Mycoflora of sclerotia *Claviceps purpurea* was studied for identify potential agents of biocontrol of ergot cereals. The genera of micromycetes *Penicillium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Bipolaris*, *Gliocladium*, *Epicoccum*, *Trichoderma* were isolated.

**Keywords:** ergot, *Claviceps purpurea*, biocontrol

Ergot is a disease of cereals and wild cereals caused by the micromycete *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. Its sclerotia, contained in grain and hay, can cause poisoning, thereby causing great harm to animals and humans. There are no varieties of cereals that are resistant to ergot, as well as effective fungicides to combat it as of today. The solution to this problem may be the development and use of biopreparations based on hyperparasites of *C. purpurea*. Mycoflora of sclerotia ergot rye was studied. For this, ergot horns after surface sterilization and flaming were placed to Petri dishes on the surface of potato-sucrose agar with the addition of Triton X-100 and incubated at a temperature of 22 ° C for 7-14 days until colonies appeared. The following were tested as sterilizing agents: 95% ethyl alcohol; 70% ethyl alcohol, 5% sodium hypochloride (NaOCl) and 70% ethyl alcohol, 5% NaOCl. Micromycetes were isolated in pure cultures and identified by morphological and cultural characteristics. In total, 728 sclerotia collected from plants of rye varieties of the Krasnoyarsk selection Yeniseika, Krasnoyarskaya universalnaya, and Mininskaya were examined. As a result of selection, sterilization of 5% NaOCl was recognized as the best option. In the mycobiota of sclerotia, representatives of mold storage prevailed. The composition of mycobiota fungi (in % of sclerotia contaminated by this genus) was as follows: *Penicillium* – 44.4%, *Alternaria* – 30.0%, *Mucor* – 12.5%, *Aspergillus* – 5.5%, *Fusarium* – 4.4%, and also *Rhizopus*, *Bipolaris*, *Gliocladium*, *Epicoccum*, *Trichoderma* – less than 1.0%. In many cases, cohabitation of two or three micromycetes on one sclerotia was noted. The antagonistic properties of isolated promising isolates of the genera *Trichoderma*, *Gliocladium* were studied.

**Микофлора склероциев спорыньи (*Claviceps purpurea*), как источник потенциальных агентов биоконтроля фитопатогенов**

Нешумаева Н.А., Тимина М.А.

Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Федеральный исследовательский центр  
«Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Россия

**Аннотация.** Исследована микофлора склероциев *Claviceps purpurea* для выявления потенциальных агентов биоконтроля спорыньи зерновых культур. Изолированные микромицеты принадлежали к родам *Penicillium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Bipolaris*, *Gliocladium*, *Epicoccum*, *Trichoderma*.

**Ключевые слова:** Спорынья, *Claviceps purpurea*, биоконтроль

Спорынья – заболевание зерновых культур и дикорастущих злаков, вызываемое микромицетом *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. Его склероции, содержащиеся в зерне и сене, могут вызывать отравления, тем самым нанося большой вред животным и человеку. На сегодняшний день отсутствуют сорта зерновых культур резистентные к спорынье, так же как и эффективные фунгициды для борьбы с ней. Решением данной проблемы может стать разработка и использование биопрепаратов, созданных на основе гиперпаразитов *C. purpurea*. В работе исследовали микофлору склероциев спорыньи ржи. Для этого рожки спорыньи после поверхностной стерилизации и фламбирования раскладывали в чашки Петри на поверхность картофельно-сахарозного агара с добавлением Triton X-100 и инкубировали при температуре 22°C в течение 7-14 суток до появления колоний. В качестве стерилизующих агентов были опробованы следующие: 95% этиловый спирт; 70% этиловый спирт, 5% гипохлорид натрия (NaOCl) и 70% этиловый спирт, 5% NaOCl. Микромицеты выделяли в чистые культуры и идентифицировали по морфолого-культуральным признакам. Всего было исследовано 728 склероциев, собранных с растений сортов ржи красноярской селекции Енисейка, Красноярская универсальная, Мининская. В результате подбора лучшим вариантом признана стерилизация 5% NaOCl. В микобиоте склероциев преобладали представители плесеней хранения. Состав грибной микобиоты (в % склероциев, контаминированных данным родом) оказался следующим: *Penicillium* 44,4%, *Alternaria* – 30,0%, *Mucor* – 12,5%, *Aspergillus* – 5,5%, *Fusarium* – 4,4%, а также *Rhizopus*, *Bipolaris*, *Gliocladium*, *Epicoccum*, *Trichoderma* – менее 1,0%. Во многих случаях отмечали совместное обитание на одном склероции двух или трех микромицетов. Были изучены антогонистические свойства выделенных перспективных изолятов родов *Trichoderma*, *Gliocladium*.

**Bacterial transcription factor binding site inference as the basis for the study of plant-microbial interactions**

Nikolaichik Y.A.

Belarusian State University, Minsk, Belarus

Email: nikolaichik@bsu.by

**Key message.** Genome-wide *in silico* analysis of bacterial regulatory sequences reveals new regulatory interactions, is generally accessible and should become the standard in the study of plant-microbial interactions.

**Keywords:** transcriptional regulation, operator motif, genome annotation, plant-microbial interactions

'Omic' technologies that are becoming ubiquitous generate large amounts of data that are still only partially used. Genomic projects usually end with the automatic assembly of the "draft" genome and the automatic annotation of reading frames, rRNA and tRNA genes. However, genomic sequences record all regulatory information, which can be easily extracted using generally available methods. The presentation will demonstrate the approach to deciphering regulatory information that is based on a genome-wide search for regulatory elements: transcription factor binding sites (operators), promoters and terminators. Our method is based on the analysis of 3D structures of complexes of transcription factors with their own operators and allows to semi-automatically find a significant part of the operator sequences in previously unexplored genomes. Of particular value is total genome analysis, which finds the operator and promoter sequences for most transcription units, shows multiplex regulation and allows one to predict complex transcriptional cascades. The quality of such analysis can be significantly improved with the availability of transcriptomic data for the studied bacterium. Transcriptomic data analysis facilitates the identification of promoters, terminators, and whole transcriptional units, and also helps to determine the most likely regulatory mode (activation or repression) for each TF.

The combination of a genome-wide search for operators (and other regulatory sequences) with an analysis of open RNA-seq data will be demonstrated by identifying new regulators of the virulent properties of plant pathogenic bacteria from the *Pectobacteriaceae* family.

The approach to the analysis of regulatory information described here is universal (suitable for any bacterium) and relatively easily accessible, since complex algorithms for identifying regulatory sequences are implemented as a user-friendly program available at [github.com/nikolaichik/SigmoID](https://github.com/nikolaichik/SigmoID).

**Идентификация сайтов связывания транскрипционных факторов бактерий как основа для исследования растительно-микробных взаимодействий**

Николайчик Е.А.

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

**Аннотация.** Полногеномный анализ бактериальных регуляторных последовательностей *in silico* обнаруживает новые регуляторные взаимодействия, общедоступен и должен стать стандартом при исследовании растительно-микробных взаимодействий.

**Ключевые слова:** транскрипционная регуляция, операторный мотив, аннотация генома, растительно-микробные взаимодействия

Становящиеся общедоступными "омиксные" технологии генерируют большие массивы данных, до сих пор используемых лишь частично. Геномные проекты обычно заканчиваются автоматической сборкой "черновика" генома и автоматической аннотацией рамок считывания, генов рРНК и тРНК. Однако в геномных последовательностях записана вся регуляторная информация, которую вполне можно извлечь общедоступными методами. В докладе будет продемонстрирован подход к расшифровке регуляторной информации, опирающийся на полногеномный поиск регуляторных элементов: сайтов связывания транскрипционных факторов (операторов), промоторов и терминаторов. Наш метод основан на анализе 3D-структур комплексов транскрипционных факторов со своими операторами, который способен в полуавтоматическом режиме находить значительную часть операторных последовательностей в неисследованных ранее геномах. Особую ценность имеет максимально полный анализ генома, который находит операторные и промоторные последовательности для большинства транскрипционных единиц, показывает множественную регуляцию и позволяет предсказывать сложные транскрипционные каскады. Качество анализа может быть существенно повышено при наличии транскриптомных данных для исследуемой бактерии, которые облегчают идентификацию промоторов, терминаторов и целых транскрипционных единиц, а также позволяют определять наиболее вероятный режим регуляции (активацию или репрессию).

Сочетание полногеномного поиска операторов (и прочих регуляторных последовательностей) с анализом открытых транскриптомных (RNA-seq) данных будет продемонстрировано на примерах идентификации новых регуляторов вирулентных свойств фитопатогенных бактерий из семейства *Pectobacteriaceae*.

Описанный здесь подход к анализу регуляторной информации является универсальным (подходит для любой бактерии) и относительно легкодоступным, поскольку сложные алгоритмы идентификации регуляторных последовательностей реализованы в виде программы с удобным графическим интерфейсом, доступной по адресу [github.com/nikolaichik/SigmoID](https://github.com/nikolaichik/SigmoID).

## Amyloid proteins of plants and microorganisms: biological functions and participation in the formation of supra-organismal systems

Nizhnikov A.A.

All-Russia Research Institute of Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia; St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

E-mail: a.nizhnikov@arriam.ru

**Key message.** Here we will review the latest advances in the study of functional amyloids of plants and symbiotic bacteria demonstrating the involvement of these protein fibrils in protein storage in plant seeds and formation of supra-organismal interactions.

**Keywords:** Amyloid, protein fibril, root nodule bacteria, seeds, symbiosis

Amyloids are protein fibrils that have a special spatial structure called "cross-β". These protein aggregates are associated with the development of more than 40 predominantly incurable human diseases, among which there are those of very high social importance, such as Alzheimer's disease. Amyloids may be only pathological but also functional. Such functional amyloids are found in archaea, bacteria (mainly pathogenic), and eukaryotes. For example, in humans, they are involved in the polymerization of melanin and tooth enamel, the regulation of antiviral response, hormone storage, and other cellular functions. Plants and symbiotic bacteria remained the most significant groups for humans in which amyloids were not found. Our studies revealed amyloids formed in plants *in vivo*. In particular, seed storage proteins were found to form amyloids that are resistant to treatment with proteases of the gastrointestinal tract and toxic to eukaryotic cells [1]. We also performed a screening of amyloid proteins in symbiotic root nodule bacteria resulted in the identification of two novel amyloids formed *in vivo* by proteins of the bacterial outer cell membrane involved in the development of the initial stages of plant-microbial symbiosis [2]. It is noteworthy that the amyloids of both plants and root nodule bacteria are formed by proteins with a similar structure called the "β-barrel".

The research was carried out with the support of the Russian Science Foundation grant 17-16-01100.

## Амилоидные белки растений и микроорганизмов: биологические функции и участие в формировании надорганизменных систем

Нижников А.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия; Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** В докладе будут рассмотрены последние достижения в области исследования функциональных амилоидных белков растений и симбиотических бактерий, демонстрирующие вовлеченность этих амилоидных фибрилл в запасание белка семян и надорганизменные взаимодействия.

**Ключевые слова:** Амилоид, белковая фибрилла, клубеньковые бактерии, семена, симбиоз

Амилоидами называют белковые фибриллы, обладающие особой пространственной структурой, называемой «кросс-β». Эти белковые агрегаты ассоциированы с развитием более 40 преимущественно неизлечимых заболеваний человека, среди которых есть обладающие весьма высокой социальной значимостью, такие как болезнь Альцгеймера. Амилоиды бывают не только патологическими, но и функциональными. Такие функциональные амилоиды обнаружены у архей, бактерий (преимущественно патогенных), эукариот. Например, у человека они вовлечены в полимеризацию меланина и зубной эмали, регуляцию противовирусного ответа, запасание гормонов и выполнение других клеточных функций. Наиболее значимыми для человека группами, у которых не были обнаружены амилоиды, оставались растения и симбиотические бактерии. Проведенные нами исследования позволили впервые идентифицировать амилоиды, образующиеся у растений *in vivo*. Оказалось, что амилоиды образуют запасные белки семян, причем эти амилоиды обладают устойчивостью к протеазам желудочно-кишечного тракта и токсичностью для клеток эукариот [1]. Также мы провели системный скрининг амилоидных белков у симбиотических клубеньковых бактерий, в результате которого нам удалось идентифицировать два новых амилоида, образуемых *in vivo* белками наружной клеточной мембраны, вовлеченными в формирование начальных стадий растительно-микробного симбиоза. Примечательно, что идентифицированные нами амилоиды как растений, так и клубеньковых бактерий образуются белками со сходной структурой, называемой «β-баррель».

Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда 17-16-01100.

[1] Antonets K.S., Belousov M.V., Sulatskaya A.I., Belousova M.E., Kosolapova A.O., Sulatsky M.I., Andreeva E.A., Zykin P.A., Malovichko Y.V., Shtark O.Y., Lykholay A.N., Volkov K.V., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Kochetkova E.Y., Bobylev A.G., Usachev K.S., Demidov O.N., Tikhonovich I.A., Nizhnikov A.A. Accumulation of storage proteins in plant seeds is mediated by amyloid formation // PLOS Biology, 2020, V.18(7), e3000564.

[2] Kosolapova A.O., Belousov M.V., Sulatskaya A.I., Belousova M.E., Sulatsky M.I., Antonets K.S., Volkov K.V., Lykholay A.N., Shtark O.Y., Vasilieva E.N., Zhukov V.A., Ivanova A.N., Zykin P.A., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Tikhonovich I.A., Nizhnikov A.A. Two novel amyloid proteins, RopA and RopB, from the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* // Biomolecules, 2019, V.9, e694.



### Influence of biologicals on photosynthetic pigments in wheat leaves

Novikova I.I.<sup>1</sup>, Popova E.V.<sup>1</sup>, Kolesnikov L.E.<sup>2</sup>, Kolesnikova Yu.R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Scientific Research Institute of Plant Protection, Saint-Petersburg, Russia; <sup>2</sup>St. Petersburg State Agrarian University, Saint-Petersburg, Russia; <sup>3</sup>Federal Research Center All-Russian Institute of Plant Genetic Resources N.I.

Vavilova”, St. Petersburg, Russia

E-mail: irina\_novikova@inbox.ru

**Key message.** Multifunctional biological products based on strains of microorganisms that are antagonists of pathogens and plant disease resistance activators - chitosan and its derivatives increase the content of chlorophyll *a* and *b* in flag leaves of wheat, the number and weight of grains in the ear, potential yield, and also reduce the development of yellow rust. The maximum biological effectiveness for these indicators was noted in the experimental version, where *Bacillus subtilis* VKM B-2604D and *B. subtilis* VKM B-2605D strains that are part of the Vitaplan biological product and chitosan salicylate (Chitosan II) complex was used.

**Keywords:** soft wheat, multifunctional biological products, wheat productivity, wheat diseases, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, carotenoids

To increase productivity and protect crops from diseases, multifunctional biological products that combine the useful properties of strains of microorganisms' antagonists of pathogens and activators of plant disease resistance - chitosan and its derivatives are most promising. It is known that photosynthetic structures can participate in the formation of the plant's adaptive response to stress factors, including infection with phytopathogens and the development of pathogens, which is why it is important to study the effect of such multifunctional biological products (compositions) on photosynthetic plant pigments and the intensity of the development of diseases.

The purpose of the work was to study the effect of biological products and compositions, including *Bacillus subtilis* VKM B-2604D and *B. subtilis* VKM B-2605D strains that are part of the Vitaplan biological product and chitosan salicylate (Chitosan II) on the content of photosynthetic pigments in wheat leaves, productivity and yellow rust. For this, pre-sowing treatment of wheat seeds Leningradka 6, k-64900 and 3-fold spraying of vegetating plants with preparations and multifunctional complexes: Vitaplanwetttable powder - WP, “Vitaplan, CL” - culture liquid of *B. subtilis* B-2604D strain and *B. subtilis* B-2605D strain at ratio 1:1 with titer of live cells (10<sup>10</sup> CFU ml<sup>-1</sup>), “Vitaplan, CL + Chitosan II”, “Vitaplan CCL (concentrate of cultural liquid) + Chitosan II”, in the future we compared the treated plants with the control, not subjected to treatment. The studies revealed a statistically significant increase in the content of photosynthetic pigments: chlorophyll *a* and *b* in flag leaves of wheat with the use of biological products. The highest values of potential yield and content of chlorophyll *a* and *b* in the leaves were determined in the experimental version, where the multifunctional complex “Vitaplan, CL + Chitosan II” was used. Correlation relationships were revealed, reflecting a decrease in the intensity of yellow rust development with an increase in the content of chlorophyll *a* and *b* in the leaves, and also using the values of the Spearman criterion, the dominant effect of chlorophyll *b* on the number of grains in an ear, the weight of grains of one ear, and the weight of an ear was shown.

### Влияние биопрепаратов на фотосинтетические пигменты в листьях пшеницы

Новикова И.И.<sup>1</sup>, Попова Э.В.<sup>1</sup>, Колесников Л.Е.<sup>2</sup>, Колесникова Ю.Р.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений», Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет», Санкт-Петербург, Россия; <sup>3</sup>ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова», Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Полифункциональные биопрепараты на основе штаммов микроорганизмов-антагонистов возбудителей болезней и активаторов болезнестойчивости растений – хитозана и его производных повышают содержание хлорофиллов *a* и *b* во флаговых листьях пшеницы, число и массу зерен в колосе, потенциальную урожайность, а также снижают развитие желтой ржавчины. Максимальная биологическая эффективность по этим показателям отмечена в варианте опыта, где был использован комплекс штаммов *Bacillus subtilis* VKM B-2604D и *B. subtilis* VKM B-2605D, входящих в состав биопрепарата Витаплан, и салицилата хитозана (Хитозан II).

**Ключевые слова:** мягкая пшеница, полифункциональные биопрепараты, урожайность пшеницы, болезни пшеницы, хлорофилл *a*, хлорофилл *b*, каротиноиды

Для повышения урожайности и защиты сельскохозяйственных культур от болезней наиболее перспективны полифункциональные биопрепараты, объединяющие полезные свойства штаммов микроорганизмов-антагонистов возбудителей болезней и активаторов болезнестойчивости растений – хитозана и его производных. Известно, что фотосинтетические структуры могут участвовать в формировании адаптивного ответа растения на воздействие стрессовых факторов, в том числе – на инфицирование фитопатогенами и развитие возбудителей болезней, в связи с чем изучение влияния таких полифункциональных биопрепаратов (композиций) на фотосинтетические пигменты растений и интенсивность развития болезней, безусловно, актуально.

Цель работы – изучить влияние биопрепаратов и композиций, включающих штаммы *Bacillus subtilis* VKM B-2604D и *B. subtilis* VKM B-2605D, входящих в состав биопрепарата Витаплан, и салицилата хитозана (Хитозан II) на содержание фотосинтетических пигментов в листьях растений пшеницы, ее продуктивность и пораженность желтой ржавчиной.

Для этого проводили предпосевную обработку семян пшеницы Ленинградка 6, к-64900 и 3-кратное опрыскивание вегетирующих растений препаратами и полифункциональными комплексами: «Витаплан, СП (смачивающийся порошок)», «Витаплан, КЖ (культуральная жидкость)», «Витаплан, КЖ + Хитозан II», «Витаплан, КС (концентрат суспензии) + Хитозан II», в дальнейшем сравнивали обработанные растения с контрольными, не подвергавшимися обработке. В результате проведенных исследований выявлены статистически достоверное повышение содержания фотосинтетических пигментов: хлорофилла *a* и *b* во флаговых листьях пшеницы при применении биопрепаратов. Наибольшие значения потенциальной урожайности и содержания в листьях хлорофилла *a* и *b* определены в варианте опыта, где был использован полифункциональный комплекс «Витаплан, КЖ + Хитозан II». Выявлены корреляционные связи, отражающие снижение интенсивности развития желтой ржавчины с увеличением содержания в листьях хлорофилла *a* и *b*, а также с помощью значений критерия Спирмена показано доминирующее влияние хлорофилла *b* на число зерен в колосе, массу зерен одного колоса, а также массу колоса.

### Role of pathogen effectors SnTox in development of compatibility reaction in the pathosystem wheat – *Stagonospora nodorum*

Nuzhnaya T.V.<sup>1</sup>, Veselova S.V.<sup>1</sup>, Burkhanova G.F.<sup>1</sup>, Rummyantsev S.D.<sup>1</sup>

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: tanyawww89@mail.ru

**Key message.** It was shown that the interactions of SnToxA-Tsn1, SnTox1-Snn1 in the pathosystem wheat-*Stagonospora nodorum* play an important role in the development of Septoria nodorum blotch and are aimed at manipulating of host redox-status.

**Keywords:** *Stagonospora nodorum*; *Triticum aestivum*; pathogen effectors, SnToxA-Tsn1, SnTox1-Snn1 interactions

The fungus *Stagonospora nodorum* Berk. is the causative agent of Septoria nodorum blotch (SNB) of wheat. The most important factors of *Stagonospora nodorum* virulence include numerous fungal necrotrophic effectors (NEs) encoded by SnTox genes. They interact with the matching products of host susceptibility genes (*Snn*). SnTox-*Snn* interactions are mirror images of classical gene-for-gene interactions and lead to the development of disease and are aimed at manipulating of host redox-status. The aim of this work was study the effect of SnToxA-Tsn1, SnTox1-Snn1 interactions on the development of infection and redox status in a host plant. Several strains of *S. nodorum* (SnB, Sn4VD, Sn9MN) and more than 50 varieties of soft spring and winter wheat were used in the work. Various wheat cultivars were screened for the presence of alleles of susceptibility genes *Tsn1*, *Snn1* using the PCR method. The redox-status of infected plants was determined using spectrophotometric methods. It was shown that the *Tsn1* gene is more often found in winter wheat (50%), and the *Snn1* gene is more often found in spring wheat (91.7%). The study identified genotypes with a null allele of the *tsn1* gene (Omskaya35, Chinese Spring), with a null allele of the *snn1* gene (Hanna, Amelio) and with two null alleles of the *tsn1/snn1* genes (Boevchanka, Selkirk, Atlas66), as well as with dominant alleles of the *Tsn1/Snn1* genes (Zhmitsa, Iren). The wheat genotype with two dominant alleles of the *Tsn1/Snn1* genes (Zhmitsa) was more susceptible to the virulent isolate of the pathogen SnB than the genotypes with one dominant allele of the *Tsn1* (Amelio) or *Snn1* gene (Omskaya 35). The wheat genotype with two null alleles of the *tsn1/snn1* genes (Boevchanka) showed a complete incompatibility reaction, which was manifested in the accumulation of hydrogen peroxide, which provided the induction of protective mechanisms and pathogen growth inhibition. The compatibility reaction (Zhmitsa/SnB), on the contrary, was characterized by a decrease in the content of hydrogen peroxide at the initial stage of infection (24 hours), which subsequently led to the development of extensive lesion area. This work was supported by the RFBR in the framework of the research project no. 20-316-80047, no. 18-04-00978.

### Роль эфффекторов патогена SnTox в развитии реакции совместимости в патосистеме пшеница – *Stagonospora nodorum*

Нужная Т.В.<sup>1</sup>, Веселова С.В.<sup>1</sup>, Бурханова Г.Ф.<sup>1</sup>, Румянцев С.Д.<sup>1</sup>

Институт биохимии и генетики ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

**Аннотация.** Показано, что взаимодействия SnToxA-Tsn1, SnTox1-Snn1 в патосистеме пшеница-*Stagonospora nodorum* играют важную роль в развитии септориоза и направлены на манипулирование редокс-статусом хозяина.

**Ключевые слова.** *Stagonospora nodorum*, *Triticum aestivum*, эфффекторы патогена, взаимодействия SnToxA-Tsn1, SnTox1-Snn1.

Важнейший фактор вирулентности возбудителя септориоза пшеницы *Stagonospora nodorum* Berk. – многочисленные некротрофные эфффекторы (НЭ) гриба (SnTox), взаимодействующие с продуктами генов восприимчивости хозяина (*Snn*). Взаимодействия SnTox-*Snn* осуществляются по типу ген-на-ген, ведут к развитию болезни и направлены на манипулирование редокс-статусом хозяина. Цель работы состояла в изучении влияния взаимодействий SnToxA-Tsn1, SnTox1-Snn1 на развитие инфекции и редокс-статус у растения хозяина. В работе использованы несколько штаммов *S. nodorum* (SnB, Sn4VD, Sn9MN) и более 50 сортов мягкой яровой и озимой пшеницы. С помощью метода ПЦР проведен скрининг различных сортов пшеницы на наличие аллелей генов восприимчивости *Tsn1*, *Snn1*. Редокс-статус инфицированных растений определяли с помощью спектрофотометрических методов. Было показано, что ген *Tsn1* чаще встречается у пшениц с озимым типом развития (50%), а ген *Snn1* чаще встречается у пшениц с яровым типом развития (91,7%). В ходе исследования определены генотипы с нулевой (рецессивной) аллелью гена *tsn1* (Омская35, Башкирская26, Экада113, Chinese Spring), с нулевой аллелью гена *snn1* (Hanna, Amelio) и с двумя нулевыми аллелями генов *tsn1/snn1* (Боевчанка, Selkirk, Atlas66), а также с доминантными аллелями генов *Tsn1/Snn1* (Жница, Ирень). Роль НЭ в развитии реакции совместимости была изучена на различных парах генотипов пшеница-*S. nodorum*. Генотип пшеницы с двумя доминантными аллелями генов *Tsn1/Snn1* (Жница) был более восприимчив к вирулентному изоляту патогена SnB, чем генотипы с одним доминантным аллелем гена *Tsn1* (Amelio) или *Snn1* (Омская35). Генотип пшеницы с двумя нулевыми аллелями генов *tsn1/snn1* (Боевчанка) показал полную реакцию несовместимости, которая проявлялась в повышении содержания перекиси водорода, что обеспечивало запуск защитных механизмов и остановку роста патогена. Реакция совместимости (Жница/SnB), напротив, характеризовалась снижением содержания перекиси водорода на начальной стадии инфицирования (24 ч), что впоследствии приводило к развитию обширных зон поражения.

Работа выполнена в рамках РФФИ № 20-316-80047-мол-эв-а, №18-04-00978-А.

**Phylogenetic diversity of fast-growing nodule bacteria (*Rhizobiaceae*) of the North Caucasus region**Onishchuk O.P.<sup>1</sup>, Kurchak O.N.<sup>1</sup>, Andronov E.E.<sup>1</sup>, Kimeklis A.K.<sup>1</sup>, Aksenova T.S.<sup>1</sup>, Dzyubenko N.I.<sup>2</sup>,  
Dzyubenko E.A.<sup>2</sup>, Provorov N.A.<sup>1</sup><sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St.-Petersburg, Russia; <sup>2</sup>All-Russia Institute for Plant Genetic Resources named after N. Vavilov, St.-Petersburg, Russia

E-mail: olony@yandex.ru

**Key message.** It was shown that in the nodule bacteria of the vetch and goats' rue, isolated in the North Caucasian region, the phylogenetic differences of biotypes for symbiotic genes are more pronounced than for the housekeeping genes.

**Keywords:** rhizobia of goats' rue, alfalfa, clover and vetch; phylogenetic analysis; symbiotic genes (*nodA*, *nodX*); housekeeping genes (*glnII*, 16S rRNA)

The North Caucasus is the center of origin for many species of leguminous plants from galegoid complex (tribes *Fabae*, *Trifolieae*, *Galegae*), which form the highly organized symbioses with fast-growing rhizobia (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Neorhizobium*, family *Rhizobiaceae*). As a result of the expedition to Krasnodar area and Adygea Republic, 405 samples of the legume roots with nodules and of soils were collected, from which 208 isolates of nodule bacteria were obtained. The collected plants belong to four cross-inoculation groups (goats' rue, vetch-peas, clover, alfalfa), which represent the major part of the phylogenetic diversity of legume-rhizobial symbioses formed in ecosystems of temperate latitudes. The most numerous group (124) is represented by natural isolates from the goats' rue cross-inoculation group (60 for *Galega orientalis* and 64 for *G. officinalis*). For phylogenetic analysis, DNA isolated from rhizobia strains was screened for 16S rDNA, *glnII* housekeeping chromosomal markers, and for *nodA* and *nodX* symbiotic genes. Gene *nodX* was detected in all analyzed clover rhizobia, while it was found in 50% of the vetch strains. Based on the sequence analysis (Neighbor-Joining method, Maximum composite likelihood model using a bootstrap test in 1000 replicas), dendrograms were constructed that reflect the diversity of the isolated strains at different taxonomic levels. It turned out that the sequences of *glnII* and 16S rDNA genes in different rhizobia species (*S. meliloti*, *R. leguminosarum*, *N. galegae*) form isolated clusters, however, for biotypes within the species (*R. leguminosarum* bv. *viciae* and bv. *trifolii*, *N. galegae* bv. *orientalis* and bv. *officinalis*), the clusters of these sequences overlap. However, the *nodA* gene is clearly distinguished for different rhizobia species as well as for *R. leguminosarum* and *N. galegae* biotypes supporting earlier findings that divergence of bacterial biotypes that differ in host specificity is associated with disruptive selection induced by plants. This selection is most pronounced for genes that control symbiosis, while its effect on the housekeeping genes is much more weak.

The equipment of the Center for Genomics, Proteomics and Cell Biology, ARRIAM was used. Supported by the Russian Science Foundation, grant 19-16-00081.

**Филогенетическое разнообразие быстрорастущих клубеньковых бактерий (*Rhizobiaceae*) Северо-Кавказского региона**Онищук О.П.<sup>1</sup>, Курчак О.Н.<sup>1</sup>, Андронов Е.Е.<sup>1</sup>, Кимеклис А.К.<sup>1</sup>, Аксенова Т.С.<sup>1</sup>, Дзюбенко Н.И.<sup>2</sup>,  
Дзюбенко Е.А.<sup>2</sup>, Проворов Н.А.<sup>1</sup><sup>1</sup>ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Показано, что у клубеньковых бактерий вики и козлятника, выделенных в Северо-Кавказском регионе, филогенетические различия биотипов по симбиотическим генам выражены сильнее, чем по генам “домашнего хозяйства”.

**Ключевые слова:** ризобии козлятника, вики, люцерны и клевера; филогенетический анализ; симбиотические гены (*nodA*, *nodX*); гены домашнего хозяйства (*glnII*, 16S рPHK)

Северный Кавказ является центром происхождения многих бобовых растений, относящихся к галегоидному комплексу (трибы *Fabae*, *Trifolieae*, *Galegae*), для которого характерно образование симбиозов с быстрорастущими ризобиями (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Neorhizobium* из сем. *Rhizobiaceae*). В результате экспедиции в Краснодарский край и республику Адыгея собрано 405 образцов корней бобовых с клубеньками и почвой, из которых выделены 208 штаммов ризобий. Собранные растения относятся к 4 группам перекрестной инокуляции (козлятника, вики-гороха, клевера, люцерны), представляющим основную часть разнообразия бобово-ризиобальных симбиозов умеренных широт. Наиболее многочисленная группа (124) представлена изолятами из группы перекрестной инокуляции козлятника (60 для *Galega orientalis* и 64 для *G. officinalis*). Для проведения филогенетического анализа из ризобий была выделена ДНК и проведен скрининг по хромосомным маркерам домашнего хозяйства 16S рPHK, *glnII*, и по симбиотическим генам *nodA* и *nodX*. Ген *nodX* выявлен у всех проанализированных ризобий клевера, но лишь у 50% штаммов вики. На основании анализа последовательностей (метод Neighbour-Joining, модель Maximum composite likelihood с применением bootstrap теста, 1000 реплик) построены дендрограммы, отражающие разнообразие выделенных изолятов на различных таксономических уровнях. Оказалось, что последовательности *glnII* и 16S рPHK у разных видов ризобий (*S. meliloti*, *R. leguminosarum*, *N. galegae*), образуют обособленные кластеры, однако для биотипов внутри видов (*R. leguminosarum* bv. *viciae* и bv. *trifolii*, *N. galegae* bv. *orientalis* и bv. *officinalis*) кластеры последовательностей перекрываются. Однако для симбиотического гена *nodA* четкое обособление показано как для разных видов ризобий, так и для биотипов внутри видов. Эти различия согласуются с полученными ранее данными о том, что дивергенция биотипов ризобий, различающихся по хозяйской специфичности, связана с дивергентным отбором, индуцируемым растениями-хозяевами. Этот отбор наиболее активно действует на гены, контролирующие симбиоз, тогда как его действие на гены домашнего хозяйства менее выражено.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Геномики, протеомики и клеточной биологии» ВНИИСХМ и поддержана РФФИ, грант 19-16-00081.

## Investigation of genetic heterogeneity of phages from phytopathogenic bacteria *Xanthomonas phaseoli*

Orlovskaya P.I., Pilipchuk T.A., Girilovich N.I., Mandrik-Litvinkovich M.N., Kalamiyets E.I

Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

E-mail: orlovskapi@gmail.com

**Key message.** DNA of 8 *Xanthomonas phaseoli* bacteriophages were studied by restriction analysis using diverse endonucleases. Based on similarity of restricts the phages were divided into 4 groups.

**Keywords:** bacteriophages, phytopathogenic bacteria, restriction analysis

Bacteria *Xanthomonas phaseoli* are causal agents of bacterial blight in leguminous crops responsible for fading and decay of leaves, stems, degeneration of beans and seeds. Application of virulent bacteriophages is one of the methods to control phytopathogen infections of agricultural crops.

Eight phages XpP1, XpP2, XpP3, XpP4, XP1, Xp23, XpIK, XpD with specificity to indicator culture *Xanthomonas phaseoli* were isolated from various natural sources. One of the criteria characterizing bacteriophages is the size and number of DNA fragments resulting from the action of restrictases.

Aim of this research was investigation of genetic heterogeneity of *X. phaseoli* BIM-279 bacteriophages using restriction analysis.

Phage DNA samples were treated with endonucleases *HindII*, *HindIII*, *AvaI*, *HpaI* and *EcoRI* (Fermentas) during 1.5 h at 37°C according to the recommended protocol.

Analysis of results has revealed that the number of restricts varied from 1 to 12, and their size from 500 to 10 000 b p. Based in these data bacteriophages were divided into 4 main groups. The phages of the first group XpP1, XpP4, Xp23, XpD under the impact of endonucleases *HindII*, *AvaI*, *HpaI* formed the identical set of DNA fragments. In addition, DNA of these phages was not sensitive to the enzymes *EcoRI* and *HindIII*. The second group composed of phages XpP2, XpP3 also produced the similar DNA fragments upon treatment with restrictases *HindII*, *AvaI*, *HpaI* and was not susceptible to *EcoRI* and *HindIII* action. Groups 3 and 4 comprised one phage each, XpIK and XP1, respectively. DNA of phage XpIK exposed to restrictases *HindII* и *AvaI* yielded the set of restricts distinct from the phages of groups 1 and 2 and was not responsive to restrictases *HpaI*, *EcoRI* and *HindIII*. In turn, DNA of phage XP1 did not harbor restriction sites for any of the applied restrictases.

Summing up, comparison of the restriction profiles of isolated *X. phaseoli* BIM-279 bacteriophages led us to deduce that the examined phages are different in the genetic structure and may be further used as components of the consortium to control bacterial diseases of agricultural crops.

## Изучение генетической гетерогенности бактериофагов фитопатогенных бактерий *Xanthomonas phaseoli*

Орловская П.И., Пилипчук Т.А., Гирилович Н.И., Мандрик-Литвинкович М.Н., Коломиец Э.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

**Аннотация.** Методом рестрикторного анализа с использованием различных эндонуклеаз исследованы ДНК восьми бактериофагов *Xanthomonas phaseoli*. В результате фаги были разделены на четыре группы по схожести рестрикторов.

**Ключевые слова:** бактериофаги, фитопатогенные бактерии, рестрикторный анализ

Бактерии *Xanthomonas phaseoli* являются возбудителями обыкновенной пятнистости (бактериального ожога) бобовых культур и вызывают увядание и отмирание листьев, стеблей, недоразвитость бобов и семян. Одним из методов защиты сельскохозяйственных культур от бактериальных фитопатогенов является использование вирулентных бактериофагов.

Из различных природных источников было выделено 8 фагов XpP1, XpP2, XpP3, XpP4, XP1, Xp23, XpIK, XpD к индикаторной культуре *Xanthomonas phaseoli* BIM-279. Одним из критериев характеристики бактериофагов является размер и количество фрагментов их ДНК, образующихся под действием ферментов рестрикции.

Исходя из вышеизложенного, целью исследования являлось изучение генетической гетерогенности бактериофагов *X. phaseoli* BIM-279 с использованием рестрикторного анализа.

Фаговые ДНК обрабатывали эндонуклеазами *HindII*, *HindIII*, *AvaI*, *HpaI* и *EcoRI* (Fermentas) в течение 1,5 часа при 37°C согласно протоколу.

При анализе полученных результатов рестрикции было выявлено, что количество рестрикторов варьировало от 1 до 12, а их размер – от 500 до 10 000 п.н. На основании этих данных бактериофаги разделили на 4 основные группы. К первой группе отнесли фаги XpP1, XpP4, Xp23, XpD, ДНК которых под воздействием эндонуклеаз *HindII*, *AvaI*, *HpaI* формировала одинаковый набор фрагментов. Кроме того, ДНК данных фагов была нечувствительна к действию ферментов *EcoRI* и *HindIII*. Вторую группу составили фаги XpP2, XpP3, которые также давали сходные фрагменты ДНК после обработки рестриктазами *HindII*, *AvaI*, *HpaI* и не были восприимчивы к действию *EcoRI* и *HindIII*. Третья и четвертая группы включали по одному фагу XpIK и XP1, соответственно. ДНК фага XpIK при обработке рестриктазами *HindII* и *AvaI* образовывала набор рестрикторов, отличающий его от фагов первых двух групп, и была нечувствительна к рестриктазам *HpaI*, *EcoRI* и *HindIII*. В свою очередь, ДНК бактериофага XP1 не содержала сайтов рестрикции ни для одной из использованных рестриктаз.

Таким образом, сравнение рестрикторных профилей выделенных бактериофагов *X. phaseoli* BIM-279 позволило заключить, что фаги различны по генетической структуре и в дальнейшем могут быть использованы в составе консорциума для защиты сельскохозяйственных культур от бактериозов.

### Monitoring of vegetation on oil-contaminated soils and remediation potential of indigenous plant species

Panchenko L.V., Muratova A.Yu., Turkovskaya O.V.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

E-mail: lpanchenko56@yandex.ru

**Key message.** The remediation potential of the indigenous plant species growing on oil-contaminated soils is substantiated as basis for development approaches to natural phytoremediation.

**Keywords:** oil pollution, phytoremediation potential, rhizosphere, degradation genes

Studies of the revegetation and natural remediation of contaminated soil is still relevant. On the basis of the long-term field research we tried to reveal the regularities of vegetation cover development on oil-contaminated soils of the steppe zone of the Volga Uplands, and to identify plant species, which make the main contribution to the remediation process. Taxonomic and ecological-coenotic analyzes were carried out. The concentrations of petroleum hydrocarbons, available nitrogen, the number of total heterotrophic and the oil-oxidizing microorganisms in the rhizosphere of most common 79 plant species and in neighboring bulk soils were determined. This allowed us to characterize the phytoremediation potential of the native plant species studied.

In all rhizosphere samples, the content of petroleum hydrocarbons was 2–3 times lower than in soil without plants taken from the same site. According to the data obtained, the highest phytoremediation potential was determined for yellow medick (*Medicago falcata* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.) and hop medick (*Medicago lupulina*), barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*), tatarian orache (*Atriplex tatarica*) and brown nonea (*Nonea pulla*).

Using molecular genetic approaches for characterization of rhizospheric communities showed that the rhizosphere of *M. falcata* and non-rhizospheric bulk soil revealed the highest relative abundance of the alkane degradation gene *alkB* in their microbiomes. The abundance of the aromatic degradation gene *nah* was also maximum in the rhizosphere of *M. falcata*, that was an order of magnitude higher than for other plants. The dominant position in all samples of the oil-contaminated soil studied was occupied by representatives of *Actinobacteria* and *Proteobacteria*. The rhizosphere communities of plant species were noticeably distinguished. In the rhizosphere of *M. falcata*, a significant part of *Firmicutes* phylum represented by *Bacillus* as the only genus was noted. The *Gemmatimonadetes* phylum was distinguished in the rhizosphere of *E. crus-galli*. The rhizosphere community of *M. falcata* had the smallest taxonomic diversity that may be due to the selective effect of the plant root exudates on the formation of its rhizomicrobiome.

### Мониторинг растительного покрова на нефтезагрязненных почвах и ремедиационный потенциал образующих его растений

Панченко Л.В., Муратова А.Ю., Турковская О.В.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

**Аннотация.** Обоснован ремедиационный потенциал аборигенной флоры нефтезагрязненных почв, который позволяет использовать ее и выявленные перспективные растительные виды для разработки приемов естественной фиторемедиации.

**Ключевые слова:** нефтяное загрязнение, фиторемедиационный потенциал, ризосфера, гены деградации.

Исследования процессов восстановления растительного покрова и естественной ремедиации на загрязненных территориях остаются по-прежнему актуальными. На основе данных многолетних полевых исследований мы постарались осветить закономерности формирования растительного покрова на нефтезагрязненных почвах степной зоны Приволжской возвышенности и выявить растительные виды, которые вносят основной вклад в процесс ремедиации. Были проведены таксономический и эколого-ценотический анализы; определены концентрации нефтяных углеводородов, доступного азота, общей численности микроорганизмов и нефтеокисляющих микроорганизмов в ризосфере 79 наиболее часто встречающихся растительных видов и в почве без растительности, что позволило охарактеризовать фиторемедиационный потенциал этих растений.

Во всех ризосферных образцах содержание нефтепродуктов было в 2–3 раза ниже, чем в почве без растений, отобранной с того же участка. Согласно полученным данным наибольшим фиторемедиационным потенциалом обладали люцерны серповидная (*Medicago falcata*), посевная (*Medicago sativa*) и хмелевая (*Medicago lupulina*), ежовник обыкновенный (*Echinochloa crus-galli*), лебеда татарская (*Atriplex tatarica*) и noneя темно-буряя (*Nonea pulla*).

Использование молекулярно-генетических подходов для характеристики ризосферных сообществ показало, что ризосфера *M. falcata* и неризосферная почва демонстрировали наибольшую относительную обогащенность своих микробиомов геном деградации алканов *alkB*. Численность генов деградации ароматических соединений *nah* была максимальной также в ризосфере *M. falcata*, на порядок превышая этот показатель для других растений. Доминирующее положение во всех образцах исследуемой нефтезагрязненной почвы занимали представители фил *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. На фоне общего рисунка таксономических профилей заметно выделялись ризосферные сообщества *M. falcata* и *E. crus-galli*. В ризосфере *M. falcata* отмечалась значительная доля *Firmicutes*, представленной единственным родом *Bacillus*, а в ризосфере *E. crus-galli* – доля *Gemmatimonadetes*. Ризосферное сообщество *M. falcata* характеризовалось наименьшим таксономическим разнообразием, что может быть связано с селективным действием корневых выделений растения на формирование своего ризомикробиома.



***In vitro* cultivation, aquaculture and methods of transformation of water caltrop *Trapa L.***

Panfilova M.A.<sup>1</sup>, Mikhaylova E.V.<sup>2</sup>, Musin Kh.G.<sup>2</sup>, Kuluev B.R.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Bashkir State University, Ufa, Russia; <sup>2</sup> Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, Ufa, Russia

E-mail: masha.panfi@yandex.ru

**Key message.** *In vitro* and aquarium cultures of water caltrop were obtained. Optimal conditions of cultivation were determined. The cultures were subjected to *Agrobacterium rhizogenes*-mediated and biolistic transformation.

**Keywords:** *Trapa natans*, water caltrop, *in vitro*, aquaculture, *Agrobacterium rhizogenes*

Water caltrop *Trapa L.* is an important source of nutrition in warmer regions. In China, India, Japan, Korea the genetics and biologically active compounds of this plant are being actively studied. Its seed coat contains antioxidants and antimicrobial compounds that can be extracted and used in pharmaceutical industry. In Russia and Europe water caltrop is under the risk of extinction. Its only habitats in The Republic of Bashkortostan are lakes Upkankul and Bilgilyar [1,2]. To preserve and study unique local populations, it is important to develop methods of its *in vitro* culture and aquaculture. The goal of our study was to find the perfect conditions for cultivation of water caltrop.

Seeds gathered in September in lake Upkankul were stratified at +4°C for 5 months and then sterilized with ethanol and sodium hypochlorite. In aquarium culture we tried 4 sets of conditions with different pH (8.4 and 6.7) and temperature (22°C and 25°C). 20 L aquariums were filled with tap water. In control conditions natural sapropel was used as a substrate. *In vitro* propagation of water caltrop embryos was carried out on 5 types of MS medium, liquid and solid, rich and poor. 6-BAP, NAA and GA<sub>3</sub> were used to stimulate the development of embryos. Water caltrop *in vitro* cultures are known to suffer from browning. To overcome it, ascorbic and citric acids, AgNO<sub>3</sub> and phloroglucinol were used. The cultures were grown in climate control chamber at 25°C.

In aquarium best results were obtained from settings with higher temperature and more alkaline pH (60% of seeds germinated). Worst rate of seeds germination was observed in more acidic and warm aquarium (seeds did not germinate). On sapropel up to 80% of seeds germinated which is indicative of an important role of organic compound in growth and development of water caltrop. The development of the embryos began after 4-7 days of cultivation. Up to 50% of the embryos germinated depending on the medium composition. More alkaline pH and addition of AgNO<sub>3</sub> and phloroglucinol were the most effective against browning. Some plants were able to flower in these conditions. Transformation of water caltrop *in vitro* and aquarium cultures with *Agrobacterium rhizogenes* strain A4 was unsuccessful. Germinated embryos were also used for biolistic transformation with a plasmid containing *rol* genes isolated from these bacteria.

The reported study was funded by Russian Science Foundation according to the research project № 18-74-00056.

1. Kuluev B.R., Artyukhin A.E., Shevchenko A.M., Mikhaylova E.V. (2017). Water chestnut *Trapa L.*: biology, habitat and the study of its isolated populations in the lakes of Nurimanovsky district in the republic of Bashkortostan. *Biomics*. 9(2): 101–118.

2. Artyukhin A.E., Mikhaylova E.V., Kuluev B.R. (2019). Study of isolated populations of the water caltrop *Trapa sibirica* Fler. (*Lythraceae*) in the Republic of Bashkortostan. *Bulletin of Perm University. Biology*, (3), 217-226.

**Changing the balance of nutrients and the content of total chlorophyll in the leaves-feathers of onions (*Allium cepa* L.), grown hydroponically on water various of physical structures with the use of the biopreparation «Agrofil»**

Panfyorova T.V.<sup>1</sup>, Puhalsky Y.V.<sup>2,3</sup>, Vorobyov N.I.<sup>4</sup>, Kozhemyakov A.P.<sup>4</sup>, Ol'hovskiy E.V.<sup>5</sup>, Kamputin I.V.<sup>2</sup>, Loskutov S.I.<sup>2,3</sup>, Yakubovskaya A.I.<sup>6</sup>, Garabadzhiu A.V.<sup>1</sup>, Ivakhnyuk G.K.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Saint-Petersburg State Institute of Technology, St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup>«BioEcoTech» LTD, St. Petersburg, Russia; <sup>3</sup>Pushkin Leningrad State University, St. Petersburg - Pushkin, Russia; <sup>4</sup>FSBSI "ARRIAM", St. Petersburg - Pushkin, Russia; <sup>5</sup>"Torfogumat" LTD, St. Petersburg, Russia; <sup>6</sup>FSBSI "SRIAC", Simferopol, Crimea  
E-mail: tamara.panf.work@yandex.ru; puhalskyan@gmail.com

**Key message.** The possibility of growing plants of onion sets (*Allium cepa* L.) of the Stuttgart Riesen variety under hydroponic culture conditions under the integrated influence of biological and physical factors is considered.

**Keywords:** structured water, hydroponics, *Allium cepa*, biopreparation, chlorophyll, nutrients

Among the various physical environmental factors that can affect the change in bioregulatory processes of plant development, the problem of low magnetic fields (LMF) deserves special attention. If in the field of public health, their influence is already well studied and proven, then in the field of plant magnetobiology, due to a lack of research from the perspective of physics, discussions and debates are still ongoing. This is due to the fact that in this case we are not dealing with the thermal chaotic motion of atoms, but with the informational effects of the action of physical fields on living matter. The aim of the work was to assess the possibility of growing plants of onion sets (*Allium cepa* L.) of the Stuttgart Riesen variety under hydroponic culture under the integrated influence of biological and physical factors. The experiment was conducted in a closed climatic minibox with controlled microclimate and insolation parameters. Bulbs were planted in frosted glass vessels with a volume of 1.0 liter, filled with a nutrient solution. Magnetic processing was carried out in two different ways: by the method of electromagnetic influence with a variable frequency-modulated potential and a device mainly with magnetic induction. In addition, the experiment included the option of using structured water obtained through high-speed machining in a vortex mill. Also, for each of the options, in addition to introducing pure salts of biophilic elements, vessels were laid with the introduction of a suspension of the microbiological preparation Agrofil into the medium ( $7 \cdot 10^8$  CFU/ml). The control was plants grown under ordinary conditions without any third-party treatments. The total duration of the experiment was 30 days. The results of the experiment showed an increase in the total biomass of plants in each of the options with physical processing. A positive correlation was also found between the morphometric indices and the results of measuring the total chlorophyll content in feather leaves using an optical counter SPAD 502. Mass-spectrometric analysis (Agilent 7500) revealed an increase in the concentration of alkali metals (potassium and sodium) and a decrease in the accumulation of copper ions. The introduction of a biological product into the medium leveled out the manifestation of these differences in the variants with magnetized liquid, but retained and strengthened their manifestation in the variant with vortex water.

**Изменение баланса питательных элементов и содержания общего хлорофилла в листьях-перьях лука (*Allium cepa* L.), выращенного гидропонным методом на воде различной физической структуры с применением биопрепарата «Агрофил»**

Панфёрова Т.В.<sup>1</sup>, Пухальский Я.В.<sup>2,3</sup>, Воробьев Н.И.<sup>4</sup>, Кожемяков А.П.<sup>4</sup>, Ольховский Э.В.<sup>5</sup>, Кампутин И.В.<sup>2</sup>, Лоскутов С.И.<sup>2,3</sup>, Якубовская А.И.<sup>6</sup>, Гарабаджю А.В.<sup>1</sup>, Ивахнюк Г.К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>СПбГТИ (ТУ), Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>ООО НПО «БиоЭкоТех», Санкт-Петербург, Россия; <sup>3</sup>ГАОУ ВО ЛО ЛГУ им. А.С. Пушкина, Санкт-Петербург, Россия; <sup>4</sup>ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, Россия; <sup>5</sup>ООО «Торфогумат», Санкт-Петербург, Россия; <sup>6</sup>ФГБУН НИИСХ Крыма, Симферополь, Крым

**Аннотация.** Рассмотрена возможность выращивания растений лука-севка (*Allium cepa* L.) сорта Штутгарт Ризен в условиях гидропонной культуры при интегральном воздействии биологического и физического факторов.

**Ключевые слова:** структурированная вода, гидропоника, *Allium cepa*, биопрепарат, хлорофилл, элементный состав

Среди различных физических факторов окружающей среды, которые могут оказывать влияние на изменение биорегуляторных процессов развития растений, особое внимание заслуживает проблема слабых магнитных полей (СМП). Если в области здравоохранения людей, их влияние уже достаточно хорошо изучено и доказано, то в области магнитобиологии растений, из-за недостатка исследований с позиции физики, еще ведутся дискуссии и споры. Это связано с тем, что в данном случае мы имеем дело не с тепловым хаотическим движением атомов, а с информационными эффектами воздействия физических полей на живую материю. Цель работы состояла в оценке возможности выращивания растений лука-севка (*Allium cepa* L.) сорта Штутгарт Ризен в условиях гидропонной культуры при интегральном воздействии биологического и физического факторов. Эксперимент проводился в закрытом климатическом минибоксе с контролируемыми параметрами микроклимата и инсоляции. Луковицы высаживали в матовые стеклянные сосуды объемом 1,0 литр, заполненные питательным раствором. Магнитная обработка проводилась двумя различными способами: методом электромагнитного воздействия с переменным частотно-модулированным потенциалом и прибором преимущественно с магнитной индукцией. Дополнительно эксперимент включал вариант с применением структурированной воды, полученной благодаря высокоскоростной механической обработке в вихревой мельнице. Также, на каждый из вариантов, помимо внесения чистых солей биофильных элементов, были заложены сосуды с интродукцией в среду суспензии microbiological preparation «Агрофил» ( $7 \cdot 10^8$  КОЕ/мл). Контролем служили растения, выращенные в обычных условиях без каких-либо сторонних обработок. Общая продолжительность опыта составила 30 суток. Результаты эксперимента показали увеличение общей биомассы растений в каждом из вариантов с физической обработкой. Отмечена положительная корреляция между морфометрическими показателями и результатами измерений содержания общего хлорофилла в листьях-перьях с помощью оптического счетчика SPAD 502. Масс-спектрометрический анализ (Agilent 7500) выявил повышение концентрации щелочных металлов (калия и натрия) и снижение аккумуляции ионов меди. Интродукция в среду биопрепарата нивелировала проявление данных различий у вариантов с омгниченной жидкостью, но сохранила и усилила их проявление на варианте с вихревой водой.



### Identification of extracellular low-molecular-weight phosphonates of *Pectobacterium atrosepticum*

Parfirova O.I.<sup>1,2</sup>, Gorshkov V.Y.<sup>1,2</sup>, Tarasova N.B.<sup>1</sup>, Gogoleva N.E.<sup>1,2</sup>, Smolobochkin A.V.<sup>3</sup>, Petrova O.E.<sup>1</sup>, Gogolev Y.V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center "Kazan Scientific Center of RAS", Kazan, Russia;

<sup>2</sup>Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia; <sup>3</sup>A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Federal Research Center "Kazan Scientific Center of RAS", Kazan, Russia

E-mail: parfirovaolga.i@gmail.com

**Key message.** Phytopathogenic pectobacteria produce extracellular low-molecular-weight phosphonates which possibly determine the strategy for the plant-microbe interaction.

**Keywords:** phytopathogen, phosphonates, C–P bond, NMR-spectroscopy

Phosphorus is one of the most important nature elements and plays an important role in many biological processes. One of the sources of phosphorus in nature is phosphonates - compounds whose characteristic feature is the presence of a carbon-phosphorus bond. According to various data, 10% of microorganisms contain genes encoding putative pathways of phosphonate biosynthesis, and about 40% of bacteria encode one or more pathways of phosphonate catabolism. The biosynthesis of phosphonates is diverse and common in nature, which suggests that the role of phosphonate molecules in the biosphere may be important. In particular, phosphonates are potent inhibitors of enzymatic activity and therefore may have antimicrobial and herbicidal properties.

By RNA-Seq analysis we have shown that *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*) phosphonate-related genes are up-regulated during soft-rot development compared to latent infection or cultures *in vitro*. However, the phosphonates of phytopathogenic microorganisms are not described. The aim of this work was to establish whether phytopathogenic pectobacteria are capable of producing low-molecular-weight phosphonates and also to understand their physiological role.

To check if *Pba* produce extracellular low-molecular-weight phosphonates, *in vitro* conditions that induce the expression of phosphonate-related genes were selected. It was found that the expression of genes encoding enzymes for the synthesis of C-P bonds was increased in the presence of a plant extract. After culturing under these conditions, the supernatants were separated, and the expected low-molecular-weight phosphonates were extracted. NMR-spectroscopy was used for the detection of phosphonates in the supernatants of *Pba* cultures. <sup>31</sup>P NMR-spectra for the obtained samples revealed the 21.91 ppm signal typical of phosphonates and the 59.69 ppm signal characteristic of phosphonium salts.

Locus-specific mutagenesis was applied to obtain mutant for the phosphonate biosynthesis-related genes. A *ΔfomI* (phosphoenolpyruvate phosphomutase is the main biosynthetic gene in this the metabolic way) deletion mutant did not produce these metabolites. But the signal of phosphonium salts was detected by <sup>31</sup>P NMR. Perhaps this is due to different ways of biosynthesis of low molecular weight phosphonates and phosphonium salts.

Thus, we identified for the first time the extracellular low-molecular-weight phosphonates in plant pathogenic bacteria and obtained information on their role in pathogenesis. We are currently conducting a comparative analysis of the strategy of the interaction of plants with the wild and *ΔfomI* mutant forms of *Pectobacterium atrosepticum* and checking their virulence. We also perform the experiments of the determination of the molecular structure of the revealed compounds.

This study was supported by RSF (19-14-00194).



**Transcriptome analysis of *Euonymus europaeus* fruits at different stages of development**Pavlenko O.S.<sup>1</sup>, Sadovskaya N.S.<sup>1</sup>, Mustafayev O.N.<sup>2</sup>, Akashkina Yu.V.<sup>1,3</sup>, Goldenkova-Pavlova I.V.<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Baku State University, Baku, Azerbaijan;<sup>3</sup>Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev, Moscow, Russia

Email: Helliga.p@gmail.com

**Key message.** The transcript *Euonymus europaeus* was collected *de novo*. A comparative analysis of transcriptomes from the stage of the globular embryo and the mature fruit made it possible to identify key DGAT genes at the contrasting stages of the development of *E. europaeus* fruits.

**Keywords:** triacylglycerol, diacylglycerol acyltransferase, *E. europaeus*, transcriptome analysis

Diacylglycerol acyltransferase (DGAT) plays the key role in the synthesis of triacylglycerols (TAG). DGAT provides the attachment of acyl fatty acids to diacylglycerol. At present, five types of DGAT are described in plants, which, apparently, formed during convergent evolution. Lipid biosynthesis can vary between closely related species and even in different tissues within the same species. In plants, the contribution of one or another type of DGAT varies greatly depending on the tissue, organ and stage of development of the organism, and can also be a response to stress. *Euonymus europaeus* is able to synthesize sn-1,2-diacyl-3-acetylgllycerides (AcDAG) in addition to conventional TAGs. This suggests the presence of at least three types of the DGAT enzyme in *E. europaeus*. Since the role of different DGATs on the accumulation of storage lipids at different stages of fruit development has not been studied previously, we performed a transcriptome analysis at the stages of a globular embryo and a mature fruit. The transcriptome of *E. europaeus* was collected *de novo*; a total of 152777 transcripts with an average length of 876 bp were collected. The transcripts with GO numbers were divided into three categories: biological process, molecular function, and cellular component. Metabolic pathways in *E. europaeus* have been identified by transcript mapping against the Kegg database using BLAST2GO and KAAS. In total, 10755 (7.04%) transcripts were annotated using the KEGG database and assigned to 3732 pathways. Expression levels of lipid metabolism genes were evaluated. A comparative analysis of the two transcriptomes revealed the key DGAT genes at the contrasting stages of the development of *E. europaeus* fruits.

**Транскриптомный анализ плодов *Euonymus europaeus* на разных стадиях развития**Павленко О.С.<sup>1</sup>, Садовская Н.С.<sup>1</sup>, Мустафаев О.Н.<sup>2</sup>, Акашкина Ю.В.<sup>1,3</sup>, Голденкова-Павлова И.В.<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия; <sup>2</sup>Бакинский ГосударственныйУниверситет, Баку, Азербайджан; <sup>3</sup>Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА имени К.А.

Тимирязева, Москва, Россия

**Аннотация.** Транскриптом *Euonymus europaeus* был собран *de novo*. Сравнительный анализ транскриптомов со стадии глобулярного зародыша и зрелого плода позволил выявить ключевые гены ДАГАТ на контрастных стадиях развития плодов *E. europaeus*.

**Ключевые слова:** триацилглицерин, диацилглицерин ацилтрансфераза, *E. europaeus*, транскриптомный анализ

Ключевую роль в синтезе триацилглицеринов (ТАГ) играет фермент диацилглицерин ацилтрансфераза (ДАГАТ), которая обеспечивает присоединение ацила жирной кислоты к диацилглицерину. На данный момент у растений описано пять типов ДАГАТ, которые, по-видимому, образовались параллельно в ходе конвергентной эволюции. Биосинтез липидов может различаться у близкородственных видов и даже в разных тканях в пределах одного вида. У растений вклад того или иного типа ДАГАТ сильно варьирует в зависимости от ткани, органа и этапа развития организма, а также может быть ответом на стресс. Растения рода бересклет и *Euonymus europaeus*, в частности, помимо обычных ТАГ способны синтезировать sn-1,2-диацил-3-ацетилглицериды (AcDAG), у которых sn-3-положение этерифицировано остатком уксусной кислоты. Это позволяет предположить наличие у *E. europaeus* как минимум трех типов фермента ДАГАТ. Поскольку роль разных ДАГАТ на накопление запасных липидов на разных стадиях развития плодов не изучалась ранее, нами был проведен транскриптомный анализ на стадиях глобулярного зародыша и зрелого плода. Транскриптом *E. europaeus* был собран *de novo*, всего собрано 152777 транскриптов со средней длиной 876 п.н. Транскрипты, для которых были идентифицированы GO-номера, разделили на три категории: биологический процесс, молекулярная функция и клеточный компонент. Метаболические пути в *E. europaeus* были идентифицированы картированием транскриптов против базы данных Kegg с использованием BLAST2GO и KAAS. В общем 10755 (7,04%) транскриптов были аннотированы с использованием базы данных KEGG и присвоены 3732 путям. У транскриптов, относящихся к генам липидного метаболизма, оценивали уровни экспрессии. Сравнительный анализ двух транскриптомов позволил выявить ключевые гены ДАГАТ на контрастных стадиях развития плодов *E. europaeus*.



### Investigation of molecular mechanisms involved in *Erwinia amylovora* biofilm formation

Pesotskaya K.Yu., Lagonenko A.L., Evtushenkov A.N.

Belarussian State University, Minsk, Belarus

E-mail: lagonenkoal@mail.ru

**Key message.** In this study we generated four insertional *Erwinia amylovora* mutants within *bssS* gene and *waa*, *aaeXAB* and *hec* operons. Our research included studying of the phenotypic characteristics of these mutants.

**Keywords:** biofilm formation, *Erwinia amylovora*, fire blight

A devastating plant disease fire blight, caused by the Gram-negative bacterium *Erwinia amylovora*, represents an enormous threat to fruit cultivation, as it can infect most plants of the *Rosaceae* family like apple, pear, rowanberry, quince. A variety of *E. amylovora* virulence factors have been described, and the majority of these, such as the type III secretion system (T3SS), the exopolysaccharides amylovoran and levan were found to contribute to the establishment of a successful infection in Rosaceous plants [1]. Biofilm formation may play an important role in the pathogenesis of *Erwinia amylovora* and in the movement of bacterial cells via plant xylem.

Bioinformatic analysis of the complete genome sequence of *E. amylovora* E2 have revealed several genes potentially involved in biofilm formation. In order to study the function of *rfa* (*waa*) operon (lipopolysaccharide (LPS) biosynthetic gene cluster), *aaeXAB* operon (aromatic carboxylic acid efflux operon), *hecAB* operon (involved in cell attachment and aggregation to the surfaces) and *bssS* (*yceP*) gene (regulator of biofilm through signal secretion) in the biofilm formation of *E. amylovora*, we generated four insertional mutants within these loci. Mutants were constructed by using the PCR-based one-step inactivation technique, as described previously [2]. Primer pair flanking the target loci and internal primers was used to confirm the mutants by PCR. Further research will be focused on studying the phenotypic characteristics of mutation in selected genes (*in vitro* biofilm assay, determining amylovoran concentration, cellulose biosynthesis assay) and identification of major mechanisms for regulating gene expression in *E. amylovora* biofilms.

1. Virulence factors of *Erwinia amylovora*: a review / N. Pique [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2015. – Vol. 16, № 6. – P. 12836-12845.
2. Datsenko, K.A. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products / K.A. Datsenko, B.L. Wanner // PNAS. – 2000. – Vol. 97, № 12. – P. 6640–6645.

### Stringent response is key player in plant-microbe interaction

Petrova O.E.<sup>1</sup>, Parfirova O.I.<sup>1</sup>, Sergeeva J.P.<sup>2</sup>, Gorshkov V.Y.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center "Kazan Scientific Center of RAS", Kazan, Russia;

<sup>2</sup>Kazan Federal University, Kazan, Russia

E-mail: poe60@mail.ru

**Key message.** Bacterial SpoT-dependent SR was activated in *Pectobacterium atrosepticum* when pathogen infected potato as well as tobacco plants. Pba induced plastid stringent response in tobacco plants, but not in potato plants. Jasmonic acid defense pathway was activated in tobacco plants, provoking rapid maceration of plant tissues. Salicylic acid defense pathway was induced in potato plants, probably ensuring a more prolonged coexistence of the phytopathogen with its host.

**Keywords:** stringent response, salicylic acid defense pathway, jasmonic acid defense pathway, ppGpp.

The endosymbiotic hypothesis of the origin of chloroplasts suggests that these organelles arose as a result of the symbiosis of a free-living photosynthetic protobacterium with an ancient eukaryotic cell. In the process of co-evolution of the host and symbiont, a radical reorganization of prokaryotic genome occurred but the chloroplasts retained the main elements of bacterial signaling pathways that are involved in the regulation of the functions of these organelles. One such signaling pathway is a stringent response (SR).

New aspect of stress response study is an analysis of bacterial and plastid SR during plant-microbe interactions. Since an infection is stress situation for host plant as well as a pathogen, stringent response can be induced in both "partners-in-infection". The study of these coincidental in time phenomena, initiated under plant-microbe contact, would be essential to fully understand the evolutionary interplay between plants and symbionts/pathogens.

In this study we have used two model pathosystems: phytopathogenic bacterium *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 and specific host plant potato *Solanum tuberosum*, co-evolving with pathogen for a long time and *P. atrosepticum* and non-specific host plant tobacco *Nicotiana tabacum*. The expression level of the genes, encoding bacterial and plastid stringent response and plant salicylic and jasmonic acid defense systems, was analyzed by RT PCR.

Bacterial SpoT-dependent SR was activated in pectobacteria when pathogen infected potato as well as tobacco plants. Apparently, phytopathogenic bacterium always perceives the contact with the host plant as a stressful event and responds to it by induction of SR.

*P. atrosepticum* induced plastid stringent response in tobacco plants. The expression level of *NtRSH2* gene, encoding the synthase of signal molecule ppGpp, increased more than eight-fold reliably at first hour of infection and remained at constant level during 6 hours of experiment. Herewith the expression of hydrolase *NtRSH1* gene did not change during 3 hours and then decreased.

Surprisingly, plastid SR was not activated in potato plants under pectobacterial infection. The expression level of ppGpp synthase *StRSH2* even declined 8-fold by the sixth hour. No expression change of ppGpp hydrolase *StRSH1* gene was revealed in potato plants under bacterial infection, compared to non-infected plants.

It is considered that guanosine tetraphosphate modulates salicylic acid signaling in plants. We have analyzed the expression profiles of genes encoding key genes of salicylic acid signaling defense pathway *PR1*, and antagonistic to it jasmonic acid signaling defense pathway *lox* (lipoxygenase) and *aoc* (allen oxide cyclase) under SR. In tobacco plants the expression of *PR1* gene increased only 4-fold under SR period. In the same time the expression of *lox* and *aoc* gradually increased 360-fold and 27-fold, respectively, during all experimental period. Rapidly progressive necrosis led to death of 100% tobacco plants. A very sharp induction of expression of *PR1* gene was observed in potato plants: the expression level of this gene increased 43-fold under 3 hours of infection and then decreased to control level. Herewith no induction of *lox* and *aoc* gene expression occurred. Symptoms of the disease developed slowly in potato and only 53% of plants died after 25 days post inoculation.

Generally accepted that salicylic acid induces defense responses against biotrophic pathogens, whereas jasmonic acid defense pathway is effective against necrotrophs. Soft rot enterobacteria of genus *Pectobacterium* are classical and well-studied examples of necrotrophic plant pathogenic bacteria. Nevertheless, life style of any phytopathogenic bacteria contains an initial biotrophic stage, in which the bacteria avoid the elicitation of or suppress plant defenses. Obviously, if the salicylic acid defense pathway is induced in potato chloroplasts in the first hours of infection, pathogenic bacteria either die or are forced to remain at the biotrophic stage for a long time. Conversely, the early induction of jasmonic acid defense pathway in tobacco plants under pectobacterial infection could be the cause of the rapid maceration of tobacco tissues and the death of plants.

Thus, the phytopathogen containment mechanism in a framework of asymptomatic infection, associated with the lack of activation of SR and with the trigger of salicylic acid defense pathway in specific plant host potato probably ensures a more prolonged coexistence of the phytopathogen with its host, which can be considered as a more perfect form of plant-microbe interactions developed during coevolution.

Project RFBR 20-34-70043.

## Cyanoprokaryota cultivation with the lighting unit under different light regimes

Petrukhina D.I.

Russian Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia

E-mail: daria.petrukhina@outlook.com

**Key message.** The continuous phototrophic growth and light / dark cycled regime showed comparable OTR, max.  $\mu$  0.06 h<sup>-1</sup>, biomass concentration ca. 0.8 g · L<sup>-1</sup>. During growth with 1.5 g · L<sup>-1</sup> glucose compared to the phototrophic showed the higher OTR.

**Keywords:** cyanobacteria, photobiotechnology, *Limnospira*

The cultivation of cyanoprokaryota in Device for Sterile Online Measurement system: light distribution over the shake flask bottom and *Limnospira* strain PCC 9108 (earlier *Arthrospira* (Nowicka-Krawczyk et al. 2019)) were maintained in Zarrouk medium. The light intensity of 180  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  measured via Li-Cor Quantum Sensor for photosynthetic active radiation 400-700 nm. Specific growth rate ( $\mu$ ) calculated during time interval of exponential growth from biomass concentration

( $\mu_x = \frac{\ln \frac{c_x}{c_{x0}}}{\Delta t}$ ) and from oxygen transfer rate values ( $\mu_{\text{OTR}} = \frac{\text{OTR} \times Y_{\text{O}_2/\text{C}_x}}{c_x}$ ) in h<sup>-1</sup>.  $c_x$  – biomass concentration,  $\Delta t$  – measuring time interval; yield

coefficient for biomass per oxygen  $Y_{\text{O}_2/\text{C}_x} = 0.5076 \frac{E_k}{E_{02}}$  respectively to (Vonshak, 1997); OTR – oxygen transfer rate (g<sub>O2</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)

as and carbon transfer rate automatically calculated by online monitoring photosynthetic unit. Dry biomass concentration  $c_x$  (g<sub>x</sub> · L<sup>-1</sup>) determined via OD at 750 nm of the cell suspension. Correlation of OD and dry biomass concentration advance performed as  $c_x = \text{OD}_{750 \text{ nm}} \cdot 0.82 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  respectively to (Petrukhina, Lykov 2018).

The cultivation with the lighting unit under different light regimes obtained: Specific growth rate  $\mu$  (h<sup>-1</sup>): 0.06 / 0.054 to continuous phototrophic and 0.058 / 0.055 to 16 h / 8 h light / dark cycled phototrophic. Minim. OTR -1.5 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. The total oxygen transfer (mmol · L<sup>-1</sup>): 80 to continuous phototrophic, 50 to 16 h / 8 h light / dark cycled phototrophic and 60 to continuous photomixotrophic. The biomass related oxygen production in mmol O<sub>2</sub> g<sub>x</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>: 0.18 to continuous phototrophic and 0.20 to 16 h / 8 h light / dark cycled phototrophic. The obtained specific growth rate  $\mu$  for phototrophic cultivated was in the range of values reported in literature for cyanoprokaryota suitable light intensity: 0.051 h<sup>-1</sup> (Tomaselli et al. 1997); 0.048 h<sup>-1</sup> (Vonshak 1997); 0.058 h<sup>-1</sup> (Xue et al. 2011).

The investigated cells able grew fully photosynthetically under the implemented warm white LED. OTR showed an increase in the first 30 h up to a mean (0.5 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) followed by a decrease until 48 h (minim. of -1.5 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) and then increased again to a value of ca. -0.5 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. The carbon dioxide transfer rate showed little deviation from 0 because produced carbon dioxide during respiratory activity was immediately dissolved in the liquid strong alkaline Zarrouk medium of pH and not emitted to the gas phase. The oxygen transfer showed an cells oxygen consumption of 18 mmol · L<sup>-1</sup> and photosynthetic production of overall 80 mmol · L<sup>-1</sup>. The oxygen transfer decelerated from 48 to 80 h cultivation, then a linear decline was observed.

To detect cells photosynthetic behaviour under changing light regime was applied a light / dark cycle. OTR during the dark period a close to zero (oxygen transfer at constant level) and during the light period – as under continuous light. OTR dropped down after 64 h cultivation to a minimum of -1.5 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> when biomass concentration reached approx. 0.2 g · L<sup>-1</sup>.

Photomixotrophic regime has been applied and Zarrouk medium was supplemented with a suitable glucose concentration (1.5 g · L<sup>-1</sup>) (Vonshak 1997; Chojnacka, Zielinska 2012). At the cultivations beginning the photomixotrophic culture showed a higher OTR than the phototrophic and then – a lower decrease until 48 h cultivation to minim. – 1.5 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> than phototrophic with – 2.0 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Glucose residual concentration was approx. 1 g · L<sup>-1</sup>. Consequently, it was not consumed completely.

Chojnacka K, Zielinska A. 2012. Evaluation of Growth Yield of *Spirulina* (*Arthrospira*) Sp. in Photoautotrophic, Heterotrophic and Mixotrophic Cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 437-445.

Molina Grima E et al. 1999. Photobioreactors: Light Regime, Mass Transfer, and Scaleup. *J. Biotechnol.* 70: 231-247.

Nowicka-Krawczyk P et al. 2019. Detailed characterization of the *Arthrospira* type species separating commercially grown taxa into the new genus *Limnospira* (Cyanobacteria). *Scientific reports.* 9(1): article Nr: 694.

Petrukhina DI, Lykov IN. 2018. Cryopreservation of cyanobacteria *Arthrospira platensis*. *Tekhnologii zhivikh sistem [Technologies of Living Systems]* 15(1): 49-54 (in Russian)

Posten C. 2009. Design Principles of Photo-Bioreactors for Cultivation of Microalgae. *Eng. Life Sci.* 9: 165-177.

Tomaselli L et al. 1997. Physiological Behaviour of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* during Acclimation to Changes in Irradiance. *J. Appl. Phycol.* 9: 37-43.

Vonshak A. 1997. *Spirulina Platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology, Taylor & Francis, London: 252.

Xue S et al. 2011. Growth of *Spirulina platensis* Enhanced Under Intermittent Illumination. *J. Biotechnol.* 151: 271-277.



**Genome characterization of *Pseudomonas* phages BIM BV-45 and BIM BV-46 – the components of biopesticide Multiphage to control bacterial diseases of vegetable crops**

*Pilipchuk T.A., Valentovich L.N., Kalamiyets E.I.*

Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

*E-mail: tanya.pilipchuk@tut.by*

**Key message.** The conducted investigation resulted in full nucleotide sequencing of *Pseudomonas* phage BIM BV-45 and *Pseudomonas* phage BIM BV-46 (registration numbers in GenBank NCBI MT094430 and MT094431) – components of biopesticide Multiphage

**Keywords:** genome, bacteriophages, *Pseudomonas*

Nowadays due to the growing challenge of antibiotic resistance in pathogenic bacteria application of lytic bacteriophages appears to be an alternative strategy to combat them. It seems natural therefore that search and characterization of bacteriophages will lay the basis for their target-oriented use as biological control agents. Biopesticide Multiphage developed at Institute of Microbiology, NAS of Belarus incorporates six phages protecting vegetable cultures from phytopathogenic pseudomonades.

Aim of the study was analysis of nucleotide sequences of genomes of two bacteriophages *Pseudomonas* phage BIM BV-45 and *Pseudomonas* phage BIM BV-46 from biopesticide Multiphage.

Nucleotide sequencing was carried out on MiSeq platform (Illumina). Automatic annotation of genetic fragments was performed using Prokka software complemented with databases InterProScan, CDSearch, BLASTp. Phage promoters were detected with the aid of PHIRE. Nucleotide sequences of phages BIM BV-45 and BIM BV-46 are deposited in GenBank NCBI library under registration numbers MT094430 and MT094431, respectively.

Analysis of full nucleotide sequence of phage BIM BV-45 sized 40 383 bp (58% GC content) led us to deduce that phage genome is represented by linear double-stranded DNA identical by 97% to *Pseudomonas* phage Andromeda (KX458241) belonging to genus *Bifseprivirus*, family *Podoviridae*, order *Caudovirales*. 46 open reading frames probably determining stages of the lytic cycle and 4 sigma-70 promoters were revealed within phage genome sequence.

Genome of bacteriophage BIM BV-46 also comprised linear double-stranded DNA consisting of 38 860 bp (56% GC content). The closest similarity (97.8%) was shown to *Pseudomonas* phage Pf-10 (KP025626), belonging to T7 phages of genus *Autographivirinae*, family *Podoviridae*, order *Caudovirales*. 38 open reading frames, 4 sigma-70 promoters and 9 specific phage promoters were found in BIM BV-46 genome sequence.

The amino acid residue sequences of the BIM BV-45 phage were 95–99% identical to *Pseudomonas* phage Andromeda isolated against *Pseudomonas syringae* bacteria. The second similar to phage BIM BV-45 was *Pseudomonas* phage Bf7 (JN991020) inhibiting the growth of bacteria *Pseudomonas tolaasii*, the causative agent of brown spotting of champignons. The amino acid sequences of *Pseudomonas* phage Bf7 were similar to 75–96% of all investigated proteins of phage BIM BV-45 except for DNA ligase, which was 96% identical to the sequence of *Pseudomonas* phage Andromeda. The sequences of amino acid residues of DNA endonuclease from phage BIM BV-45 were different from the proteins of the above-mentioned phages but showed small similarity (63%) to *Pseudomonas* phage PollyC (MG775261), causing lysis of the sweet cherry pathogen *Pseudomonas syringae*.

Most sequences of amino acid residues of phage BIM BV-46 were similar by 97–100% to proteins of *Pseudomonas* phage Pf-10 (KP025626), which is also one of the components of biopesticide Multiphage (BIM BV-61) and is active against phytopathogenic bacteria *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas putida*. In the bacteriophage BIM BV-46, the proteins responsible for the synthesis of endonuclease and endolysin were 99–100% identical to the *Pseudomonas* phage Phi-S1 (JX173487) proteins, while the amino acid sequences of the tail, the internal proteins of the virion and holine of BIM BV-46 showed identity 96–98%. The phage *Pseudomonas* phage Phi-S1 was isolated against the bacterium *Pseudomonas fluorescens* in a wastewater treatment plant and lysed most of the fluorescent species *Pseudomonas* and one strain of *Pseudomonas stutzeri*.

Summing up, based on genome structure, phages *Pseudomonas* phage BIM BV-45 and *Pseudomonas* phage BIM BV-46 constituting active principle of biopesticide of Multiphage are viruses referred to order *Caudovirales*, family *Podoviridae*, genera *Bifseprivirus* (BIM BV-45) and *Autographivirinae* (BIM BV-46). Genetic correlations of the studied phage genomes with nucleotide sequences of other *Pseudomonas* phages (deposited in GenBank NCBI) and small percentage of identity in the examined amino acid sequences indicate mosaic structure of the phages and mutational shifts arising in the course of phage genome evolution. The genetic diversity of bacteriophages BIM BV-45 and BIM BV-46 evidences a potentially broad spectrum of lytic activity of biopesticide of Multiphage toward phytopathogenic bacteria of genus *Pseudomonas*.

This work was financially supported by the Belarusian republican foundation for fundamental research (grant № B20P-078).

### Obtaining tissue culture of *Scutellaria baicalensis*

Pivovarova N.S., Shebitchenko T.S., Podboronova A.G.

St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Public Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

E-mail: nadezhda.kuzmina@pharminnotech.com

**Key message.** The work is devoted to the obtaining of callus culture of *Scutellaria baicalensis* from sterile microcuttings. Cultivation conditions were determined, growth activity was studied, and a qualitative analysis was carried out.

**Keywords:** *Scutellaria baicalensis*, callus culture, microcuttings

Currently, there is an increasing interest in herbal medicines. Medicines based on *Scutellaria baicalensis* (*Scutellaria baicalensis*, *Lamiaceae*) have a restorative, anti-inflammatory, sedative, antipyretic and antitumor effect. In cosmetics, it is used as a means of rejuvenation for hair and skin. The plant contains saponins, coumarins, isoflavones, flavonoids, glycosides, essential oils, tannins. Purpose of work is obtaining a stable callus culture of *Scutellaria baicalensis*. We germinated the seeds under sterile conditions and used microcuttings as explants. Microcuttings were dissected and placed on a nutrient medium Murashige-Skoog (MS). The medium contained phytohormones: 2,4-D (6 mg/ml) and kinetin (1 mg/ml) and half concentration of micro and macro salts. On the 20th day we moved the obtained primary callus to fresh nutrient medium. After the second passage, we moved the strains to MS with a complete content of micro and macro salts and phytohormones: NAA (1 mg/ml) and kinetin (1 mg/ml). Callus was cultivated in the dark, temperature 27-28°C, humidity 60-70%. We observed a discoloration of the cells from light brown to light yellow. At the seventh passage, a study of growth activity strain was performed. The curve of growth matched to the main phases of cell cultures growth. After the twelfth passage, a qualitative analysis was carried out for flavonoids. We used chromatography in a thin layer of sorbent. Solvent system: butanol : glacial acetic acid : water (4:1:5, by volume), detection: in UV light. Eight spots (yellow and tan) were detected on the chromatogram of the test sample. Rutin, luteolin, luteolin-7-O-glycoside were identified.

### Получение каллусной культуры шлемника байкальского

Пивоварова Н.С., Шибитченко Т.С., Подборонова А.Г.

Федеральное государственное бюджетное общеобразовательное учреждение высшего образования Санкт – Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Работа посвящена получению каллусной культуры шлемника байкальского из стерильных микрочеренков. Определены условия культивирования, изучена ростовая активность и проведён качественный анализ.

**Ключевые слова:** шлемник байкальский, каллусная культура, микрочеренки.

В настоящее время увеличивается интерес к лекарственным препаратам растительного происхождения. Средства на основе шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*, сем. Яснотковые) оказывают общеукрепляющее, противовоспалительное, седативное, жаропонижающее и противоопухолевое действие. В косметике используется в качестве средств омоложения для волос и кожи. В растении содержатся сапонины, кумарины, изофлавоны, флавоноиды, гликозиды, эфирные масла, дубильные вещества. Цель работы: получение стабильной каллусной культуры шлемника байкальского. Предварительно в стерильных условиях проращивали семена и в качестве эксплантов использовали микрочеренки. Микрочеренки рассекали и помещали на среду по прописи Мурасиге-Скуга (MS) с половинным содержанием микро- и макросолей и фитогормонами 2,4-Д (6 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). На 20 сутки полученный первичный каллус перенесен на свежую питательную среду. После второго пассажа штаммы пересажены на среды MS с полным содержанием микро - и макросолей и фитогормонами: НУК (1 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). Культивирование осуществляли в темноте, температура 27–28°C, влажность 60–70%. Наблюдали изменение цвета клеток от светло-коричневого до светло-жёлтого. На седьмом пассаже проводили исследование ростовой активности. Кривая роста штамма соответствует основным фазам роста клеточных культур. После двенадцатого пассажа проведен качественный анализ на флавоноиды с помощью тонкослойной хроматографии в тонком слое сорбента. Система растворителей бутанол : ледяная уксусная кислота : вода (4:1:5), детекция в УФ-свете. На хроматограмме испытуемого образца обнаружены восемь пятен желтого и желто-коричневого цвета. Идентифицированы рутин, лутеолин, лутеолин-7-О-гликозид.

### The content of low molecular weight antioxidants in transgenic plants *Nicotiana tabacum* under heavy metal salts conditions

Pristupa K.V., Kukulyanskaya T.A. Khramtsova E.A.  
Belarusian State University, Minsk, Belarus  
E-mail: kristina.pristupa@mail.ru

**Key message.** We were studied several of antioxidants in transgenic *Nicotiana tabacum*, plants cultivated in heavy metal polluted soils. The content of phenolic compounds, vitamins C and E in plants increased under these conditions.

**Keywords:** antioxidant system, low molecular weight antioxidants, *acdS* gene, *Nicotiana tabacum*.

Increase plant resistance to adverse environmental factors is one of the key challenges facing scientists. The intensity of free radical oxidative processes in plants increases under abiotic stress, the non-enzymatic components of the antioxidant defense are activated, and prevent the development of free radical oxidative processes (Ahmad et al., 2008).

In addition, the development of abiotic stress leads to the formation of excess ethylene in plants. One way to reduce it is to create transgenic plants that carry the bacterial *acdS* gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in their genome. This enzyme catalyzes the destruction of the ethylene precursor (Vurukonda et al., 2016).

The goal of research was study the effect of heavy metals in soil on the content of non-enzymatic antioxidants in non-transgenic and transgenic *Nicotiana tabacum* plants carrying the *acdS* gene of bacteria *Pseudomonas putida* B-37.

Plants were divided into 4 series: control series (the soil was not treated with heavy metals); 1 series (soil was treated with  $\text{CuSO}_4$ ); 2 series (soil was treated with  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ); 3 series (soil was treated with  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ). Each series contained non-transgenic and transgenic plants. Soil was treated once; concentration salts in the soil exceeded the maximum permissible 5 times.

The maximum content of phenolic compounds (PC), flavonoids occurred during soil treatment with chromium (VI) ions: in non-transgenic plants the content of PC increased by 80%, the content of flavonoids increased by 153% compared to the control series. The total content of PC and flavonoids in transgenic plants increased by 2.3 and 2.8 times, respectively, compared with the control series.

The content of vitamins C and E in non-transgenic plants increased by 1.9 and 2.1 times, respectively, when  $\text{Cr}^{6+}$  ions were introduced into the soil, and in transgenic plants increased by 2.2 and 2.5 times, respectively, compared with the control series. It was shown that the lowest content of low molecular weight antioxidants in plants was observed in the soil without the introduction of metals. It was established that the least sensitivity of plants to soil contamination with metal salts was detected when lead (II) ions were introduced into the soil.

### Содержание низкомолекулярных антиоксидантов трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях загрязнения почвы солями тяжелых металлов

Приступа К.В., Кукулянская Т.А., Храмова Е.А.  
Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

**Аннотация.** Изучен ряд антиоксидантов трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, выращенных в почве с повышенной концентрацией металлов. При выращивании растений в данных условиях возросло содержание фенольных соединений, витаминов С и Е.

**Ключевые слова:** антиоксидантная система, низкомолекулярные антиоксиданты, *acdS*-ген, *Nicotiana tabacum*.

Повышение устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды является одной из ключевых задач, стоящих перед учеными. При абиотическом стрессе повышается интенсивность свободно радикальных окислительных процессов в растениях, для предотвращения развития которых происходит активация неферментативных компонентов антиоксидантной защиты (Ahmad et al., 2008).

Также развитие абиотического стресса приводит к образованию избыточного количества этилена в растениях. Одним из способов его снижения является создание трансгенных растений, которые несут в своем геноме бактериальный *acdS*-ген, кодирующий 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазу. Данный фермент катализирует разрушение предшественника этилена (Vurukonda et al., 2016).

Целью исследования являлось изучение влияния тяжелых металлов в почве на содержание неферментативных антиоксидантов в нетрансгенных и трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, несущих *acdS*-ген бактерий *Pseudomonas putida* B-37.

Растения были разделены на 4 серии: контрольная серия (почва не обрабатывалась тяжелыми металлами); 1 серия (почва была обработана  $\text{CuSO}_4$ ); 2 серия (почва была обработана  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ); 3 серия (почва была обработана  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ). Каждая серия содержала нетрансгенные и трансгенные растения. Обработку почвы проводили однократно с учетом того, что концентрация солей в почве превышала предельно допустимую в 5 раз.

Максимальное содержание фенольных соединений (ФС), флавоноидов происходило при обработке почвы ионами хрома (VI): в нетрансгенных растениях содержание ФС увеличилось на 80%, содержание флавоноидов – на 153% по сравнению с контрольной серией. Для трансгенных растений общее содержание ФС и флавоноидов выросло в 2,3 и 2,8 раз соответственно по сравнению с контрольной серией. Для нетрансгенных растений наблюдалось увеличение содержания витаминов С и Е в 1,9 и 2,1 раз соответственно при внесении в почву ионов  $\text{Cr}^{6+}$ , а для трансгенных – в 2,2 и 2,5 раз соответственно по сравнению с контрольной серией.

Показано, что наименьшее содержание низкомолекулярных антиоксидантов в растениях наблюдалось в почве без внесения металлов. Установлено, что наименьшая чувствительность растений к загрязнению почвы солями металлов обнаружена при внесении в почву ионов свинца (II).

### Microsymbionts of plants as the models of evolutionary genetics

Provorov N.A., Kimeklis A.K., Chirak E.R., Onishchuk O.P., Kurchak O.N., Andronov E.E.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia

E-mail: provorovnik@yandex.ru

**Key message.** Nodule bacteria are presented as models for developing the major problems of evolutionary genetics – analysis of the trade-off between macro- and microevolution, progressive and adaptive evolution, individual and cooperative adaptations.

**Keywords:** Microbial-plant symbioses, nodule bacteria, macro- and microevolution, progressive (genomic) and adaptive evolution, individual and cooperative adaptations

Microbial-plant symbioses in which bacteria implement nutritional, defensive or regulatory functions are convenient models for developing the basic problems of evolutionary genetics, including trade-off between: a) progressive (genomic) and adaptive evolution; b) macroevolution, speciation and microevolution; c) individual and cooperative adaptations. Using the model systems composed of fast-growing nodule bacteria (*Rhizobiaceae*) and leguminous plants from the galeoid complex (tribes *Fabeae*, *Trifolieae*, *Galegae*), we show that microevolution (emergence of biotypes and symbiotypes during intraspecific sympatric or allopatric divergence) is associated with the disruptive, frequency-dependent and group modes of host-induced natural selection for symbiotic characters encoded by the accessory genome parts. However, speciation and macroevolution are mostly dependent on the sympatric divergence of core genome parts (housekeeping genes). An increased efficiency of cooperative adaptations is, as a rule, associated with a decreased *ex planta* viability of rhizobia, which evolution is based on the “gain-and-loss of genes” strategy. At the early stages of symbiosis evolution, formation of *sym* gene system (*nod* genes for the nodule development; *nif/fix* genes for synthesis of nitrogenase system) was associated with the transition of bacteria from autotrophy to symbiotrophy (transformation of free-living phototrophic N<sub>2</sub> fixers *Rhodospseudomonas* into the primary rhizobia, *Bradyrhizobium*). At the late stages of evolution, bacteria lost the negative symbiotic regulators – genes which restrict the symbiotic activity, but are essential for adaptation to soil niches resulting in formation of secondary rhizobia (e.g., the *Rhizobiaceae*) based on the *sym* gene transfer to various soil and plant-associated bacteria. These processes led to a partial reduction of the bacterial autonomy (formation of the interspecies altruism systems), which can be considered as the first step of their transformation into ammonioplasts, N<sub>2</sub>-fixing organelles of plant cells.

Supported by RSF, grant 19-16-00081.

### Микросимбионты растений как модели эволюционной генетики

Проворов Н.А., Кимеклис А.К., Чирак Е.Р., Онищук О.П., Курчак О.Н., Андронов Е.Е.

ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Клубеньковые бактерии представлены как модели для разработки ключевых проблем эволюционной генетики – соотношения макро- и микроэволюции, прогрессивной и адаптивной эволюции, индивидуальных и кооперативных адаптаций.

**Ключевые слова:** микробно-растительные симбиозы, клубеньковые бактерии, макро- и микроэволюция, прогрессивная (геномная) и адаптивная эволюция, индивидуальные и кооперативные адаптации

Микробно-растительные симбиозы, в которых бактерии выполняют трофические, защитные или регуляторные функции – удобные модели для разработки ключевых проблем эволюционной генетики, включая анализ соотношений: а) прогрессивной (геномной) и адаптивной эволюции; б) макроэволюции, видообразования и микроэволюции; в) индивидуальных и кооперативных адаптаций. С использованием модельных систем, состоящих из различных видов быстрорастущих клубеньковых бактерий (сем. *Rhizobiaceae*) и бобовых растений галегоидного комплекса (трибы *Fabeae*, *Trifolieae*, *Galegae*) показано, что микроэволюция (возникновение биотипов и симбиотипов в ходе симпатрической, либо аллопатрической внутривидовой дивергенции) связано с вызываемым хозяевами деструктивным, частотно-зависимым и групповым отбором по симбиотическим признакам, кодируемым аксессуарной частью генома. Однако видообразование и макроэволюция определяются дивергенцией коровой части генома (генов “домашнего хозяйства”), которая часто носит симпатрический характер. Повышение эффективности кооперативных адаптаций, как правило, сопряжено со снижением жизнеспособности ризобий вне хозяина, в связи с чем их эволюция следует стратегии “приобретения-утраты генов”. На ранних этапах этой эволюции у ризобий произошло становление системы *sym*-генов (*nod*-гены, кодирующие развитие клубеньков; *nif/fix*-гены, кодирующие образование нитрогеназного комплекса), связанное с переходом бактерий от автотрофии к симбиотрофии (образование первичных ризобий, *Bradyrhizobium* на основе свободноживущих N<sub>2</sub>-фиксаторов *Rhodospseudomonas*). На поздних стадиях эволюции в результате переноса *sym*-генов в различные почвенные бактерии возникли вторичные ризобии (например, сем. *Rhizobiaceae*). Для них характерна утрата негативных регуляторов симбиоза – генов, ограничивающих проявление симбиотического потенциала, но важных для адаптации бактерий к почвенным нишам. Эти процессы привели к частичному отказу ризобий от автономного существования (становление систем межвидового альтруизма, связанного с формированием нежизнеспособных бактериоидов), который можно рассматривать как первый этап их трансформации в N<sub>2</sub>-фиксирующие органеллы растительной клетки –аммониопласты.

Работа поддержана РФФИ, грант 19-16-00081.



## The effect of organic fertilizers on the taxonomic composition of microbial communities in agro-soddy-podzolic soils of the middle taiga

Puhalsky Y.V.<sup>1</sup>, Loskutov S.I.<sup>1</sup>, Lapteva E.M.<sup>2</sup>, Vinogradova Yu.A.<sup>2</sup>, Kovaleva V.A.<sup>2</sup>, Perminova E.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>"BioEcoTech" LTD, St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup>IB FRC Komi SC UB RAS, Syktyvkar, Russia

E-mail: puhalskyan@gmail.com

**Key message.** The taxonomic composition of prokaryotes of agro-soddy podzolic soils of the middle taiga and the patterns of its change with the application of various doses of organic fertilizers were studied.

**Keywords:** microbiome, microorganisms, soil, organic fertilizers

Maintaining soil fertility in agroecosystems, especially in the bioclimatic conditions of the North, requires the introduction of mineral and organic fertilizers. This can have both positive and negative effects on the soil microbiota complex. The purpose of this work was to identify the response of the prokaryotic complex of arable soils to the introduction of environmentally friendly doses of peat and manure compost (TNC) in agroecosystems of the middle taiga.

The studies were carried out on arable land, where a long-term field experiment is carried out with the introduction of various doses of fertilizer in the feed crop rotation (Republic of Komi, the vicinity of Syktyvkar, the middle taiga subzone). The objects of the study were microbial communities of arable horizons (0-20 cm) of agro-soddy-podzolic soils of three experimental sites - without fertilizing (control), with TNCs in doses of 40 and 80 t/ha. To study the taxonomic composition of prokaryotes, molecular genetics methods were used.

As the studies showed, the soil microbiome complex was formed mainly by representatives of nine phyla: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycete*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia*. Practically in all microbiome dominated a group of the *Proteobacteria*. Considerable share in communities of arable soils constitute as representatives of groups *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* and *Acidobacteria*. The latter are typical inhabitants of acidic soils, which include the soils studied by us (pH<sub>KCl</sub> ~ 4.2–4.4). Phyla *Chloroflexi* and *Planctomycetes* accounted for about 1%; the number of prokaryotes from the remaining phyla in communities did not reach 1%.

It was revealed that the introduction of organic fertilizers had a mixed effect on different groups of microorganisms. High doses of TNCs (80 t/ha) contributed to a decrease in the proportion (52%) of *Proteobacteria* relative to the control site (58%) and sites with low doses of TNCs (64%). Close patterns were obtained for the microorganisms of phyla *Bacteroidetes*: in the control - 7%, with the introduction of TNCs at a dose of 40 t/ha - 10%, at a dose of 80 t/ha - 5%. At the same time, organic fertilizers stimulated the growth of microorganisms of the phylum *Actinobacteria*, respectively 22% (control), 23% (40 t/ha), 29% (80 t/ha).

The introduction of TNCs contributed to a change in the taxonomic composition of prokaryotes at the class level. In particular, representatives of *Alphaproteobacteria* (32%), *Betaproteobacteria* (19%), and *Gammaproteobacteria* (4%) dominated in the soil of the control plot in the *Proteobacteria* phyla. The soil with the introduction of TNC at a dose of 40 t/ha in phyla *Proteobacteria* to share *Alphaproteobacteria* has 38%, *Betaproteobacteria* - 21%. When TNCs were introduced at a dose of 80t/ha, *Alphaproteobacteria* decreased to 27%, and *Betaproteobacteria* - 16%.

The phyla of *Actinobacteria* in all the soils of the foundation comprise microorganisms of the order *Actinomycetales*, in phylum *Bacteroidetes* - representatives of a class and *Flavobacteria*. Some characteristic representatives of the cultivated part of the microbial communities of the soil — the genera *Burkholderia* and *Pseudomonas* — in the studied microbiomes showed a rather high representation in the analysis of the 16S rRNA gene, but others, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, and *Variovorax*, mainly have small shares in the community.

Thus, the taxonomic composition of prokaryotes in arable soils of agroecosystems was studied for the first time for the Republic of Komi. It was shown that under bioclimatic conditions of the middle taiga in a six-field fodder crop rotation with various doses of organic fertilizers, the most significant effect on the prokaryotic complex is the introduction of large doses of TNCs (80 t/ha). Low doses of TNCs (40 t/ha) contribute to maintaining (with some variation) the number of individual groups of soil microbial communities at the level of control plots (without fertilizing).

The reported study was funded by RFBR and Republic of Komi, project number 20-44-110009-p\_a «Influence of *Heracleum sosnowskyi* invasion on soil fertility and soil microbial communities in postagrogenic ecosystems of the European North-East (on the example of the middle taiga of the Komi Republic)».

## Prospects for the use of unmodified antisense oligonucleotides in the regulation of the synthesis of secondary metabolites of essential oil plants

Puzanova E.V.

FSBSI «Research Institute of Agriculture of Crimea», Simferopol, Crimea

E-mail: 17obruchka@mail.ru

**Key message.** A scheme and basic principles for the use of unmodified antisense oligonucleotides in the agricultural sector as a regulator of the synthesis of secondary metabolites of essential oil plants are developed.

**Keywords:** antisense technologies, secondary metabolites, essential oil plants, synthesis regulation.

Regulation of the synthesis of secondary metabolites with the help of unmodified antisense oligonucleotides (uASO) is a new direction in Plant Biochemistry and Biotechnology, which was initiated by Oberemok et al. (2019). The use of uASO will allow the component composition of essential oil to be changed selectively, according to the needs of different industries. The study is aimed at changing the component composition of essential oil using uASO. The method is based on the suppression of the expression of genes of various synthases by short DNA fragments that block the translation process of one or another part of the uASO gene. Therefore, the duplex *DNA-mRNA* is formed by binding. This duplex prevents biosynthesis of protein, in particular of enzymes involved in biochemical cascades of the synthesis of components of essential oils, either through steric blocking or splitting by RNase-H. The use of DNA fragments is justified by absence of undesirable effects. For example, major RNA fragments are quite long and tend to decompose into small interfering RNAs, which can interact with a wide range of non-target location. Safety also causes the refusal to modify fragments of the active substance, namely to attach various groups to one of the ends, and to change nitrogenous bases and sugar-phosphate backbone. Following a series of tests with different essential oil plants and proving the effectiveness of this method for most cultures, it will become possible to adjust the component composition for pharmacology, cosmetology and perfumery usage. Developments in this direction are of great importance for agriculture for a number of reasons, namely because of low consumption of the active substance of the specimen; unlimited expiration date (subject to storage conditions); high rate of reaching target; uASOs are safe for the environment and all non-target organisms; uASOs that have not reached their unique target are destroyed by cell nucleases; synthesis of nucleic acids is getting cheaper every year. At the moment, the method has already been successfully tested on pepper mint; lavender, thyme, savory and basil are being worked on.

## Перспективы использования немодифицированных антисмысловых олигонуклеотидов в регуляции синтеза вторичных метаболитов эфиромасличных растений

Пузанова Е.В.

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», Симферополь, Крым

**Аннотация.** Разрабатывается схема и основные принципы использования немодифицированных антисмысловых олигонуклеотидов в отрасли сельского хозяйства в качестве регулятора синтеза вторичных метаболитов эфиромасличных растений.

**Ключевые слова:** антисмысловые технологии, вторичные метаболиты, эфиромасличные растения, управление синтезом.

Управление синтезом вторичных метаболитов с помощью немодифицированных антисмысловых олигонуклеотидов (наСО) – новое направление в биохимии и биотехнологии растений, начало которому положила работа Оберемка и соавторов (2019). Использование наСО позволит избирательно изменять компонентный состав эфирного масла под потребности разных отраслей производства. Целью данного исследования является изменение компонентного состава эфирного масла с помощью наСО. В основе метода лежит подавление экспрессии генов различных синтаз короткими фрагментами ДНК, блокирующими процесс трансляции того или иного участка гена. наСО, связываясь с мРНК образует дуплекс «ДНК-мРНК», который либо путем стерического блокирования, либо путем расщепления РНКазой-Н препятствует биосинтезу белка, в частности, ферментов участвующих в биохимических каскадах синтеза компонентов эфирных масел. Применение ДНК-фрагментов оправдано отсутствием нежелательных эффектов. Так, например, известные РНК-фрагменты, имеющие большую длину, имеют свойство распадаться на малые интерферирующие РНК, которые могут взаимодействовать с большим спектром нецелевых объектов. Безопасность обуславливает и отказ от модификации фрагментов активного вещества: присоединения различных групп к одному из концов, изменения самих азотистых оснований и сахаро-фосфатного остова. После проведения ряда испытаний с разными эфиромасличными растениями и доказательства эффективности данного метода для большинства культур станет возможным подстраивать компонентный состав под использование в фармакологии, косметологии и парфюмерии. Разработки в этом направлении имеют высокую значимость для сельского хозяйства по ряду причин: малый расход действующего вещества препарата; неограниченный срок годности (при соблюдении условий хранения); высокая таргетность; наСО безопасны для окружающей среды и всех нецелевых организмов; наСО, не достигшие своей уникальной мишени, разрушаются нуклеазами клетки; синтез нуклеиновых кислот удешевляется с каждым годом. На данный момент метод уже успешно апробирован на перечной мяте, ведутся работы на лаванде, тимьяне, чабре и базилике.

### Bioengineering of archaeal flagella

Pyatibratov M.G.<sup>1</sup>, Syutkin A.S.<sup>1</sup>, Beznosov S.N.<sup>1</sup>, Galeva A.V.<sup>1</sup>, Shchyogolev S.Yu.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia; <sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia; <sup>3</sup>Saratov National Research State University named after N.G. Chernyshevsky, Saratov, Russia  
E-mail: bratov@vega.protres.ru

**Key message.** It was shown that the *Haloferax volcanii* flagella assembly system can accept alien flagellins and build functional recombinant flagella. The results can be used for targeted flagella modification to create multifunctional nanomaterials.

**Keywords:** halophilic archaea, flagellin, archaellin, gene expression, protein engineering

Bacterial and archaeal flagellins are remarkable for the presence of a highly conserved region (N- and C-termini) responsible for the polymerization properties and hypervariable regions in the central part of the molecule that forms the surface determinants of the flagellum. The presence of hypervariable sites makes flagella convenient objects of bioengineering, making it possible to create matrices for binding appropriate ligands. These variable flagellin parts can be modified by peptide inserts with high affinity for the selected ligand. As a result, an ordered arrangement of the ligand on the biopolymer matrix is achieved, and nanostructured materials with desired (conductive, magnetic, catalytic, sorption, etc.) properties can be obtained. Increased resistance to denaturing agents gives archaeal flagella (archaella) significant advantages over bacterial counterparts. Earlier we first constructed *Halobacterium salinarum* flagella modified with peptide inserts and synthesized nanomaterials with useful properties on their basis. We are currently working with the *Haloferax volcanii* strain, for which the most advanced haloarchaea system for genetic manipulation and protein expression has been developed. The aim of our study is to obtain *Hfx. volcanii* strains producing recombinant flagella formed from modified flagellins and flagellins of other haloarchaea. Using heterologous expression, we obtained *Hfx. volcanii* strains synthesizing functional flagella from flagellins of two distantly related archaeal species (*Halorubrum lacusprofundi* and *Hbt. salinarum*). To find out the roles of individual flagellins, we expressed the *Hrr. lacusprofundi* (*flaB1*, *flaB2*) and *Hbt. salinarum* (*flgA1*, *flgA2*) flagellin genes in the *Hfx. volcanii* strain in which the endogenous flagellin genes were deleted. Six *Hfx. volcanii* strains expressing the *Hrr. lacusprofundi* and *Hbt. salinarum* single flagellin genes or an operone from two genes produced functional filaments consisting of only one or both flagellins. All recombinant *Hfx. volcanii* strains were motile, although significant differences were observed in motility efficiency. Recombinant filaments in structure and stability were similar to natural *Hrr. lacusprofundi* and *Hbt. salinarum* flagella. Electron microscopy showed that both FlaB1/FlaB2 and FlgA1/FlgA2 flagella look like typical supercoiled filaments, while the shape of one-component flagella is more variable. The heteropolymeric *Hrr. lacusprofundi* filaments have greater thermal stability and are more resistant to low salinity than single-component filaments. This shows that the thermal stability of these flagella depends on the presence of both flagellin types and indicates a close interaction between these subunits in the supramolecular structure. Functional spiral *Hrr. lacusprofundi* flagellum can consist of only one flagellin: FlaB2 or FlaB1, however, two different flagellins in combination provide additional stabilization of the flagellum structure, and, thus, adaptation to a wider range of external conditions. In the case of recombinant *Hbt. salinarum* filaments FlgA1/FlgA2, we did not observe significant differences in their thermal stability in comparison with single-component recombinant filaments. Previously, the experiments on *Hbt. salinarum* strains with deleted flagellin genes demonstrated that filaments consisting only of FlgA1 (FlgA2) lose their functionality. Our results may indicate the influence of the genomic context, post-translational modifications, and other features of the host cell on the functional flagella assembly. Thus, we first showed that the *Hfx. volcanii* flagella assembly system can accept alien flagellin genes and build functional recombinant flagella. By combining various flagellin types we can change the physical properties of synthesized filaments. Using 3D molecular modeling predictions and subsequent experimental verification we selected two optimal sites in the *Hbt. salinarum* archaellin for insertions of peptide sequences giving the archaella new properties for their use in creating nanomaterials with targeted properties. The results can clarify the general principles of the formation of macromolecular assemblies on cell surfaces and will be used in flagella bioengineering.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 19-04-00613 A).

### Culture *in vitro* of rare and endemic species of *Allium* (*A. ledebourianum*, *A. altaicum*)

Raizer O.B., Khapilina O.N.

RSE "National Center for Biotechnology", Nur-Sultan, Kazakhstan

E-mail: 2008olesya@mail.ru, oksfur@mail.ru

**Key message.** Rare and endemic *Allium ledebourianum* and *Allium altaicum* were introduced into the culture *in vitro*. When cultivated under conditions of slight osmotic stress, viable cultures of rare and endangered *Allium* species were obtained.

**Keywords:** *Allium* sp., endemic, *in vitro* culture, regenerant plant

The reduction in wild populations of rare and endemic species *A. altaicum* and *A. ledebourianum* is a threat to the reproduction of natural ecosystems. The use of biotechnology methods is most optimal in preserving these endemic plants *ex situ*.

Explants of endemic *Allium* species were cultured by selecting different plant growth regulators, a nutrient medium for stimulating apical and lateral buds, formation of adventitious shoots, and rhizogenesis *in vitro*. As explants, regenerated plants with formed microbulbs were used, in which adventitious shoots and roots were previously decapitated.

The development of plants of both types of *Allium in vitro* culture did not occur uniformly under different conditions. Significant differences were observed in the number of stems, the diameter of the bulbs and the characteristics of rhizogenesis. After 6 months of continuous cultivation *in vitro*, the average number of stems per plant in all variants of the growth medium varied from 1 to 3.2 pcs.; the number of leaves was 1.4-3.9 pcs., the maximum length of the leaves was 13.3 cm, the minimum value was 5.3 cm. The number and length of roots varied from 5.3 to 11 pcs. and from 3.1 to 13.7 cm, respectively. Also, for both plant species of *Allium*, the formation of long and spiral-twisted roots was noted, the length of which increased significantly during cultivation in a neutral regime (with the addition of a sorbent). An analysis of the dynamics of the development of regenerants showed that cultivation under osmotic stress conditions in the presence of growth regulators is the optimal regime for both species of *Allium*.

This provides an insignificant increase of growth leaves and roots, as well as an increase in microbulbs, which allows both microclonal propagation of endemic species and transfer of plants to *ex vitro* conditions for further adaptation to natural habitat conditions.

### Культура *in vitro* редких и эндемичных видов лука (*A. ledebourianum*, *A. altaicum*)

Раїзер О.Б., Хапилина О.Н.

РГП «Национальный центр биотехнологии», г. Нур-Султан, Казахстан

**Аннотация:** Введены в культуру *in vitro* редкие и эндемичные виды лука (*Allium ledebourianum*, *Allium altaicum*). При культивировании в условиях незначительного осмотического стресса, получены жизнеспособные культуры редких и исчезающих видов лука.

**Ключевые слова:** *Allium* sp., эндемик, культура *in vitro*, растение-регенерант

Сокращение популяций редких и эндемичных видов лука алтайского (*A. altaicum*) и лука Ледебура (*A. ledebourianum*) представляет угрозу для воспроизводства природных экосистем. Использование методов биотехнологии является наиболее оптимальным в сохранении эти эндемичных растений *ex situ*.

Культивирование эксплантов эндемичных видов лука проводили путем подбора состава гормональных факторов питательной среды, стимулирующих рост апикальных и боковых почек, формирование адвентивных побегов, ризогенез в условиях *in vitro*. В качестве эксплантов использовали растения-регенеранты со сформированными микролуковицами, у которых предварительно была проведена декапитация адвентивных побегов и корней.

Развитие растений обоих видов луков в культуре *in vitro* происходило неравномерно в условиях различных режимов. Наибольшие отличия наблюдали в количестве стеблей, диаметре луковиц и особенностях ризогенеза. По истечении 6 месяцев непрерывного культивирования среднее количество стеблей на всех вариантах среды варьировало от 1,0 до 3,2 шт. на эксплант; количество листьев на одно растение 1,4-3,9 шт., максимальная длина листьев была- 13,3 см, минимальное значение – 5,3 см. Количество и длина корней варьировали от 5,3 до 11 шт. и от 3,1 до 13,7 см соответственно. Также было отмечено у обоих видов лука формирование длинных, спиралевидно-закрученных корней, длина которых значительно нарастала по мере культивирования при культивировании в нейтральном режиме (с добавлением сорбента).

Анализ динамики развития регенерантов показал, что для обоих видов лука оптимальным режимом является культивирование в условиях слабого осмотического стресса в присутствии регуляторов роста. Это обеспечивает незначительный прирост листьев и корней, а также прирост микролуковиц, что позволяет проводить как микроклональное размножение эндемиков, так и перенос растений в условия *ex vitro* для дальнейшей адаптации к естественным условиям местообитания.

### New bacterial strains *Pseudomonas*, promising for agricultural biotechnology

Rafikova G.F., Kuzina E.V.

Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: rgf07@mail.ru

**Key message.** The bacteria *P. laurentiana* AHT 17 and *P. laurentiana* AHT 56 have plant-beneficial properties: its exhibit antagonistic activity against phytopathogenic micromycetes, are capable of decomposing phosphates and synthesizing phytohormones.

**Keywords:** *Pseudomonas laurentiana*, antifungal activity, indolylacetic acid, cytokinins

In recent years, much attention has been paid to the search for alternative environmentally friendly means for protecting plants and increasing their productivity, among which biological preparations based on rhizospheric microorganisms occupy a separate niche, which can promote plant growth using a wide variety of mechanisms: synthesis of phytohormones, solubilization of phosphates, production of siderophores, manifestations of antifungal activity, etc.

The purpose of this work was to study the complex of plant-beneficial properties in new bacterial strains of *Pseudomonas laurentiana*.

The presence of antagonism in relation to phytopathogenic fungi was detected by the method of joint growth of bacteria and phytopathogenic micromycetes in Petri dishes; ability to synthesize siderophores - by comparing the antagonistic activity of bacteria on King B medium in the absence of iron and with the addition of FeCl<sub>3</sub>; the ability to synthesize phytohormones - using enzyme immunoassay; phosphate mobilizing activity - during the cultivation of bacteria on Pikovskaya medium.

As a result of the studies, it was shown that the studied bacterial strains suppress the development of phytopathogenic fungi of the genera *Bipolaris* and *Fusarium*, the largest diameter of growth suppression zones (up to 26 mm) was noted for phytopathogens *B. sorokiniana* and *F. semitectum*. The introduction of iron into the nutrient medium did not lead to a change in the antifungal activity of bacterial strains, i.e. the antifungal properties of crops are determined not by the synthesis of siderophores, but probably by antibiotic substances. Both strains of *P. laurentiana* AHT 17 and *P. laurentiana* AHT 56 were capable of synthesizing indolyl-3-acetic acid in the amount of 804 and 166 ng / ml of culture fluid, respectively. The bacterial strain *P. laurentiana* AHT 56 is also a producer of cytokinins. These bacterial strains showed the presence of mobilizing activity against inorganic phosphates.

Thus, the strains of *P. laurentiana* AHT 17 and *P. laurentiana* AHT 56 have a complex of properties that are useful for plant growth and development. In particular, they exhibit antifungal activity against a large number of phytopathogenic micromycetes, capable of decomposing phosphates and synthesizing phytohormonal substances.

### Новые штаммы рода *Pseudomonas*, перспективные для сельскохозяйственной биотехнологии

Рафикова Г.Ф., Кузина Е.В.

Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, Россия

**Аннотация.** Бактерии *P. laurentiana* AHT 17 и *P. laurentiana* AHT 56 обладают полезными для растений свойствами: проявляют антагонистическую активность в отношении фитопатогенных микромицетов, способны к разложению фосфатов и синтезу фитогормонов.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas laurentiana*, антигрибная активность, индолилуксусная кислота, цитокинины

В последние годы большое внимание уделяется поиску альтернативных экологически безопасных средств для защиты растений и увеличения их продуктивности, среди которых отдельную нишу занимают биологические препараты на основе ризосферных микроорганизмов, которые могут способствовать росту растений с помощью самых разнообразных механизмов: синтеза фитогормонов, солубилизации фосфатов, продуцирования сидерофоров, проявления антигрибной активности и др.

Целью данной работы явилось изучение комплекса полезных для растений свойств у новых штаммов бактерий *Pseudomonas laurentiana*.

Наличие антагонизма в отношении фитопатогенных грибов выявляли методом совместного выращивания бактерий и фитопатогенных микромицетов в чашках Петри; способности к синтезу сидерофоров – путем сравнения антагонистической активности бактерий на среде Кинг Б в отсутствие железа и при добавлении FeCl<sub>3</sub>; способности к синтезу фитогормонов - с помощью иммуноферментного анализа; фосфатмобилизирующей активности – при культивировании бактерий на среде Пиковской.

В результате проведенных исследований было показано, что изучаемые штаммы бактерий подавляют развитие фитопатогенных грибов родов *Bipolaris* и *Fusarium*, наибольший диаметр зон подавления роста (до 26 мм) был отмечен для фитопатогенов *B. sorokiniana* и *F. semitectum*. Внесение железа в питательную среду не приводило к изменению антигрибной активности штаммов бактерий, т.е. антигрибные свойства культур определяются синтезом не сидерофоров, а, вероятно, веществ антибиотической природы. Оба штамма *P. laurentiana* AHT 17 и *P. laurentiana* AHT 56 обладали способностью к синтезу индолил-3-уксусной кислоты в количестве 804 и 166 нг/мл культуральной жидкости соответственно. Штамм бактерий *P. laurentiana* AHT 56 также является продуцентом цитокининов. У данных штаммов бактерий установлено наличие мобилизирующей активности в отношении неорганических фосфатов.

Таким образом, штаммы *P. laurentiana* AHT 17 и *P. laurentiana* AHT 56 обладают комплексом полезных для роста и развития растений свойств. В частности, они проявляют антигрибную активность в отношении большого количества фитопатогенных микромицетов, способны к разложению фосфатов и синтезу фитогормональных веществ.

**Biotechnology for production of recombinant hybrid proteins from plants and microbes with antifungal activity**

Rogozin E.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia; Institute of Ecological and Agricultural Biology (X-Bio) Tyumen State University, Tyumen, Russia  
E-mail: rea21@list.ru; globodera@gmail.com

**Key message.** The principle of obtaining recombinant antimicrobial polypeptides from plant and microbial origins as a part of chimeric proteins with thioredoxin by heterologous expression in a prokaryotic system is presented. The results obtained in terms of their antifungal activity in relation to plant pathogenic micromycetes allow us to consider these compounds as prototypes of some active substances of environmentally friendly biofungicides, as well as possible components of hybrid plant protection products against fungal diseases.

**Keywords:** antimicrobial peptides, recombinant hybrid proteins, antifungal activity, natural sources, biological plant protection.

It is well known that the main way to limit the spread of diseases of cultivated plants caused by plant pathogenic microorganisms is usage of chemical plant protection products, many of which are currently ineffective because of resistance to them, in addition, they have a number of limitations in their ecotoxicological component. Background of these problems, the biological method comes to the fore as one of the ways to solve the indicated limitations, as well as increasing the degree of greening of crop production. In the traditional aspect, the biometod in plant protection from diseases is an application of antagonistic microorganisms (bacteria, actinomycetes, fungi) to the corresponding plant pathogens, while in the overwhelming majority of cases, molecular tools and mechanisms of such action remain outside the scope of attention: the achievement of the expected effect. However, in recent years, the emphasis has focused more on the study of the composition of biologically active metabolites, including those with antimicrobial properties. It was previously shown that the antimicrobial peptides from plants and certain microorganisms are a competitive alternatives to many active substances of fungicides and antibiotics used in agriculture, but it is no secret that the prospects for their commercialization are faced with a number of limitations, in particular, due to the potential high cost of production and, as a result, the selling price. Our approach is based on production of target active peptides in recombinant form through microbiological synthesis in a prokaryotic expression system; the active compound is integrated in the composition of the chimeric protein in combination with the so-called "anchor protein" - thioredoxin. In a series of comparative experiments to determine the antifungal activity of such chimeric, or hybrid, proteins with respect to single peptides, they showed their ability to inhibit phytopathogens. Thus, recombinant hybrid proteins containing an antimicrobial component of originally natural origin can be considered as prototypes of the active substances of "new generation" biofungicides, the cost of production of which will be significantly reduced relative to peptides.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant № 18-34-20058-mol\_a\_ved).

**Биотехнология получения рекомбинантных гибридных белков растений и микроорганизмов с антифунгальными свойствами**

Рогозин Е.А.

ФГБНУ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; ФГБУ «Научно-исследовательский Институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва, Россия; Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (X-Bio), Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

**Аннотация.** Представлен принцип получения рекомбинантных антимикробных полипептидов растительного и микробного происхождения в составе химерных белков с тиоредоксином путем гетерологической экспрессии в прокариотической системе. Полученные результаты по уровню их антифунгальной активности по отношению к фитопатогенным микромицетам позволяют рассматривать данные соединения как прототипы действующих веществ экологически безопасных биофунгицидов, а также в качестве возможных компонентов гибридных средств защиты растений от грибных болезней.

**Ключевые слова:** антимикробные пептиды, рекомбинантные гибридные белки, антифунгальная активность, природные источники, биологическая защита растений.

Хорошо известно, что основным способом ограничения распространения болезней культурных растений, вызываемых фитопатогенными микроорганизмами, является применение химических средств защиты растений, многие из которых в настоящее время малоэффективны по причине возникновения к ним резистентности, кроме того, они имеют ряд ограничений по своей экотоксикологической составляющей. На фоне указанных проблем биологический метод выходит на первый план как один из способов решения обозначенных ограничений, а также повышения степени экологизации продукции растениеводства. В традиционном понимании биометод в защите растений от болезней – это, как правило, применение микроорганизмов-антагонистов (бактерий, актиномицетов, грибов) соответствующим фитопатогенам, при этом в подавляющем большинстве случаев молекулярные инструменты и механизмы такого действия остаются за пределами внимания: определяющим является достижение ожидаемого эффекта. Однако в последние годы акцент в большей степени концентрируется на исследовании состава биологически активных метаболитов, в том числе обладающих антимикробными свойствами. Ранее показано, что антимикробные пептиды растений и некоторых микроорганизмов представляют собой конкурентную альтернативу многим действующим веществам фунгицидов и антибиотиков, применяемых в сельском хозяйстве, однако не секрет, что перспективы их коммерциализации сталкиваются с рядом ограничений, в частности, по причине потенциальной высокой стоимости производства и, как следствие, отпускной цены. Предлагаемый нами подход основан на производстве целевых активных пептидов в рекомбинантной форме посредством микробиологического синтеза в прокариотической системе экспрессии; при этом активный компонент интегрирован в составе химерного белка в комплексе с так называемым «якорным белком» - тиоредоксином. В серии сравнительных экспериментов по определению антифунгальной активности таких химерных, или гибридных, белков относительно только одних пептидов показало наличие у них свойств ингибировать фитопатогены. Таким образом, рекомбинантные гибридные белки, содержащие в своем составе антимикробный компонент изначально природного происхождения, можно рассматривать как прототипы действующих веществ биофунгицидов «нового поколения», себестоимость производства которых будет значительно снижена относительно пептидов. Данная работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-34-20058-мол\_a\_ved).

## Lessons of studies of karyotypic and genomic evolution in animals, application of developed technique in the studies of karyotype and genome organization in plants

Rubtsov N.B.

The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia, Novosibirsk; Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk  
E-mail: rubt@bionet.nsc.ru

**Key message.** The present report is devoted to analysis of results obtained with modern molecular and molecular-cytogenetic methods in studies of karyotype and genome organization in various animal species. Perspectives of their application for the study of karyotype and genome organization in plants are considered and discussed.

**Keywords:** microdissected DNA libraries, FISH, DNA sequencing, 3D-microscopy

Development of methods used in chromosome and genome analysis in animals and plants differ significantly. Possibility of their application depends on many genome features including the genome size. Experimental approach earlier successfully applied for unusual examples of organization and evolution in animals belonged to the species from different phylogenetic lines characterized with contrast genome size should be considered for their application in studies of plant karyotypes and genomes.

In the report, our experience in generation of microdissected DNA libraries and DNA probes derived from metaphase chromosomes and their regions, 2D- and 3D-FISH, 3D microscopy, sequencing of microdissected DNA libraries in species differed according to their genome size was considered.

Molecular and molecular-cytogenetic analysis of genome organization and evolution in some species from *Macrostomum* genus revealed recent whole genome duplication followed with genome rediploidization accompanied with karyotypic and genome instability included high frequency of aneuploidy, structural chromosome rearrangements, repetitive DNA amplification, and B chromosome appearance. Genome size of these species is much smaller than in humans.

The study of genomes in songbirds discovered directed elimination of the large genome part in the majority of the cells. One of the large chromosomes is present only in the germline cells (Germline-Restricted Chromosome - GRC). In some songbirds, the GRC behavior in meiosis was described and microdissected DNA libraries derived from the GRCs were generated and sequenced. Genome size of the songbirds is a little smaller than in human.

DNA content of the B chromosomes and their location in 3D interphase nuclei was analyzed in two species of mice from *Apodemus* genus. Mechanisms of the B chromosome appearance, neo-sex chromosomes formation and their further evolution were investigated in some grasshopper species in which the genome size much large than human genome.

The possibility of application of the methods used in these studies in investigation of plant genomes is considered and discussed.

### Опыт изучения эволюции кариотипа и генома животных, возможность использования апробированных подходов для изучения кариотипов и геномов растений

Рубцов Н.Б.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия; Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

**Аннотация:** В настоящая работа посвящена анализу результатов использования современных молекулярных и молекулярно-цитогенетических методов изучения кариотипов и геномов разных видов животных. Рассмотрены возможности их использования для изучения кариотипов и геномов разных видов растений.

**Ключевые слова:** микродиссекционные ДНК-библиотеки, FISH, ДНК секвенирование, 3D-микроскопия.

Развитие методов геномного и хромосомного анализ в исследованиях у растений и животных значительно отличается. Возможность их использования в значительной степени зависит от размера генома изучаемого вида. Представляется актуальным рассмотреть экспериментальные подходы, использованные для изучения необычных вариантов организации и эволюции геномов видов животных из разных филогенетических линий, геномы которых по размеру близки как небольшим геномам растений, так и геномам, размер которых близок к максимальному, оценить возможность их применения в исследования геномов растений.

В работе рассмотрен наш опыт получения и использования микродиссекционных ДНК-библиотек и ДНК-проб из хромосом и хромосомных районов разных видов, проведения 2-х и 3-х мерной FISH, 3D-микроскопии, секвенирования микродиссекционных ДНК-библиотек у видов, значительно отличающихся по размеру генома.

Анализ организации и эволюции генома нескольких видов макростомид, выявил недавно прошедшую полногеномную дупликацию с последующей редиплоидизацией генома, сопровождающейся различным уровнем геномной нестабильности, выраженном у разных видов в высокой частоте анеуплоидии, структурных хромосомных перестройках, амплификации повторенных последовательностей и возникновении В-хромосом. Размер генома этих видов в несколько раз меньше генома человека.

Изучение генома певчих птиц обнаружило направленную элиминацию части генома в большинстве клеток организма. Одна из самых крупных хромосом сохраняется только в клетках зародышевой линии. Проведен анализ поведения этой хромосомы в мейозе, у нескольких видов секвенированы микродиссекционные ДНК-библиотеки, полученные из таких хромосом. По размеру геном певчих птиц лишь ненамного уступает геному человека.

Проведен анализ состава ДНК и локализация в интерфазном ядре В-хромосом у двух видов мышей рода *Apodemus*. Проведено изучение механизма возникновения В-хромосом и новой системы половых хромосом у нескольких видов саранчовых, размер генома у которых в несколько раз превышает размер генома человека.

Рассмотрены возможности применения использованных методов при изучении организации и эволюции геномов у растений.



## Production and analysis of tomato *Solanum lycopersicum* composite plants carrying the genes of pea *Pisum sativum* receptors to rhizobial signaling molecules

Rudaya E.S., Dolgikh E.A.

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia

E-mail: rudaya.s.e@gmail.com

**Key message.** The interaction of composite tomato plants carrying constructs with pea genes encoding receptors to Nod factors, with nitrogen-fixing bacteria rhizobia was investigated.

**Keywords:** legume-rhizobial symbiosis, receptor-like kinases, Nod factors, composite tomato plants

The ability to fix atmospheric nitrogen by non-legume plants reveals new perspectives for the establishment of an effective farming without using of chemical fertilizers. The most important in this process may be the possibility of acquiring by non-legume plants the capability to perceive the signal molecules of nitrogen-fixing bacteria rhizobia and transduce the signal, that important for mutual recognition of partners. Thereby, the aim of this work was to study the influence of genes of legume plant pea of *Pisum sativum* L., encoding receptors to signal molecules Nod factors and the main regulators of signaling pathway, on the ability of transgenic and composite plants of *Solanum lycopersicum* tomato cv. Carmello to interact with rhizobia.

Composite plants containing the genetic constructs with sequences of genes encoding pea receptors SYM10 and K1, as well as the transcription factor NIN, under control of the constitutive promoter pCaMV35S and tissue-specific promoter pS $IEXT1$  of tomato extensin gene were obtained using agrobacterial transformation with *Agrobacterium rhizogenes*. The efficiency of the distribution of rhizobia in the plants root tissues was checked in 21 day after inoculation with the labelled *Rhizobium leguminosarum* CIAM1026 strain. The efficiency of gene transfer after transformation was verified by PCR analysis using as matrix the DNA and mRNA isolated from tomato transgenic roots, in 1 and 3 weeks after inoculation. In transgenic roots the expression of the *PsSym10* and *PsK1* genes cloned under the pS $IEXT1$  promoter was increased in 1 week after inoculation compared with the control transgenic tomato roots without inoculation. Stimulation of the *PsSym10* and *PsK1* gene expression may be connected with rhizobial inoculation, while the pS $IEXT1$  promoter is activated by ethylene.

The work was supported by RSF16-16-10043

## Получение и анализ композитных растений томатов *Solanum lycopersicum*, несущих гены рецепторов гороха *Pisum sativum* к сигнальным молекулам ризобий

Рудая Е.С., Долгих Е.А.

ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

**Аннотация.** В работе было изучено взаимодействие композитных растений томата, несущих конструкции с генами, кодирующими рецепторы гороха к Nod-факторам, с азотфиксирующими бактериями ризобиями.

**Ключевые слова:** бобово-ризобийный симбиоз, рецептор-подобные киназы, Nod-факторы, композитные растения томата

Способность к фиксации атмосферного азота у небобовых растений открывает новые перспективы в становлении эффективного земледелия без использования химических удобрений. Важным в этом процессе является возможность приобретения небобовыми растениями способности к рецепции сигнальных молекул азотфиксирующих бактерий ризобий и дальнейшей передаче сигнала, что лежит в основе узнавания партнеров. В связи с этим, целью данной работы стало изучение влияния генов бобового растения гороха *Pisum sativum* L., кодирующих рецепторы к сигнальным молекулам Nod-факторам и основные регуляторы сигнального пути, на способность трансгенных и композитных растений томата *Solanum lycopersicum* cv. Carmello взаимодействовать с ризобиями.

Методом агробактериальной трансформации с помощью *Agrobacterium rhizogenes* были получены композитные растения, содержащие генетические конструкции с последовательностями генов, кодирующих рецепторы гороха SYM10 и K1, а также транскрипционный фактор NIN, под конститутивным промотором pCaMV35S и тканеспецифичным промотором pS $IEXT1$  гена экстенсина томата. Через 21 день после инокуляции меченым штаммом *R. leguminosarum* CIAM1026 у растений проверяли эффективность распространения ризобий в тканях корня. Эффективность переноса генов после трансформации проверяли посредством ПЦР-анализа на матрице ДНК и мРНК, выделенных из трансгенных корней томата, через 1 и 3 недели после инокуляции. В трансгенных корнях томата экспрессия генов *PsSym10* и *PsK1*, клонированных под промотором pS $IEXT1$ , на 1 неделе после инокуляции оказалась выше, чем в контроле без инокуляции. Стимуляция экспрессии генов *PsSym10* и *PsK1*, может быть ответом на инокуляцию ризобиями, поскольку промотор активируется в ответ на этилен.

Работа была поддержана грантом РФФИ 16-16-10043.



### Role of the *Stagonospora nodorum* effector SnTox3 in regulation of cytokinins synthesis and metabolism in infected wheat plants

Rumyantsev S.D., Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Burkhanova G.F.

Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: rumyantsev-serg@mail.ru

**Key message.** The effect of the *Stagonospora nodorum* effector SnTox3 on the biosynthesis and metabolism of cytokinins of host plant was studied. The SnTox3 effector influenced the biosynthesis of cytokinins along an ethylene-dependent and ethylene-independent pathway.

**Keywords:** *Stagonospora nodorum*, *Triticum aestivum*, pathogen effector SnTox3, ethylene, cytokinins.

The most important virulence factors of the *Stagonospora nodorum* are multiple fungal necrotrophic effectors (NEs). The SnTox3 pathogen effector interacts with the matching product of host susceptibility gene *Snn3-B1*. This interaction leads to activation of the biosynthesis and signaling pathway of ethylene, the change in redox-status of plant and the development of infection on wheat leaves. It is assumed that mechanism of the ethylene signaling pathway suppression is associated with activation of the cytokinin signaling pathway. The interaction of two phytohormones - cytokinins (CK) and ethylene - in the wheat - *S. nodorum* pathosystem is being studied for the first time. The aim of the work was to study the role of NE SnTox3 and ethylene in the regulation of CK synthesis and metabolism in wheat plants infected with *S. nodorum*. The objects of the study were two cultivars of soft spring wheat (*Triticum aestivum* L.) contrasting in resistance to *S. nodorum*: susceptible cv. Zhnitsa (*Snn3*<sup>+</sup>) and resistant cv. Omskaya 35 (*snn3*<sup>-</sup>) and two isolates of the fungus *S. nodorum*: Sn4VD (Tox3<sup>+</sup>) and SnB (Tox3<sup>-</sup>). We analyzed the transcriptional activity of genes responsible for CK biosynthesis and metabolism (*TalPT*, *TaZOG*, *TaGLU*, *TaCKX*) by real-time PCR. The content of CK various forms in infected plants was assayed by means of ELISA using specific antibodies. CK were previously separated by thin-layer chromatography. Our results showed that an increase in the content of CK active forms during the development of resistance reaction occurred due to the CK synthesis *de novo*, release from bound forms and the decrease in their oxidative degradation. The decrease in the total content of CK active forms during the development of the susceptibility reaction (*Snn3-B1*-SnTox3) occurred due to a greater extent to glucosylation reaction, i.e. the translation of active forms into bound ones and due to the oxidative degradation of CK and the inhibition of CK biosynthesis. While effect of ethylene on CK biosynthesis was determined by the gene-for-gene interaction and NE SnTox3, and effect of ethylene on CK metabolism (glucosylation and oxidative degradation) was independent of NE SnTox3. This work was supported by State Project no. 0246-2018-0035 and the RFBR project no. 18-04-00978.

### Роль эффиктора *Stagonospora nodorum* SnTox3 в регуляции синтеза и метаболизма цитокининов в инфицированных растениях пшеницы

Румянцев С.Д., Веселова С.В., Нужная Т.В., Бурханова Г.Ф.

Институт биохимии и генетики ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

**Аннотация.** Исследовано влияние эффиктора *Stagonospora nodorum* SnTox3 на биосинтез и метаболизм цитокининов растения-хозяина. Эффиктор SnTox3 оказывал влияние на биосинтез цитокининов по этилен-зависимому и этилен-независимому пути.

**Ключевые слова:** *Stagonospora nodorum*, *Triticum aestivum*, эффиктор патогена SnTox3, этилен, цитокинины.

Важнейшим фактором вирулентности возбудителя септориоза пшеницы *Stagonospora nodorum* Berk. являются многочисленные некротрофные эффикторы (НЭ) гриба. Эффиктор патогена SnTox3 взаимодействует с продуктом гена восприимчивости хозяина *Snn3-B1*, что ведет к активации биосинтеза и сигнального пути этилена, изменению редокс-статуса растения и развитию инфекции на листьях пшеницы. Предполагается, что механизм подавления сигнального пути этилена связан с активацией цитокининового сигнального пути. Взаимодействие двух фитогормонов – цитокининов (ЦК) и этилена - в патосистеме пшеница - *S. nodorum* изучается впервые. Цель работы состояла в исследовании роли НЭ SnTox3 и этилена в регуляции синтеза и метаболизма ЦК в инфицированных *S. nodorum* растениях пшеницы. В работе использовано два штамма *S. nodorum* SnБ (экспрессирующий SnTox3) и Sn4ВД (неэкспрессирующий SnTox3), и два контрастных по устойчивости сорта мягкой яровой пшеницы *Triticum aestivum*: восприимчивый - Жница (*Snn3*<sup>+</sup>) и устойчивый - Омская35 (*snn3*<sup>-</sup>). С помощью метода ПЦР в режиме реального времени исследована экспрессия генов ответственных за биосинтез и метаболизм ЦК (*TalPT*, *TaZOG*, *TaGLU*, *TaCKX*). С помощью иммуноферментного анализа с использованием специфических антител определено содержание различных форм ЦК в инфицированных растениях, предварительно разделенных с помощью тонкослойной хроматографии. Наши результаты показали, что увеличение содержания активных форм ЦК при развитии реакции устойчивости происходило за счет синтеза ЦК *de novo*, высвобождения из связанных форм и уменьшения их окислительного распада. Уменьшение суммарного содержания активных форм ЦК при развитии реакции восприимчивости (*Snn3-B1*-SnTox3) происходило в большей степени за счет реакции глюкозилирования, т.е. перевода активных форм в связанные, за счет реакции окислительного распада ЦК и подавления синтеза ЦК. При этом влияние этилена на биосинтез ЦК определялось взаимодействием ген-на-ген и НЭ SnTox3, а влияние этилена на метаболизм ЦК (глюкозилирование и окислительный распад) не зависело от НЭ SnTox3.

Работа выполнена в рамках госзадания № 0246-2018-0035 и при финансовой поддержке РФФИ №18-04-00978.

## Studying the kinetics of salicin hydrolysis in an acidic environment

Sabutova A.B.

Ugra State University, Khanty-Mansiysk, Russia

E-mail: [sabutovaa@mail.ru](mailto:sabutovaa@mail.ru)

**Key message.** The work is devoted to the study of the kinetics of the hydrolysis of salicin in aqueous solutions. To determine salicin in the objects of study, the HPLC method was used. During the study, it was found that the hydrolysis of salicin occurs only in aqueous solutions of strong acids.

**Keywords:** salicin, aspen, glycosides, hydrolysis, HPLC.

Common aspen – a type of deciduous tree from the willow family. Medicines containing extracts of bark, leaves and kidneys of aspen exhibit antimicrobial, anti-inflammatory, antitussive and anthelmintic properties [1].

Salicin is a crystalline glucoside of salicylic alcohol (saligenin), which is found in all plants of the willow family and has the main healing properties. Salicin in the body under the action of enzymes is broken down into alcohol - saligenin and glucose. In aqueous solutions, saligenin is easily oxidized by atmospheric oxygen to salicylic aldehyde and the corresponding acid, which is responsible for the main healing properties of aspen [2].

In this regard, the aim of the work was to study the kinetics of the hydrolysis of salicin in acidic media. To achieve the goal of the study, we studied the effect of the nature of the acid, its concentrations and temperature on the rate of hydrolysis reaction. In the experiments it was found that in alkaline ( $C_{OH^-} = 0.5$  n.) And neutral media, salicin is not hydrolyzed for 6 hours even at a temperature of 90°C. At the same temperature, noticeable changes in the concentration of salicin are not observed when it is 0.5 n.  $H_3PO_4$ ,  $CH_3COOH$  and  $HNO_3$  acids. And only in  $H_2SO_4$ , HCl and HBr acids does hydrolysis proceed at a noticeable rate. It was found that the reaction rate is the same for all tested strong acids and does not depend on their nature. In the work on the example of aqueous solutions of hydrochloric acid of various concentrations, it is shown that with an increase in the concentration of  $H^+$  in solution and temperature, the rate of hydrolysis of salicin increases.

Thus, it was found that the hydrolysis of salicin occurs only in aqueous solutions of strong acids and depends on concentration and temperature.

This work was supported by a grant from the RFBR 18-43-860002.

## Изучение кинетики реакции гидролиза салицина в кислой среде

Сабутова А.Б.

Югорский государственный университет, Ханты-Мансийск, Россия

**Аннотация.** Работа посвящена изучению кинетики реакции гидролиза салицина в водных растворах. Для определения салицина в объектах исследования применяли метод ВЭЖХ. В ходе исследования было установлено, что реакция гидролиза салицина протекает только в водных растворах сильных кислот.

**Ключевые слова:** салицин, осина, гликозиды, гидролиз, ВЭЖХ.

Осина обыкновенная – вид лиственных деревьев из семейства ивовых. Лекарственные препараты, содержащие экстракты коры, листьев и почек осины, проявляют противомикробные, противовоспалительные, противокашлевые и антигельминтные свойства [1].

Салицин – кристаллический гликозид салицилового спирта (салигенина), который содержится во всех растениях семейства ивовых и обладает основными лечебными свойствами. Салицин в организме под действием ферментов расщепляется на спирт - салигенин и глюкозу. В водных растворах салигенин легко окисляется кислородом воздуха до салицилового альдегида и соответствующей кислоты, которая и отвечает за основные лечебные свойства осины [2].

В связи с этим целью работы являлось изучение кинетики реакции гидролиза салицина в кислых средах. Для достижения цели исследования изучалось влияние природы кислоты, ее концентраций и температуры на скорость реакции гидролиза. В проведенных экспериментах было обнаружено, что в щелочной ( $C_{OH^-}=0,5$ н.) и нейтральной средах салицин в течение 6 часов не гидролизует даже при температуре 90°C. При этой же температуре заметных изменений в концентрации салицина не наблюдается при его нахождении в 0,5 н.  $H_3PO_4$ ,  $CH_3COOH$  и  $HNO_3$  кислотах. И только в  $H_2SO_4$ , HCl и HBr кислотах гидролиз протекает с заметной скоростью. При этом установлено, что скорость реакции одинакова для всех опробованных сильных кислот и не зависит от их природы. В работе на примере водных растворов соляной кислоты различных концентраций показано, что с увеличением концентрации  $H^+$  в растворе и температуры скорость гидролиза салицина возрастает.

Таким образом было установлено, что реакция гидролиза салицина протекает только в водных растворах сильных кислот и зависит от концентрации и температуры.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-43-860002.

1. Конохова О.М. Биологические ресурсы салицина в иве / О.М. Конохова, М.А. Бахтин, А.В. Канарский // Вестник технологического университета. 2016. Т.19 (№16). С. 130.
2. Минина С.А. Химия и технология фитопрепаратов, 2-е изд., перераб. и доп. / С.А. Минина, И.Е. Каухова // Москва: ГЭОТАР-Медиа. 2009. С. 384



**Selection of antibiotics suppressing bacterial and mycoplasma contamination of the original explants during *in vitro* microclonal propagation of grape**

*Sadigova E.E., Garagozov T.H.*

Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku, Azerbaijan

*E-mail: bioloq.2015@mail.ru*

**Key message.** *The research was conducted for the selection of antibiotics and determination of their effects on obtaining donor plants *in vivo*, improvement of morphogenesis and creation of plant collections with qualitative characteristics for *in vitro* microclonal propagation.*

**Keywords:** *antibiotics, *in vitro*, microclonal propagation*

The object of the study was an endangered, ancient, aboriginal grape variety Shirvan-Shahi. The research aimed to select antibiotics and determine their effects on obtaining donor plants *in vivo*, improvement of morphogenesis and creation of plant collections with qualitative characteristics for *in vitro* microclonal propagation. For this purpose, annual seedlings were treated with IMA (indolybutyric acid) (50 mg/l) along with antibiotics and then cultivated in a liquid medium, as well as in various substrates for rooting. In all stages of obtaining root plants from one-eyed cuttings, antibiotics were used both separately and in various proportions. The plant was transferred to a sterile soil mixture and cultivated under artificial climate conditions. The plant treated with antibiotics became the source of primary explants in the first stages of *in vitro* microclonal propagation. Among the studied antibiotics, ceftriaxone appeared to be effective in all stages of the study in the survival of cuttings *in vivo* and plant regeneration *in vitro*. The obtained results convincingly showed the effectiveness of using antibiotics at a concentration of 10 mg/l to obtain the initial material for *in vitro* microclonal propagation. Ceftriaxone at concentrations of 10 mg/l did not cause inhibition of growth processes in the initial plants. The antibacterial therapy of the initial material significantly increased morphogenesis in the first stages of *in vitro* microclonal propagation.

**JetGene – web database and toolkit for analysis of regulatory regions or nucleotide contexts at differently translated transcripts of plants**Sadovskaya N.S.<sup>1</sup>, Mustafaev O.N.<sup>2</sup>, Tyurin A.A.<sup>1</sup>, Goldenkova-Pavlova I.V.<sup>1</sup><sup>1</sup>Tmiryazev Institute of Plant Physiology, RAS, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Genetic Resources Institute, ANAS, Baku, Azerbaijan  
E-mail: nataliya.sadovskaya@gmail.com, orkhan@bioset.org

**Key message.** We create web database JetGene that allows to estimate the variation of length, nucleotide composition, codon usage frequency and to study nucleotides surrounding of the start codon. JetGene allows user to compare two samples of mRNA.

**Keywords:** *in silico* analysis, translation effectivity, comparison of two samples of mRNA, regulatory codes, motives

The paradox of discrepancy between the levels of mRNAs and their protein products in the eukaryotic cells, including plant cells, encountered by researchers at every step of organism development and under influence of different stress conditions at whole organism. Consequently, nowadays researchers direct their careful attention of to the study into fine mechanisms of translation.

It's known that mRNA has some regulatory codes that define the individual mRNA fate in translation. For detection of such translational determinants, researchers apply *in silico* analysis of different mRNA regions. With the aim of finding of regulatory codes in plants mRNA and their correlation with translational efficiency we create web database JetGene (<https://jetgene.bioset.org/>). This internet resource contains cDNA, CDS, 5'-UTR, 3'-UTR sequences of six kingdoms of living organisms, including plants. It is necessary to mention that information about CDS and cDNA is downloaded and updated from Ensembl regularly. JetGene has a wide toolkit that allows make a comparative analysis of sequences, in particular: (i) to estimate the variation of length, nucleotide composition, frequency of codon usage, to analyze GC-content, CpG-islands, and to study nucleotides surrounding of the start codon; (ii) to identify and define statistically significant representation of potential regulatory contexts at mRNA with different translation efficiency. It should be noted that the analysis could be performed both by full-length transcript and by coding/non-coding regions. Sequences that picked by researchers up in the analysis can be extract in fasta-format from JetGene. The graphical representation of results accompanies every step of the study. Such simple detail is greatly facilitated the work of any user.

In addition, beta-version of JetGene (<https://beta.bioset.org>) allows user to compare two samples of researcher's mRNA and to apply omics data for searching and prediction regulatory determinants of translation.

The work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 18-14-00026; IVG-P).

**JetGene – веб база данных и инструментарий для анализа регуляторных областей или нуклеотидных контекстов у дифференциально транслируемых транскриптов растений**Садовская Н.С.<sup>1</sup>, Мустафаев О.Н.<sup>2</sup>, Тюрин А.А.<sup>1</sup>, Голденкова-Павлова И.В.<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия; <sup>2</sup>Институт генетических ресурсов Национальной академии наук Азербайджана, Баку, Азербайджан

**Аннотация.** Нами создана веб база данных JetGene, позволяющая оценить вариации длины, нуклеотидного состава, частоты использования кодонов, окружение стартового кодона. Кроме того, JetGene дает возможность сравнить две выборки мРНК.

**Ключевые слова:** *in silico* анализ, трансляционная эффективность, сравнение двух выборок мРНК, регуляторные коды, мотивы

Парадокс несоответствия уровней мРНК и их белковых продуктов в клетках эукариот, включая растения, наблюдается на всех стадиях развития организма, а также при воздействии на организм различных стрессовых условий. В связи с этим, пристальное внимание исследователей в настоящее время направлено на изучение тонких механизмов трансляции.

Известно, что мРНК имеют регуляторные коды, которые определяют судьбу индивидуальной мРНК в трансляции. Для выявления таких детерминант трансляции применяют *in silico* анализ различных областей мРНК. С целью обнаружения регуляторных кодов в мРНК растений и их взаимосвязи с трансляционной эффективностью нами создана веб база данных JetGene (<https://jetgene.bioset.org/>), которая содержит последовательности cDNA, CDS, 5'-UTR, 3'-UTR для представителей шести основных царств живых организмов, включая растения. Необходимо упомянуть, что информация о CDS и cDNA загружена и регулярно обновляется с сервера Ensembl. JetGene имеет обширный инструментарий, позволяющий сделать детальный сравнительный анализ последовательностей, а именно (i) оценить вариации длины, нуклеотидного состава, частоты использования кодонов, проанализировать GC-состав, CpG-острова, а также изучить окружение стартового кодона трансляции; (ii) выявить и определить статистически значимую представленность потенциальных регуляторных контекстов у мРНК с разной эффективностью трансляции. Следует отметить, что анализ можно проводить как по полноразмерному транскрипту, так и по кодирующей/некодирующей областям. Последовательности, отобранные исследователем в результате анализа, могут быть экстрагированы из JetGene в fasta-формате на любом этапе работы. Графическая интерпретация результатов сопровождает каждый шаг работы и существенно облегчает работу пользователя. Кроме того, бета-версия JetGene (<https://beta.bioset.org>) позволяет сравнить две выборки мРНК пользователя и, таким образом, применить omics данные для поиска и предсказания регуляторных детерминант трансляции. Работа выполнена в рамках гранта РФФ 18-14-00026.

## **Rape rhizospheric nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing biocenoses promoted by microbial preparations**

*Safronava H.V., Aleschenkova Z.M., Ananyeva I.N., Evenkova-Chernetsova K.I.*

Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

*E-mail: hsafronava@mail.ru*

**Key message.** *The application of microbial preparations Gordebac, AgroMyc and Bactopin in spring rape culture stimulates the development of nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing microbiocenoses in crop rhizosphere.*

**Keywords:** *spring rape, microbial preparations, rhizospheric nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing biocenoses*

Oleaginous rape is used for technical, feed and food purposes. In Belarus, rape fields occupy the area of about 500,000 hectares. In order to increase crop productivity, the technologies requiring massive application of high doses of mineral and especially nitrogen fertilizers have been introduced, which may affect the oil seed quality.

The objective is to study the influence of microbial preparations developed for rape cultivation on nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing species in rhizosphere of locally selected spring rape, Herzog variety.

Belarusian growth-stimulating, nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing microbial preparations Gordebac (liquid), AgroMyc (liquid) and Bactopin (liquid) were used in field experiments for rape tillage.

Nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing microbial components of spring rape rhizosphere were investigated at the stage of defloration. Pre-sowing seed treatment with microbial preparations increased the number of nitrogen-fixing microorganisms on average by 1.6 times. During treatment of vegetating plants at the boot stage, the microbial titer in the experiment exceeded the control values by 3.1 times (Gordebac), by 4.0 times (Bactopin) and by 4.5 times (AgroMyc). The application of microbial preparations at the budding stage revealed the maximum beneficial effect. The number of nitrogen-fixing species following treatment with the preparation Gordebac was 16.7 times higher than the control, with microbial preparations Bactopin by 11.6 times, and AgroMyc by 8.4 times.

In all experimental variants phosphate-solubilizing microorganisms also developed at a faster rate. Upon pre-sowing seed treatment microbial population density increased 1.7 times on average. Treatment of vegetating rape plants at the boot stage enhanced microbial cell titer by 1.9 times over the control values, at the budding stage by 3.2 times on average. The peak stimulating effect at all vegetation stages was shown by microbial preparation AgroMyc.

The microbial preparations Gordebac (liquid) and Bactopin (liquid) successfully passed state registration and were authorized for use at the customs territory of the Eurasian Economic Community.

## **Ризосферное азотфиксирующее и фосфатмобилизирующее сообщество при возделывании рапса с использованием микробных препаратов**

*Сафронова Г.В., Алещенкова З.М., Ананьева И.Н., Евенкова-Чернецова К.И.*

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**Аннотация.** *Использование микробных препаратов Гордебак, АгроМик и Бактопин при возделывании ярового рапса стимулирует развитие азотфиксирующих и фосфатмобилизирующих микроорганизмов в ризосфере культуры.*

**Ключевые слова:** *яровой рапс, микробные препараты, азотфиксирующее и фосфатмобилизирующее ризосферное сообщество*

Рапс используют в технических, кормовых и пищевых целях. В Беларуси рапс возделывается на площади около 500 тыс. га. Для увеличения урожайности используются технологии, предусматривающие интенсивное применение высоких доз минеральных, особенно азотных, удобрений, что может сказываться на качестве маслосемян.

Цель – исследовать влияние микробных препаратов, разработанных нами для возделывания рапса, на азотфиксирующее и фосфатмобилизирующее сообщество ризосферы ярового рапса сорта Герцог отечественной селекции. В полевых опытах при выращивании рапса использовали отечественные ростстимулирующие азотфиксирующие и фосфатмобилизирующие микробные препараты Гордебак (жидкий), АгроМик (жидкий) и Бактопин (жидкий). Плотность популяций микроорганизмов в ризосферной почве рапса изучали общепринятыми в почвенной микробиологии методами с последующим высевом разведений суспензии на соответствующие элективные среды.

Азотфиксирующее и фосфатмобилизирующее ризосферное сообщество ярового рапса сорта Герцог исследовали в стадии отцветания. Предпосевная обработка семян микробными препаратами увеличивала число азотфиксирующих микроорганизмов в среднем в 1,6 раза. При обработке вегетирующих растений в стадии стеблевания их количество в опытных вариантах превышало показатели контрольного варианта в 3,1 раза (Гордебак), в 4,0 раза (Бактопин), и в 4,5 раза (АгроМик). Максимальное позитивное влияние выявлено при использовании микробных препаратов в стадии бутонизации. Число азотфиксаторов при обработке биопрепаратом Гордебак было выше контроля в 16,7 раза, микробными препаратами Бактопин – в 11,6 раза и АгроМик – в 8,4 раза.

Во всех опытных вариантах фосфатмобилизирующие микроорганизмы также развивались интенсивнее. При предпосевной обработке растений плотность их популяции возрастала в среднем в 1,7 раза. Обработка рапса по вегетации в стадии стеблевания увеличивала их численность по сравнению с контролем в среднем в 1,9 раза, в стадии бутонизации – в среднем в 3,2 раза. Максимально во все стадии развития растений стимулировал развитие этой группы микробный препарат АгроМик.

Микробные препараты Гордебак (жидкий) и Бактопин (жидкий) прошли госрегистрацию и разрешены к применению на таможенной территории Евразийского экономического союза.



## Secondary metabolite profiles and biological activity of extracts from various isolates fungi *Alternaria sonchi* depending on the composition of the liquid nutrient medium

Salimova D.R., Berestetskiy A.O.

All-Russian Research Institute of Plant Protection (VIZR), Saint-Petersburg, Pushkin, Russia

E-mail: salimova.92@bk.ru

**Key message.** Phytopathogenic fungus *A. sonchi* is able to produce metabolites with insecticidal properties. The composition of the culture media affected the metabolite profiles of the extracts. The results of the assessment of biological activity allowed to divide the working isolates with phytotoxic and insecticidal activity.

**Keywords:** *Alternaria sonchi*, insecticidal properties, chloromonilinic acids B and C, 4-chloropinselin, tentoxin

Phytopathogenic fungi from the genus *Alternaria* are often considered as producers of herbicidal compounds, mycotoxins and antibiotic substances. There are few works aimed at the search for secondary metabolites with insecticidal properties in fungi of this genus. The object of research is the species *Alternaria sonchi*, a pathogen of weeds from the genus *Sonchus*. The aim of the work is to study the effect of various liquid nutrient media on the variability of the composition and biological activity of extracts obtained from *A. sonchi* cultures. Research objectives: extraction of fungal metabolites with solvents of different polarity; assessment of the biological activity of the obtained extracts against a wide set of test organisms; analysis and preliminary characterization of the composition of the extracts. We used four geographically distant isolates of *A. sonchi* (S-102, S-145, Ger 8.2, I. 5.4). Fungi were cultured for 3 weeks at a constant temperature (24 °C) and under variable lighting on synthetic (M1D and Czapek) and semi-synthetic (YMG and Sabouraud) media that differ in carbon and nitrogen sources. Secondary metabolites were extracted from the culture filtrate (CF) with methylene chloride at neutral pH and ethyl acetate after acidification to pH 3. The metabolite profiles of the extracts were analyzed by HPLC-MS. The obtained extracts were evaluated for phytotoxic, insecticidal, antibiotic and zootoxic activity. The yield of secondary metabolites, depending on the isolate, varied weakly, but significantly depended on the composition of the liquid nutrient medium and on the extractant. The yield of extractives from CF was several times higher upon extraction with ethyl acetate than upon extraction of secondary metabolites with methylene chloride. Among the chloromethylene (107 mg/L) and ethyl acetate (325 mg/L) extracts, the maximum yield of extractives was noted when culturing in Sabouraud liquid medium from the culture of isolate S-102 *A. sonchi*. Ethyl acetate extracts obtained by culturing isolates S-102, I. 5.4 on M1D medium showed the highest phytotoxic activity against the sowthistle and wheat leaves. The highest antibacterial activity against *Bacillus subtilis* and *Candida tropicalis* was observed in ethyl acetate and chloromethylene extracts of isolate S-102 obtained on M1D medium (the radius of inhibition zone 15 mm and 8 mm, respectively). Ethyl acetate extracts from CF isolate Ger 8.2 from YMG medium and isolate S-145 from M1D medium possessed insecticidal properties (efficacy at 85–90%) against *Schizaphis graminum* aphids. None of the obtained extracts at a concentration of 100 µg/ml showed acute toxicity to *Paramecium caudatum*. An analysis of metabolite profiles by HPLC-MS showed the presence of previously unknown substances in the extracts, in addition to the already known compounds of *Alternaria* spp.. Chloromonilinic acids B and C, 4-chloropinselin were identified in the phytotoxic extracts. The latter substance is also present in extracts with antimicrobial properties. The ethyl acetate extract from the S-102 culture from YMG presumably contained tentoxin by HPLC-MS data. Thus, the qualitative composition of extracts from liquid cultures of *A. sonchi* depends on the selected nutrient substrates. The most favorable media for the production of biologically active extracts were M1D and YMG. The results of evaluating the biological activity of the extracts allowed to divide the working isolates into 2 groups: with phytotoxic (S-102, I. 5.4) and insecticidal (Ger 8.2, S-145) activity. The data of the study suggest that *A. sonchi*, the potential producer of mycoherbicide against sowthistle, is able to produce natural products with insecticidal properties. Further study of these metabolites is necessary for more complex toxicological characterization of this fungus, and for the detection of new natural insecticidal substances.

This work was supported by the RFBR project "graduate students" № 19-34-90181.

**In vitro evaluation of some halophilic bacterial isolates as biofertilizers**Samsonova E.A.<sup>1</sup>, Ibrahim I.M.<sup>2</sup>, Fedonenko Yu.P.<sup>1,3</sup>, Konnova S.A.<sup>1,3</sup><sup>1</sup>Chernyshevsky Saratov State University, Saratov, Russia; <sup>2</sup>Department of Agricultural Microbiology, Fayoum University, Fayoum, Egypt; <sup>3</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

E-mail: elena.smsnv@mail.ru

**Key message.** For six strains of halophilic bacteria, nitrogen fixation ability, production of phytohormones and siderophores, the solubilization of phosphates, and heavy metal resistance were revealed.

**Keywords:** halophilic bacteria, plant-growth promoting activity

Halophilic microorganisms are able to survive under salt and osmotic stresses, and are often adapted to alkalization, high temperatures, and other extreme environmental conditions. Plant-growth-promoting halophilic bacteria are promising agents for creation of effective biofertilizers, therefore, the aim of this study was to identify such activities among 15 halophilic strains isolated from the salt samples from Qarun and Elton salt lakes.

Bacteria were cultured and maintained under aerobic conditions in GRM broth and GRM agar (2%) media, supplemented with NaCl (5-10%, depending on the strain). The ability of bacteria to fix atmospheric nitrogen was determined using semi-liquid nitrogen-free Muromtsev medium. The content of indolyl-3-acetic acid (IAA) in the Muromtsev culture medium containing L-tryptophan as an inductor of auxin biosynthesis was determined by HPLC. The ability to mobilize inorganic phosphates was evaluated after cultivation in NBRIP medium for 72 hours. After precipitation of bacteria, the content of mobile forms of phosphorus was measured in the supernatant according to the Chirikov method. The resistance of microbial strains to heavy metals was evaluated after 3 day incubation in a liquid S-G liquid medium supplied with ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, Cd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O, Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> × 3H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O, NiCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O (up 0 to 5 mM). For the assessment of the ability to secrete siderophores under conditions of iron starvation the bacterial suspensions (100 µl, OD<sub>600</sub> = 1) were added to the wells in M9 medium with chromazurol S dye (CAS agar). The ability of bacteria to grow on CAS agar with the formation of a radial zone and to change in the color of the medium were evaluated.

Of 15 studied isolates, six strains showed the most pronounced PGRP activities: two strains of Gram negative bacteria: *Chromohalobacter salexigens* EG1QL3, *Halomonas caseinilytica* EG33S7QL; and four strains of firmicutes: *Bacillus licheniformis* EG1QL30, *Bacillus subtilis* EGP5QL12, *Bacillus halotolerans* RU2EL4, *Halobacillus dabanensis* EG1HP4QL. These bacteria belong to different ecological groups: extreme halophiles – *C. salexigens* (>15% NaCl); moderate halophiles – *B. licheniformis* and *B. subtilis* (5-15% NaCl); weak halophiles – the other strains (0-5% NaCl). All isolates grew on nitrogen-free medium, which indicated the presence of nitrogen-fixing ability in these bacteria. IAA production was observed for *B. licheniformis* and *H. dabanensis* only, and its content in the cultivation medium was 0.15 and 0.19 µg / ml, respectively. During the cultivation of *B. licheniformis*, *H. dabanensis*, and *B. halotolerans* in Muromtsev medium, the concentration of phosphates increased 2.2, 1.6, and 0.4 fold as compared to the initial medium, respectively. Among the studied microorganisms, inter- and intra-strains variability of heavy metal sensitivity was revealed. The greatest inhibitory effect to the most strains was shown for salts of cadmium, zinc and lead. All studied strains produced siderophores with different activity at growth on CAS agar. *C. salexigens* and *H. caseinilytica* were the most active siderophore producers, while the activity of *H. dabanensis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, and *B. halotolerans* was significantly lower.

Based on the studies, all selected strains can be recommended for further studies of their biofertilizing properties.

### Antifungal activity of lipopeptides from endophytic strains of the genus *Bacillus* sp. against the fungus *Stagonospora nodorum* (Berk.)

Sarvarova E.R., Cherepanova E.A., Maksimov I.V.

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: sarvarova\_lena@mail.ru

**Key message.** The direct antibiotic effect of lipopeptides from four endophytic strains on the germination of spores of the pathogenic fungus *Stagonospora nodorum* (Berk.) was found and the minimum inhibitory concentration (MIC) of these lipopeptides was determined.

**Keywords:** endophytes, lipopeptides, antifungal activity, *Bacillus*, *Stagonospora nodorum* (Berk.)

Endophytic bacteria are able to stimulate plant growth and exhibit antifungal properties and therefore they are interesting as a basis for the creation of biological agents to protection. [Maksimov et al., 2011].

Various antimicrobial metabolites, such as lipopeptide biosurfactants, especially lipopeptides from bacteria of the genus *Bacillus*, allow to suppress and destroy pathogenic microorganisms, and also affect the antifungal ability of the strain at different concentrations [Li et al, 2019].

The MIC values of metabolites that lead to maximum inhibition of fungal spore growth allow us to see differences in the ability of different strains to inhibit the growth of pathogens [Hua et al., 2014]. In this regard, the purpose of our research is to determine the MIC of lipopeptides from four endophytic strains.

In order to determine the MIC of lipopeptides, fungi spores were washed away from the surface of *S. nodorum* mycelium grown on potato-glucose agar (PGA) in Petri dishes. In 96-well plates under sterile conditions, different concentrations of lipopeptides from *B. subtilis* 26D, *B. subtilis* 11BM, *B. subtilis* Ts1 and *B. subtilis* Ts8-2 in a 1: 100 ratio were added to the spore suspension. Lipopeptides were used in the following concentrations: 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 µg/ml. Spores were incubated at 28 °C for 1 h. Then, the spores were transferred to Petri dishes with PGA and cultured at 28 °C for 2 days, then the minimum lipopeptide concentration of each bacterial strain which leads to inhibition of fungal growth was determined.

The MIC of *B. subtilis* 26D, *B. subtilis* 11 BM and *B. subtilis* Ts8-2 lipopeptides was 150 µg/ml, of *B. subtilis* Ts1 – 100 µg/ml. Thus, the lipopeptides synthesized by *B. subtilis* Ts1 strain are characterized by higher antifungal activity compared to the lipopeptides of the other strains. The obtained results allow us to conclude about similar negative effect of lipopeptides of various strains of endophytic bacteria on the growth of *S. nodorum* fungus, however, their biocidal activity may vary. A study of the composition of lipopeptides may explain some differences in the properties of the studied endophytic bacterial strains, which will contribute to the development of more effective microbiological plant protection products.

This research was funded by the grant of the Russian Foundation for Basic Research № 17-29-08014.

### Антифунгальная активность липопептидов из эндофитных штаммов рода *Bacillus* sp. против гриба *Stagonospora nodorum* (Berk.)

Сарварова Е.Р., Черепанова Е.А., Максимов И.В.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

**Аннотация.** Выявлен антибиотический эффект липопептидов из четырех эндофитных штаммов на прорастание спор фитопатогенного гриба *Stagonospora nodorum* (Berk.) и определена минимальная ингибирующая концентрация (МИК) данных липопептидов.

**Ключевые слова:** эндофиты, липопептиды, антифунгальная активность, *Bacillus*, *Stagonospora nodorum* (Berk.)

Эндофитные бактерии способны стимулировать рост растений и проявлять антифунгальные свойства и поэтому представляют большой интерес в качестве основы для создания биологических средств защиты. [Максимов и др., 2011].

Различные антимикробные метаболиты, такие как липопептидные биосурфактанты, особенно характерные для бактерий рода *Bacillus*, позволяют подавлять и уничтожать патогенные микроорганизмы, а также в различных концентрациях влияют на антифунгальную способность штамма [Li et al, 2019].

Значения МИК метаболитов, приводящие к максимальному ингибированию роста спор грибов позволяют увидеть различия в способности различных штаммов подавлять рост патогенов [Hua et al., 2014]. В связи с этим была поставлена цель - определить МИК липопептидов из четырех эндофитных штаммов.

Для определения МИК липопептидов делали смыв спор грибов с поверхности выращенного на картофельно-глюкозном агаре (КГА) в чашках Петри мицелия *S. nodorum*. В 96-луночных планшетах в стерильных условиях к суспензии спор добавляли различные концентрации липопептидов из *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11BM, *B. subtilis* Ts1 и *B. subtilis* Ts8-2 в соотношении 1:100. Липопептиды применялись в следующих концентрациях: 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 мкг/мл. Споры инкубировали при 28°C в течение 1 ч. Затем споры переносили на чашки Петри с КГА и культивировали при 28°C в течение 2 суток, после чего определяли минимальную концентрацию липопептидов каждого штамма бактерий, приводящую к ингибированию роста гриба.

МИК липопептидов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11 BM и *B. subtilis* Ts8-2 составила 150 мкг/мл, для *B. subtilis* Ts1– 100 мкг/мл. Таким образом, липопептиды, синтезируемые штаммом *B. subtilis* Ts1, характеризуются большей антифунгальной активностью, по сравнению с липопептидами остальных штаммов. Полученные результаты позволяют сделать вывод о сходном негативном влиянии липопептидов различных штаммов эндофитных бактерий на рост гриба *S. nodorum*, однако их бицидная активность может отличаться. Изучение состава продуцируемых липопептидов может объяснить некоторые отличия в свойствах изученных эндофитных штаммов бактерий, что будет способствовать разработке более эффективных микробиологических средств защиты растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ-офим № 17-29-08014.

1. Li Y., Wang R., Liu J., Xu L., Ji P., Sun L., Pan H., Jiang B., Li L. Identification of a biocontrol agent *Bacillus vallismortis* BV23 and assessment of effects of its metabolites on *Fusarium graminearum* causing corn stalk rot // *Biocontrol Sci. Technol.* – 2019. – V. 29 (3). – P. 263-275.
2. Hua H., Xing F., Selvaraj, J., Wang, Y., Zhao Y., Zhou L., Liu X., Liu Y. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production // *PLoS One.* – 2014. – V. 9 (9). – e108285.
3. Максимов И. В., Абизгильдина Р. Р., Пусенкова Л. И. Стимулирующие рост растений микроорганизмы как альтернатива химическим средствам защиты от патогенов (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2011. – Т. 47 (4). – С. 373-385.



**Morphogenesis *in vitro* and peroxidase activity in barley cv. Steptoe and its ABA-deficient mutant AZ34: effects of inhibitors of ABA synthesis and auxin transport**

Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Galin I.R., Veselov D.S., Kruglova N.N.  
Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Center of RAS, Ufa, Russia  
E-mail: o\_seldimirova@mail.ru

**Key message.** The relationship between the effect of ABA on morphogenesis *in vitro* and auxin transport, as well as the role of peroxidases in the action of ABA on morphogenesis *in vitro* in the ABA-deficient barley mutant AZ34 and its parent form cv. Steptoe was studied.

**Keywords:** morphogenesis *in vitro*, ABA, peroxidases, ABA synthesis inhibitors, auxin transport inhibitors

The effect of reactive oxygen species (ROS) and auxin transport inhibitors on morphogenesis *in vitro* is not well understood. The aim of the work is to identify the role of ROS, as well as hormones and their functional interaction in the regulation of morphogenesis *in vitro*. The ABA-deficient mutant AZ34 and its parent form cv. Steptoe were used as objects of study. The methods of callus culture *in vitro*, vital histochemical staining using 3,3-diaminobenzidine (DAB) and histological studies were used. The use of the DAB staining with the addition of exogenous hydrogen peroxide revealed a high level of peroxidase activity in the cells of the callus meristematic zones (the initials of various morphogenesis pathways *in vitro*). It was established that on the basic nutrient medium in Steptoe calli normal embryoids were formed, and in AZ34 they were delayed in development and were characterized by a decrease in peroxidase activity, which was offset by the addition of exogenous ABA to the medium. In contrast, the addition of an inhibitor of ABA synthesis fluridone was delayed the development of embryoids in Steptoe calli and decreased peroxidase activity. In general, a relationship was found between the level of ABA and peroxidase activity, which can be explained by the ability of this hormone to increase peroxidase activity. There is evidence that the effect of ABA on morphogenesis *in vitro* is due to the suppression of auxin transport under the influence of ABA. The addition of naphthylphthalamic acid to the medium induced abnormal rhizogenesis in AZ34 and abnormal embryoidogenesis in Steptoe and could not mimic the effect of ABA, which indicates a more complex role of this hormone than inhibition of auxin transport. Adding vanadate (an ABC transporter inhibitor) to the nutrient medium induced gemmorhizogenesis in both genotypes that differ in their ability to synthesize ABA, which indicates that ABA is not involved in the regulation of auxin transport involving ABC transporters. The obtained results allow us to conclude that ABA plays an important role in the regulation of morphogenesis *in vitro*, however, the mechanism of action of ABA on this process cannot be explained only by the effect of this hormone on auxin transport.

The work was carried out through the state task of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, the project no. 075-00326-19-00 according to theme AAAA-A18-118022190099-6.

**Морфогенез *in vitro* и активность пероксидаз у ячменя сорта Steptoe и его АБК-дефицитного мутанта AZ34: влияние ингибиторов синтеза АБК и транспорта ауксинов**

Сельдимирова О.А., Кудоярова Г.Р., Галин И.Р., Веселов Д.С., Круглова Н.Н.  
Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, Россия

**Аннотация.** Изучено наличие связи между влиянием АБК на морфогенез *in vitro* и транспортом ауксинов, а также роль пероксидаз в действии АБК на морфогенез *in vitro* у АБК-дефицитного мутанта ячменя AZ34 и его родительской формы – сорта Steptoe.

**Ключевые слова:** морфогенез *in vitro*, АБК, пероксидазы, ингибиторы синтеза АБК, ингибиторы транспорта ауксинов

Влияние активных форм кислорода (АФК) и ингибиторов транспорта ауксинов на морфогенез *in vitro* изучено недостаточно. Цель работы – выявление роли АФК, а также гормонов и их функционального взаимодействия в регуляции морфогенеза *in vitro*. В качестве объектов исследования использовали дефицитный по АБК мутант AZ34 и его родительскую форму – сорт Steptoe. Применяли методы каллусной культуры *in vitro*, витального гистохимического окрашивания с использованием 3,3-диаминобензидина (ДАБ) и гистологических исследований. Использование красителя ДАБ с добавлением экзогенной перекиси водорода выявило высокий уровень активности пероксидаз в клетках меристематических зон каллусов (инициалей различных путей морфогенеза *in vitro*). Установлено, что на базовой питательной среде в каллусах Steptoe, формировались нормальные эмбриониды, а у AZ34 - задерживались в развитии и характеризовались снижением активности пероксидаз, что нивелировалось добавлением в среду экзогенной АБК. Напротив, добавление среды ингибитора синтеза АБК флуридона задерживало развитие эмбрионидов в каллусах Steptoe и снижению активности пероксидаз. В целом, выявлена связь между уровнем АБК и активностью пероксидазы, что можно объяснить способностью этого гормона повышать активность пероксидаз. Имеются сведения, что влияние АБК на морфогенез *in vitro* обусловлено подавлением транспорта ауксинов под влиянием АБК. Добавление в среду нафтилфталамой кислоты индуцировало аномальный ризогенез у AZ34 и аномальный эмбрионидогенез у Steptoe и не смогло симитировать действие АБК, что свидетельствует о более сложной, чем ингибирование транспорта ауксинов, роли данного гормона. Добавление в питательную среду ванадата (ингибитора ABC транспортеров) к индукции гемморизогенеза у обоих генотипов, различающихся по способности к синтезу АБК, что свидетельствуют о том, что АБК не принимает участия в регуляции транспорта ауксинов с участием ABC-переносчиков. Полученные результаты позволяют сделать вывод о важной роли АБК в регуляции морфогенеза *in vitro*, однако механизм действия АБК на этот процесс нельзя объяснить только влиянием этого гормона на транспорт ауксинов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № AAAA-A18-118022190099-6.

### Anti-stress sugar beet cultivation technology

Sergeev V.S.<sup>1</sup>, Mukminov D.R.<sup>2</sup>, Minnebaev L.F.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ООО NVP «BashIncom», Ufa, Russia; <sup>2</sup> FSBEI HE Bashkir State Agrarian University, Ufa, Russia;

<sup>3</sup>ООО «Borogum», Ufa, Russia

E-mail: sergeev-vs@mail.ru, linar00711@gmail.com

**Key message.** During the growing season, sugar beets are subjected to various stresses, while most of the crop is lost. Biological products and biofertilizers produced by BashIncom reduce the impact of environmental stress factors and allow you to save the crop.

**Keywords:** sugar beet, biological products, biofertilizers, anti-stress technology

The genetic potential of modern sugar beet hybrids allows you to get high yields - 100 or more tons. In fact, farmers receive only 30-50% of the yield inherent in the genetic potential of plants. The loss of the crop occurs mainly due to the influence of adverse environmental factors: drought, temperature drop, cold returns, pesticidal stress, etc. Farmers need to increase the stress resistance of sugar beets, thereby minimizing the loss of genetic potential. This is quite possible, using biological products (Fitosporin series, BioAzFK, Sternya-12) and bio-fertilizers (Gumi, Borogum, Bogaty and Bionex-Kemi series) in crop cultivation technology. The use of NVP «Bashincom» products allows balancing plant nutrition, restoring metabolism after pesticide treatments, increasing the immunity and resistance of plants to environmental stress factors, while significantly reducing the need for fertilizers and chemical plant protection products (by 20-30%). In the beet-growing regions of Russia, anti-stress technology has been introduced for several years. Production experiments carried out in different climatic years in the Krasnodar Territory, Belgorod and Lipetsk regions, the Republic of Bashkortostan and Tatarstan confirm the effectiveness of anti-stress technology for sugar beet cultivation. The increase in the yield of root crops in comparison with traditional technology in farms is from 2 to 9 t/ha, while the costs of acquiring and using biological products and bioactivated fertilizers are fully paid off, and high profitability is guaranteed. Thus: a) biological products and bioactivated fertilizers of NVP «Bashincom» are an integral and indispensable link in the technology of sugar beet cultivation; an innovative solution in protecting plants from diseases, as well as in balancing plant nutrition through foliar application in key phases of crop development b) anti-stress technology allows you to: increase the yield of sugar beets 1.1-1.3 times; reduce the cost of chemical plant protection products and mineral fertilizers by 1.2-1.3 times c) economic efficiency in the cultivation of sugar beets from the use of biological products and bioactivated fertilizers is up to 20 rubles. net profit of 1 rub. production costs.

### Антистрессовая технология возделывания сахарной свеклы

Сергеев В.С.<sup>1</sup>, Мукминов Д.Р.<sup>2</sup>, Миннебаев Л.Ф.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ООО НВП «БашИнком», Уфа, Россия; <sup>2</sup>ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ, Уфа, Россия; <sup>3</sup>ООО «Борогум», Уфа, Россия

**Аннотация.** В течение вегетации сахарная свекла подвергается различным стрессам, при этом теряется большая часть урожая культуры. Биопрепараты и биоудобрения производства НВП «БашИнком» снижают воздействие стресс-факторов внешней среды и позволяют сохранить урожай.

**Ключевые слова:** сахарная свекла, биопрепараты, биоудобрения, антистрессовая технология

Генетический потенциал современных гибридов сахарной свеклы позволяет получать высокие урожаи - 100 и более тонн. На самом деле аграрии получают только 30-50 % той урожайности, заложенной в генетическом потенциале растений. Потеря урожая, главным образом, происходит за счет воздействия неблагоприятных факторов внешней среды: засуха, перепад температур, возврат холодов, пестицидный стресс и др. Аграриям необходимо повысить стрессоустойчивость сахарной свеклы, тем самым минимизировать потерю генетического потенциала. Это вполне возможно, применяя биопрепараты (серии «Фитоспорин», «БиоАзФК», «Стерня-12») и биоудобрений (серий «Гуми», «Борогум», «Богатый» и «Бионекс-Кеми») в технологии возделывания культуры. Применение башинкомовской продукции позволяет сбалансировать питание растений, восстановить обмен веществ после пестицидных обработок, повысить иммунитет и устойчивость растений к стресс-факторам внешней среды, при этом существенно снизить потребность в удобрениях и химических СЗР (на 20-30 %). В свеклосеющих регионах России антистрессовую технологию внедряют не первый год. Производственные опыты, проведенные в разные по климатическим условиям годы в Краснодарском крае, Белгородской и Липецкой областях, Республиках Башкортостан и Татарстан подтверждают эффективность антистрессовой технологии возделывания сахарной свеклы. Прибавка урожая корнеплодов в сравнении с традиционной технологией в хозяйствах составляет от 2 до 9 т/га, при этом затраты на приобретение и применение биопрепаратов и биоактивированных удобрений полностью окупаются, а также гарантируется высокая рентабельность. Таким образом: а) биопрепараты и биоактивированные удобрения НВП «БашИнком» являются неотъемлемым и обязательным звеном в технологии возделывания сахарной свеклы; инновационным решением в защите растений от болезней, а также в сбалансировании питания растений путем проведения листовых подкормок в ключевые фазы развития культуры б) антистрессовая технология позволяет: повысить урожай сахарной свеклы в 1,1-1,3 раза; снизить затраты на химические средства защиты растений и минеральных удобрений в 1,2-1,3 раза в) экономическая эффективность при возделывании сахарной свеклы от применения биопрепаратов и биоактивированных удобрений составляет до 20 руб. чистой прибыли на 1 руб. производственных затрат.

### Features of the initial stages of the relationship between barley, phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum* and rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* 2137

Shaposhnikov A.I.<sup>1</sup>, Vishnevskaya N.A.<sup>1</sup>, Shakhnazarova V.Yu.<sup>1,2</sup>, Syrova D.S.<sup>1</sup>, Borodina E.V.<sup>1</sup>, Kovaleva O.N.<sup>3</sup>, Strunnikova O.K.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Pushkin, Russia; <sup>2</sup>Saint-Petersburg State University, Department of Agrochemistry, Saint-Petersburg, Russia; <sup>3</sup>N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Saint-Petersburg, Russia  
E-mail: ai-shaposhnikov@mail.ru

**Key message.** It was shown that enhanced colonization of barley's roots by *Fusarium culmorum* in the presence of *Pseudomonas fluorescens* 2137 may be due to the composition of root exudates. Strain 2137 can enhance expression of plant defence gene *PAL*.

**Keywords:** *Fusarium culmorum*, *Pseudomonas fluorescens*, root exudates, root colonization

The development of effective methods for biocontrol of root rot requires a thorough study of the mechanisms of interaction between phytopathogenic fungi and beneficial rhizobacteria in the rhizosphere. Our studies are related to clarifying the question: why *Fusarium culmorum* in 1-4 days from seeds germination more actively colonized roots of barley *Hordeum vulgare* L. cv. Belogorsky that were colonized by *Pseudomonas fluorescens* 2137 (but not sterile roots), and what is the impact of this effect with the biocontrol activity of rhizobacteria?

The composition of root exudates and nutrition requirements of the *F. culmorum* and *P. fluorescens* 2137 was established using an ultra-performance liquid chromatography. The relationship between *F. culmorum* and antagonistic bacteria were studied in a growing experiment on membranes introduced into the rhizosphere, and also evaluated the relationship and quantity of each of the microorganisms on the roots of barley. The expression of *PAL* gene (one of the plant's protection genes) was determined by RT-PCR.

The absence of *F. culmorum* chemotaxis to root exudates of barley was established. However, it was found, that root exudates of barley colonized by *P. fluorescens* 2137 stimulated the growth of fungal growth tubes compared to exudates of uninoculated plants. A comparative analysis of low molecular weight components of root exudates showed that exudates of barley roots that were colonized by *P. fluorescens* 2137 contain a significantly higher amount of glucose and several amino acids (components to be necessary for the growth of *F. culmorum*), but lower amounts of aromatic acids (plant defense compounds having antimicrobial activity) than sterile barley root exudates or with colonization only *F. culmorum*. Stimulating the growth of *F. culmorum* could be the reason for more active colonization by the mycelium of the roots that were colonized by bacteria.

For experimental verification of the hypothesis of “extrusion” of a pathogen by antagonistic bacteria from the rhizosphere to the root surface, which leads to an increase in the amount of *F. culmorum* on the roots in the initial period of colonization, the relationship between the *F. culmorum* and the antagonistic bacteria *P. fluorescens* 2137, *Bacillus subtilis* Ch-13 and *Flavobacterium* sp. was studied. All bacteria used in this experiment suppressed the growth of *F. culmorum* mycelium in the barley rhizosphere. A comparison of the amount of fungus in the rhizosphere and on the roots in the presence of bacteria showed that an increase in the amount of fungus on the roots in the initial period of colonization was observed only in the presence of *P. fluorescens* 2137 and not observed in the presence of two other antagonistic strains. Thus, inhibition of the pathogen by antagonistic bacteria in the rhizosphere does not necessarily lead to an increase in the amount of *F. culmorum* on the roots in the initial period of colonization.

Similar nutritional needs in glucose and amino acids for *F. culmorum* and bacteria was led to competitive relationships between these microorganisms. Nevertheless, despite fluctuations in the number of each of the microorganisms on the roots as result of competition, the combined introduction of a pathogen and *P. fluorescens* 2137 into the substrate (vermiculite, soil) led to decrease in the intensity of root rot of barley, in compare with inoculation only *F. culmorum*. To clarify the mechanisms of root rot biocontrol, the expression of the *PAL* gene, one of the host protection genes, in sterile barley plants and colonized *F. culmorum* and *P. fluorescens* 2137 were assessed. In daily barley plants, the strongest expression of *PAL* was noted in roots colonized only by *P. fluorescens* 2137, and in three-day-old barley plants the expression level of this gene increased in roots colonized jointly by the pathogen and *P. fluorescens* 2137. The observed response of barley to the colonization of *F. culmorum* and *P. fluorescens* 2137 indicates that strain 2137 may cause a more active protective response in barley than a phytopathogenic fungus. It is possible that in the early stages of the relationship between *F. culmorum*, *P. fluorescens* 2137 and barley, the role of rhizobacteria in control of root rot is mainly associated not with the direct suppression of *F. culmorum* on the roots (which was not observed in our experiments), but with early induction protective reactions of barley.

These studies were funded by RFBR (project 18-016-00111).

### The effect of *Fusarium culmorum* and *Pseudomonas fluorescens* 2137 on the content of abscisic acid in the roots and shoots of barley seedlings

Shaposhnikov A.I.<sup>1</sup>, Vishnevskaya N.A.<sup>1</sup>, Shakhnazarova V.Yu.<sup>1,2</sup>, Syrova D.S.<sup>1</sup>, Borodina E.V.<sup>1</sup>,  
Kovaleva O.N.<sup>3</sup>, Strunnikova O.K.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Pushkin, Russia; <sup>2</sup>Saint-Petersburg State University, Department of Agrochemistry, Saint-Petersburg, Russia; <sup>3</sup>N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Saint-Petersburg, Russia  
E-mail: ai-shaposhnikov@mail.ru

**Key message.** Inoculation of barley with a *F. culmorum* not accompanied by an increase in the number of abscisic acid in plants, but under *P. fluorescens* 2137 inoculation, the accumulation of abscisic acid in the roots occurred.

**Keywords:** *Fusarium culmorum*, *Pseudomonas fluorescens*, abscisic acid

Abscisic acid (ABA) plays an important role in the development of plant pathogenesis, often counteracting the implementation of an effective protective reaction. It was shown that ABA is able to directly inhibit the development of induced systemic resistance, acting as an antagonist of salicylic and jasmonic acids, as well as ethylene, leading to increased susceptibility of plants to various bacterial and fungal pathogens. On the other hand, ABA can contribute to the development of resistance in some interactions between plants and pathogenic microorganisms. The aim of the study was to assess the effect of the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum* and biocontrol rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* 2137 on abscisic acid metabolism in barley seedlings of *Hordeum vulgare* L. cv. Belogorsky. The content of ABA in roots and shoots was determined by ultra-efficient liquid chromatography using the Waters ACQUITY UPLC H-class system (Waters, USA).

As the experiments showed, ABA was absent in the daily barley seedlings. In three-day and eight-day shoots of barley ABA was found, the highest amount of ABA being detected in the shoots of control plants (8.63 and 7.08 ng/g), and its amount in plants infected with *F. culmorum* was lower (6.47 and 4.33 ng/g). In the roots, on the third day, the highest amount of ABA was found in the presence of *P. fluorescens* 2137 (0.14 ng/g), and on the eighth day, in the control variant (0.91 ng/g) and in the presence of *P. fluorescens* 2137 (0.11 ng/g). The analysis did not show the presence of ABA in the roots of uninoculated plants in three-day-old plants, and in the inoculated *F. culmorum* on the eighth day.

Thus, inoculation of barley with a *F. culmorum* caused the development of root rot, but this process was not accompanied by an increase in the number of ABA in plants, however, in response to colonization of the roots with *P. fluorescens* 2137, the accumulation of ABA in the roots occurred. A high level of ABA in the roots of an eight-day control plants may be associated with the development of fusarium rot caused by seed infection: immunofluorescence microscopy showed that barley was, although very slightly, infected with a fungus of the genus *Fusarium*, which by 8 days led to the appearance of root rot symptoms. Apparently, the presence of the fungus with reduced aggressiveness, when its amount on the roots increased, caused a strong response in barley that was not observed in response to the infection of barley with the highly aggressive *F. culmorum* strain used in our studies.

It is widely believed that the hormone ABA inhibits defense reactions in plants. However, in our experiment, we did not observe the inhibitory effect of ABA on the expression of the *PAL* gene in roots on the third day of the experiment. The highest level of expression of this protective gene on the third day was observed in the roots of barley plants inoculated with *P. fluorescens* 2137, and in this case amount of ABA increased too. The obtained results correspond to the currently accepted conception of the cross-suppression of various plant defense systems (ABA signaling and others) as a complex process, the result of which depends on the plant genotype, as well as the infectious strategy, which applies to both phytopathogens and biocontrol microorganisms.

These studies were funded by RFBR (project 18-016-00111).

**Prokaryotic cell surface biopolymers: bioinformatic analysis**Shchyogolev S.Yu.<sup>1,2</sup>, Burygin G.L.<sup>1,3</sup>, Pyatibratov M.G.<sup>4</sup><sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia;<sup>2</sup>Saratov National Research State University named after N.G. Chernyshevsky, Saratov, Russia; <sup>3</sup>Saratov State AgrarianUniversity named after N.I. Vavilov, Saratov, Russia; <sup>4</sup>Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

E-mail: shegolev\_s@ibppm.ru

**Key message.** Using the example of a number of representatives of bacteria and archaea, the structure of their cell surface biopolymers is considered, taking into account post-translational modifications of proteins and contemporary views on the features of protein folding.

**Keywords:** bacteria, archaea, flagellins, archellins, bioinformatics

The experience of applying molecular modeling for studying the structure and post-translational modifications of flagellins, pilins, and archellins of a number of prokaryotes using the appropriate bioinformatic resources is discussed. We also used these results to optimize genetic engineering work on the modification of archellins for their use in creating nanomaterials with targeted properties. Given the intrinsically disordered protein regions found *in silico*, the role of contemporary views on the features of protein folding in the interpretation of the results obtained is noted. Taking into account some experimental data reported in the literature, possibilities and limitations of programs for predicting carbohydrate attachment sites for glycosylation of flagellins and pilins (in bacteria) and of archellins (in archaea) are evaluated. The probability of alternative folding, i.e. obtaining two protein models with significantly different 3D structures and functions (flagellin and S-layer protein) for a single amino acid sequence, is demonstrated using a set of tools for homologous and template modeling of protein structures (I-TASSER, SwissModel, Modeller) for bacteria of the genera *Azospirillum*, *Niveispirillum*, and *Nitrospirillum*. These proteins are annotated as “hypothetical proteins” in NCBI entries, with the N- and C-terminal domains pf00669 and pf00700 characteristic of flagellins in the UniProt entries. The fundamental possibility of the existence of proteins with drastically different 3D structures and with identical amino acid sequences has been demonstrated [1] by the example of experimental results collected in the PDB database of protein structures. From the PDB database, two most probable alternative templates (flagellin from *Salmonella typhimurium*, 1UCU, and the S-layer protein from *Caulobacter crescentus*, 5N8P) were selected by the I-TASSER program and used to build the alternative models. These models were also confirmed by us using the SwissModel and Modeller programs. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 19-04-00613 A).

**Биополимеры клеточной поверхности прокариотов: биоинформатический анализ**Щеголев С.Ю.<sup>1,2</sup>, Бурьгин Г.Л.<sup>1,3</sup>, Пятибратов М.Г.<sup>4</sup><sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия;<sup>2</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов,Россия; <sup>3</sup>Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов, Россия; <sup>4</sup>Институт белка Российской академии наук, Пушино, Россия

**Аннотация.** На примере ряда представителей бактерий и архей рассматривается строение биополимеров их клеточной поверхности с учетом посттрансляционных модификаций белков и современных представлений об особенностях белкового фолдинга.

**Ключевые слова:** бактерии, археи, флагеллины, археллины, биоинформатика

Обсуждается опыт применения молекулярного моделирования в исследованиях структуры и посттрансляционных модификаций флагеллинов, пилинов и археллинов ряда прокариотов с использованием соответствующих биоинформатических ресурсов. Эти результаты были задействованы нами также в оптимизации генно-инженерных работ по модификации археллинов с целью создания на их основе наноматериалов с заданными свойствами. Отмечается роль современных представлений об особенностях белкового фолдинга в интерпретации получаемых результатов с учетом обнаруживаемых *in silico* областей внутренней структурной неупорядоченности белков. Принимая во внимание известные из литературы экспериментальные данные, мы оценивали возможности и ограничения программ для предсказания сайтов присоединения углеводов при гликозилировании флагеллинов и пилинов (бактерии) и археллинов (археи). С использованием набора средств гомологичного моделирования и моделирования по шаблону структур белков (I-TASSER, SwissModel, Modeller) для бактерий родов *Azospirillum*, *Niveispirillum* и *Nitrospirillum* продемонстрирована вероятность реализации альтернативного фолдинга – получения для одной аминокислотной последовательности двух моделей белков с существенно различающейся 3D-структурой и функцией (флагеллин и белок S-слоя). В записях NCBI эти белки аннотированы как «hypothetical protein», с характерными для флагеллинов N- и C-концевыми доменами pf00669 и pf00700 в записях UniProt. Принципиальная возможность существования белков с радикально отличающейся 3D-структурой, чьи аминокислотные последовательности идентичны на 100%, была показана в работе [1] на примере результатов экспериментов, аккумулярованных в базе данных белковых структур PDB. Именно из базы данных PDB программой I-TASSER были отобраны два наиболее вероятных альтернативных шаблона (флагеллин из *Salmonella typhimurium*, 1UCU, и белок S-слоя из *Caulobacter crescentus*, 5N8P), использованные программой I-TASSER для построения альтернативных моделей, подтвержденных нами дополнительно с применением программ SwissModel и Modeller.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-04-00613 A).

[1] Kosloff M., Kolodny R. Sequence-similar, structure-dissimilar protein pairs in the PDB. *Proteins*. – 2008. – Vol. 71, No. 2. – P. 891-902.

## The effect of bacterial strains on the transcriptional activity of genes of the RNA interference system in wheat (*Triticum*) infected with *Septoria*

Shein M.Yu., Burkhanova G.F., Maksimov I.V.  
Institute of Biochemistry and genetics UFRC RAS  
E-mail: mikeshenoda@yandex.com

**Key message.** In wheat, the level of expression of *DCL4* and *AGO1* genes correlated with resistance to the pathogen *S. nodorum*. The transcriptional activity of these genes increased when treated with strains of *B. subtilis* 26D and *B. thuringiensis* 11.

**Keywords:** RNA interference, *Stagonospora nodorum*, wheat, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*

It is well known that RNA interference (RNAi) plays an important role in the formation of an immune response against viruses, but little is known about its participation in protecting plants from pathogenic fungi. The key components in this process are DCL and AGO proteins. DCL proteins initiate the formation of short double-stranded fragments of target RNAs due to their RNase activity. AGO proteins bind these fragments and use them as a cliché to recognize mRNA of target genes. The goal of the research was to assess the role of the *AGO1* and *DCL4* genes in the resistance of wheat *Triticum aestivum* to the pathogen *Stagonospora nodorum* Berk in the presence of endophytic strains of bacteria. Common wheat Tulaykovskaya 108 and Salavat Yulaev were used in the experiment. The first variety proved to be resistant, and the latter was susceptible *S. nodorum*. A comparative analysis of the expression of *TaDCL4* and *TaAGO1* genes showed that its level correlates with resistance to pathogen. Treatment of wheat with bacterial strains *B. subtilis* 26D and *B. thuringiensis* 11 demonstrated that the combined effect of bacteria and the fungus greatly increased the activity of the genes of interest. This effect was more pronounced in variety Salavat Yulaev, which indicates the possibility of priming resistance to *Septoria* in wheat using endophytic bacterial strains.

This work was supported by Russian Foundation for Basic Research grant №17-29-08014.

## Влияние бактериальных штаммов на транскрипционную активность генов системы РНК-интерференции на растениях пшеницы (*Triticum*) при инфицировании возбудителем септориоза

Шейн М.Ю., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В.  
Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

**Аннотация.** У пшеницы уровень экспрессии генов *DCL4* и *AGO1* коррелировал с устойчивостью к патогену *S. nodorum*. Количество транскриптов этих генов также возрастало при обработке штаммами *Bacillus subtilis* 26Д и *Bacillus thuringiensis* 11.

**Ключевые слова:** РНК-интерференция, *Stagonospora nodorum*, пшеница, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*

Хорошо известно, что РНК-интерференция (РНКи) играет важную роль в формировании иммунного ответа против вирусов, но о ее участии в защите растений от патогенных грибов известно мало. Ключевыми компонентами в этом процессе являются белки DCL и AGO, где первые, обладая РНКазной активностью, инициируют формирование коротких двухцепочечных фрагментов целевых РНК, а вторые, связывая их, используют в качестве клише для распознавания мРНК генов-мишеней. Соответственно, цель работы – оценить роль генов *AGO1* и *DCL4* в устойчивости пшеницы *Triticum aestivum* к возбудителю септориоза *Stagonospora nodorum* Berk в присутствии эндофитных штаммов бактерий.

В эксперименте были использованы сорта мягкой яровой пшеницы Тулайковская 108 и Салават Юлаев. Первый сорт оказался устойчив, а второй – восприимчив к грибу *S. nodorum*. Сравнительный анализ экспрессии генов *TaDCL4* и *TaAGO1* показал, что её уровень коррелирует с устойчивостью к патогену. При иммунизации пшеницы штаммами бактерий *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* 11 было показано, что совместное воздействие на растения и бактерий, и гриба многократно повышало активность исследуемых генов. В наибольшей степени этот эффект проявлялся у сорта Салават Юлаев, что говорит о возможности праймирования устойчивости к септориозу у пшеницы с участием эндофитных штаммов бактерий.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ-офи № 17-29-08014.

## Variability of actinomycete complexes in the rhizosphere of transgenic and intact tobacco lines

Shirokikh I.G., Nazarova Ya.I.

Federal Scientific Agricultural Center of the North-East named N.V. Rudnitskiy, Kirov, Russia

E-mail: irgenal@mail.ru

**Key message.** The results on the detection of changes in model microbial complexes formed in the rhizosphere of transgenic tobacco plants with enhanced antioxidant (*FeSOD 1*) and osmoprotective (*codA*) protection are presented.

**Keywords:** *Fe* superoxide dismutase, cholin oxidase, heterologous genes, streptomycetes, taxonomic and functional structure

To ensure the environmental safety of production of transgenic crops, whose world areas are constantly expanding, an assessment of their possible impact on the soil microbial system, in particular on rhizospheric microbial complexes, is necessary. The relevance of studying actinobiota in the rhizosphere of transgenes is due to the variety of aspects of its interaction with the plant.

The goal is a comparative characterization of actinomycete complexes in the rhizosphere of transgenic and intact tobacco lines when grown under normal and stressful soil conditions.

Transgenic lines with altered oxidative and osmotic status and intact tobacco lines were grown in an artificial climate on two different soil backgrounds. Actinomycetes ( $\geq 15$  isolates from each plant) were isolated using selective techniques and media. Colonies were taken into account according to morphotypes. The taxonomic position of the strains of dominant morphotypes was determined based on the analysis of 16S rRNA (Synthol, Moscow) and phenotypic characters. We studied cellulolytic and antifungal properties, the ability to produce auxins, and sensitivity to antibiotics.

Significant differences were found between the actinomycete complexes of the original variety and transgenic tobacco lines with the *FeSOD 1* gene in the frequency of occurrence of auxin producing strains, strains with antifungal activity, and cellulolytics. The revealed changes may result in violations of such natural processes as biodegradation in the soil of cellulose and biocontrol of phytopathogens. In the rhizosphere of plants with the heterologous *codA* gene, on the contrary, no significant changes were found in the taxonomic structure, the occurrence of streptomycetes-cellulolytics and antagonists of phytopathogenic fungal. Differences in the functional structure of actinomycete complexes in the rhizosphere of intact and transgenic lines are characterized by variation, which is comparable in magnitude to variation due to the influence of other factors, for example, soil background. The authors are grateful to G.N. Raldugina (IPP RAS) and E.N. Baranova (ARRIAB) for providing test-tube tobacco plants with heterologous inserts. This work was supported by RFBR grant No. 19-016-00207.

## Вариативность актиномицетных комплексов в ризосфере трансгенных и интактных линий табака

Широких И.Г., Назарова Я.И.

Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого, Киров, Россия

**Аннотация.** Представлены результаты по детекции изменений в модельных микробных комплексах, формирующихся в ризосфере трансгенных растений табака с усиленной антиоксидантной (*FeSOD 1*) и осмопротекторной (*codA*) защитой.

**Ключевые слова:** *Fe*-супероксиддисмутаза, холиноксидаза, гетерологичные гены, стрептомицеты, таксономическая и функциональная структура

Актуальность. Для обеспечения экологической безопасности производственных посевов трансгенных культур, мировые площади которых постоянно расширяются, необходима оценка их возможного воздействия на почвенную микробную систему, в особенности – на ризосферные микробные комплексы. Актуальность изучения актинобиоты в ризосфере трансгенов обусловлена многообразием аспектов ее взаимодействия с растением.

Цель – сравнительная характеристика комплексов актиномицетов в ризосфере трансгенных и интактных линий табака при выращивании в обычных и стрессовых почвенных условиях.

Методы. Трансгенные линии с измененным окислительным и осмотическим статусом и исходный сорт Самсун выращивали в условиях искусственного климата на двух различных почвенных фонах. Актиномицеты ( $\geq 15$  изолятов с каждого растения) выделяли, применяя селективные приемы и среды. Колонии учитывали по морфотипам. Таксономическое положение штаммов доминирующих морфотипов определяли на основе анализа 16S рРНК (Синтол, Москва) и фенотипических признаков. Изучали целлюлозолитические и антифунгальные свойства, способность к продукции ауксинов, чувствительность к антибиотикам.

Результаты. Между актиномицетными комплексами исходного сорта и трансгенных линий табака с усиленной антиоксидантной защитой установлены достоверные различия по частоте встречаемости на корнях штаммов, способных к продукции ауксинов, с антифунгальной активностью и целлюлозолитиков. Следствием выявленных перестроек могут стать нарушения таких природных процессов, как биодеструкция в почве целлюлозы и биоконтроль фитопатогенов. В ризосфере растений с измененным осмотическим статусом, напротив, не обнаружено значимых изменений в таксономической структуре, встречаемости стрептомицетов-целлюлозолитиков и антагонистов фитопатогенных грибов. Различия в функциональной структуре комплексов актиномицетов в ризосфере исходного сорта и трансгенных линий характеризуются варьированием, которое по величине сопоставимо с варьированием, обусловленным воздействием других факторов, например – почвенного фона.

Авторы выражают благодарность Г.Н. Ралдугиной (ИФР РАН) и Е.Н. Барановой (ВНИИСХБ) за предоставление пробирочных растений табака с гетерологичными вставками. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-016-00207.

**Biological efficiency of a complex microbial preparation against root rots of cereals in model and field experiments**Shmyga E.Yu.<sup>1</sup>, Sidarenka A.V.<sup>1</sup>, Sviridov A.V.<sup>2</sup>, Korzhenevskij O.Ch.<sup>2</sup>, Mandrik-Litvinkovich M.N.<sup>1</sup>,Kuptsov V.N.<sup>1</sup>, Kalamiyets E.I.<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; <sup>2</sup>Grodno State Agrarian University, Grodno, Belarus

E-mail: kozich.katyusha@mail.ru

**Key message.** The influence of microbial preparation on the development of root rots in cereals was studied. It was found that the biological efficiency against root rot of oat in the model experiment was 65.0 %, and in the field experiment on winter triticale – 30.1-44.8 %.

**Keywords:** microbial preparation, root rot, biological efficiency, yield

One of the main problems in the cultivation of grain crops is the development of root rots leading to significant crop losses. The use of microbial preparations allows to protect cereals from phytopathogens, to raise the immune potential of plants, to cause a beneficial effect on the fertility and phytosanitary status of the soil, as well as to improve the quality of products.

The purpose of the work is to evaluate the biological efficiency of a complex microbial preparation against root rots of cereals in model and field experiments.

In the model experiment, the effect of the microbial preparation on the development of fusarial root rot of oat was studied in pots with soil infected with a pure culture of the fungus *Fusarium avenaceum* in concentration  $1 \cdot 10^4$  spores/g of soil. In field experiments, the microbial preparation was applied on the autumn stubble before sowing and during vegetation of winter triticale accompanied by disking disposal of straw and milling of straw.

Complex microbial preparation based on sporulating bacterial strains of genus *Bacillus* showing antimicrobial, nitrogen-fixing, phosphate-mobilizing, cellulolytic and growth-stimulating activities was developed. It was found in the model experiment that pretreatment of oat seeds with 10 % working solution of microbial preparation reduces root rot exposure of 10-day seedling on average by 25 %, providing 65 % biological efficiency (BE). Field trials demonstrated that supply of biopreparation before sowing winter triticale and during spring vegetation season coupled to straw utilization resulted in a fair 3.6 t/ha rise of grain yield (BE 30.1 %). Pre-sowing application of biopreparation combined with barley straw ploughing in for soil fertilization and extra addition of nitrogen ensured increase of winter triticale grain productivity by 3.9 t/ha (BE 44.8 %).

**Биологическая эффективность комплексного микробного препарата против корневых гнилей злаков в модельных и полевых опытах**Шмыга Е.Ю.<sup>1</sup>, Сидоренко А.В.<sup>1</sup>, Свиридов А.В.<sup>2</sup>, Корженевский О.Ч.<sup>2</sup>, Мандрик-Литвинкович М.Н.<sup>1</sup>,Куццов В.Н.<sup>1</sup>, Коломиец Э.И.<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь; <sup>2</sup>УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно, Беларусь

**Аннотация.** Изучено влияние микробного препарата на развитие корневых гнилей злаковых культур. Установлено, что биологическая эффективность в отношении корневых гнилей овса в модельном опыте составила 65,0 %, а в полевом опыте на озимом тритикале – 30,1-44,8 %.

**Ключевые слова:** микробный препарат, корневые гнили, биологическая эффективность, урожайность

Одной из основных проблем при возделывании зерновых культур является развитие корневых гнилей, приводящих к значительным потерям урожая. Использование микробных препаратов позволяет защищать злаки от фитопатогенов, повышать иммунитет растений, оказывать благотворное действие на плодородие и фитосанитарное состояние почвы, а также повышать качество продукции.

Цель работы – оценить биологическую эффективность применения комплексного микробного препарата против корневых гнилей злаков в модельных и полевых опытах.

В модельном опыте влияние микробного препарата на развитие фузариозных корневых гнилей овса изучали в сосудах с почвой, инфицированной чистой культурой гриба *Fusarium avenaceum* в концентрации  $1 \cdot 10^4$  спор/г почвы. В полевых опытах микробный препарат вносился осенью по стерне до посева и во время вегетации озимого тритикале на фоне отчуждения и измельчения соломы.

Разработан комплексный микробный препарат на основе штаммов спорообразующих бактерий рода *Bacillus* с антимикробной, азотфиксирующей, фосфатмобилизующей, целлюлолитической и ростостимулирующей активностями. В условиях модельного опыта установлено, что предварительная обработка семян овса 10 %-ным рабочим раствором микробного препарата снижает поражаемость 10-дневных всходов корневыми гнилями в среднем на 25 %, обеспечивая биологическую эффективность (БЭ) на уровне 65 %. В полевом опыте показано, что внесение препарата перед посевом озимого тритикале и по вегетации весной на фоне отчуждения соломы позволило получить достоверную прибавку урожайности зерна на уровне 3,6 ц/га (БЭ составила 30,1 %). Применение препарата перед посевом на фоне использования соломы ячменя для заправки на удобрение с дополнительным внесением азота обеспечивало прибавку урожайности зерна озимого тритикале 3,9 ц/га (БЭ составила 44,8 %).



**Specific cytochromes P450 and adrenodoxin-like mitochondrial ferredoxins as components of the progesterone hormone system of higher plants involved in comprehensive protection from biotic and abiotic stresses**

Shpakovski D.G.<sup>1</sup>, Shematorova E.K.<sup>1</sup>, Babak O.G.<sup>2</sup>, Slovoxotov I.Yu.<sup>1</sup>, Spivak S.G.<sup>2,3</sup>, Khaliluev M.R.<sup>4</sup>, Doludin Yu.V.<sup>1</sup>, Klykov V.N.<sup>1</sup>, Baranova E.N.<sup>4</sup>, Tereshonkova T.A.<sup>5</sup>, Kilchevsky A.V.<sup>2</sup>, Shpakovski G.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; <sup>3</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus; <sup>4</sup>All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia; <sup>5</sup>Federal Research Center of Vegetable Growing, Moscow Region, Vereya, Russia

E-mail: yushpak57@mail.ru

**Key message.** In plants, along with the brassinosteroid, the older progesterone hormone system also functions. We have characterized some components of this system and shown its importance for enhancing plant immunity.

**Keywords:** cytochromes P450, MFDX1 and MFDX2, tobacco, tomato, abiotic and biotic stresses

Recently, it was found that in plants, along with brassinosteroid, yet another, progesterone system of steroid hormonal regulation functions [1-3]. In this work on plants of the *Solanaceae* family (tobacco, tomato, potato), using genetic (transgenesis, yeast two-hybrid system), biochemical (TLC, chromatography-mass spectrometry, organelle fractionation, ELISA), morpho-physiological (obtaining and analysis of suspension and callus cultures, seed priming, cytophotometry), instrumental (light and transmission electron microscopies) and bioinformatics (search for distant homologous proteins, phylogenetic reconstruction) approaches, the first components of the progesterone system have been characterized (a number of plant-specific cytochromes P450s, mitochondrial ferredoxins MFDX1 and MFDX2, progesterone membrane receptors and co-receptors MSBP1, MSBP2 and BIK1) and its importance for the formation of comprehensive plant protection against biotic (infection with such fungal and bacterial phytopathogens as *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp., *Oidium neolycopersici* and *Cladosporium fulvum*) and abiotic (drought, salinity, low temperatures) stresses was shown. The parallelism of action and antagonism of the brassinosteroid and progesterone systems of hormonal regulation in higher plants are discussed.

The work was carried out with the financial support of the RFBR (projects # 18-04-01262 and # 18-54-00038) and the BRFB (project # B18R-135).

**Специфические цитохромы и аденодоксинподобные ферредоксины митохондрий как компоненты прогестероновой гормональной системы высших растений, участвующей в комплексной защите от биотических и абиотических стрессов**

Шпаковский Д.Г.<sup>1</sup>, Шематорова Е.К.<sup>1</sup>, Бабак О.Г.<sup>2</sup>, Словохотов И.Ю.<sup>1</sup>, Спивак С.Г.<sup>2,3</sup>, Халилуев М.Р.<sup>4</sup>, Долудин Ю.В.<sup>1</sup>, Клыков В.Н.<sup>1</sup>, Баранова Е.Н.<sup>4</sup>, Терешонкова Т.А.<sup>5</sup>, Кильчевский А.В.<sup>2</sup>, Шпаковский Г.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Государственное научное учреждение Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь; <sup>3</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь; <sup>4</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия; <sup>5</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства (ВНИИО) – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства», Московская область, Раменский район, Верея, Россия

**Аннотация.** В растениях, наряду с брассиностероидной, функционирует и более древняя прогестероновая гормональная система. Нами охарактеризованы некоторые компоненты этой системы и показана её важность для повышения иммунитета растений.

**Ключевые слова:** цитохромы P450, MFDX1 и MFDX2, табак, томат, абиотические и биотические стрессы

Недавно установлено, что в растениях, наряду с брассиностероидной, функционирует и другая, прогестероновая система стероидной гормональной регуляции [1-3]. В данной работе на примере растений семейства *Solanaceae* (табак, томат, картофель) с помощью генетических (трансгенез, дрожжевая двухгибридная система), биохимических (ТСХ, хромато-масс-спектрометрия, фракционирование органелл, ИФА), морфо-физиологических (получение суспензионных и каллусных культур, праймирование семян, цитофотометрия), инструментальных (трансмиссионная электронная микроскопия) и биоинформационных подходов охарактеризованы первые компоненты прогестероновой системы (ряд специфичных для растений цитохромов P450, митохондриальные ферредоксины MFDX1 и MFDX2, мембранные рецепторы и ко-рецепторы прогестерона MSBP1, MSBP2 и BIK1) и показана её важность для формирования комплексной защиты растений от биотических (инфекции фитопатогенами *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp., *Oidium neolycopersici* и *Cladosporium fulvum*) и абиотических (засуха, засоление, низкие температуры) стрессов. Обсуждаются параллелизм действия и антагонизм брассиностероидной и прогестероновой систем гормональной регуляции у высших растений.

Работа поддержана грантами РФФИ (проекты № 18-04-01262 и № 18-54-00038) и БРФФИ (проект № B18P-135).

1. Спивак С.Г., Бердичевец И.Н., Литвиновская Р.П., Драч С.В., Картель Н.А., Шпаковский Г.В. Некоторые особенности метаболизма стероидов в трансгенных растениях табака *Nicotiana tabacum*, несущих кДНК *CYP11A1* цитохрома P450scs из коры надпочечников быка. Биоорганическая химия, **36** (2): 241-250 (2010).
2. Шематорова Е.К., Словохотов И.Ю., Халилуев М.Р., Бердичевец И.Н., Баранова Е.Н., Бабак О.Г., Шпаковский Д.Г., Спивак С.Г., Шпаковский Г.В. Митохондрии как возможное место инициации синтеза стероидных гормонов в растениях. Журнал стресс-физиологии и биохимии, **10** (4): 85-97 (2014).
3. Shpakovski G.V., Spivak S.G., Berdichevets I.N., Babak O.G., Kubrak S.V., Kilchevsky A.V., Aralov A.V., Slovoxotov I.Yu., Shpakovski D.G., Baranova E.N., Khaliluev M.R., Shematorova E.K. A key enzyme of animal steroidogenesis can function in plants enhancing their immunity and accelerating the processes of growth and development. BMC Plant Biology, **17** (Suppl 1): 189 (2017).

**The receptor-like kinase RLK4 from Solanaceae family plants contributes to immune response**

Shrub K.V., Kolubako A.V., Nikolaichik Y.A.

Belarusian State University, Minsk, Belarus

Email: shrubkaterina@gmail.com

**Key message.** The gene of receptor-like kinase *sbRLK4* of *Solanum bulbocastanum* was characterised. We show that silencing of *RLK4* leads to intensification of plant immune response.

**Keywords:** receptor-like kinase *RLK4*, *Solanaceae*, *Pectobacterium carotovorum*, virus-induced gene silencing

*Pectobacterium carotovorum* causes “blackleg” of stems and soft rot of potato tubers, which can result in severe yield loss. Plant cultivars resistant to *P. carotovorum* do not exist, and the plant's immune response to contact with this pathogen is poorly understood.

**Aim.** To establish the role of receptor-like kinase *RLK4* in plant immune response.

**Methods.** Molecular cloning, sequencing, virus-induced silencing. To induce gene silencing in *Nicotiana benthamiana* plants, we used *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 with TRV-based virus constructs. To study defence responses, plants were infiltrated with cell suspensions of wild-type *P. carotovorum* strain and strains with mutations in the *dspE* effector gene and its secretion regulator gene *hrpL*. Defence-related gene expression levels were estimated via qPCR.

We have previously found a group of related receptor protein kinases that interact with *DspE*, the main effector protein of *P. carotovorum*. In this work, a gene *sbRLK4* of *Solanum bulbocastanum* encoding another protein from this receptor group was cloned and characterized. Alignment of the *sbRLK4* sequence with the reference genome of *S. tuberosum* showed the presence of 26 differing nucleotides, 9 of them lead to amino acid substitutions. *N. benthamiana* plants with silenced *sbRLK4* ortholog give a stronger hypersensitive reaction in response to infiltration with *P. carotovorum* suspensions, regardless of strain. Moreover, a hypersensitive reaction also developed in response to the infiltration with a control 10 mM  $MgSO_4$  solution, which was not observed in plants without silencing. Since *P. carotovorum* is a necrotroph, such reaction of the host plant leads to an increase in susceptibility to the pathogen and successful colonisation of plants. We are currently comparing expression levels of defence-related genes in plants with and without *RLK4* silencing to determine the reason behind stronger response. We also plan to study the effects of *RLK4* overexpression, in the hope to increase pathogen resistance.

**Роль рецепторподобной киназы RLK4 растений семейства Solanaceae в иммунном ответе на внедрение Pectobacterium carotovorum**

Шруб Е.В., Колубако А.В., Николайчик Е.А.

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

**Аннотация.** В ходе исследования впервые охарактеризован ген рецепторподобной киназы *sbRLK4* растений *Solanum bulbocastanum*. Показано, что снижение экспрессии *RLK4* в растениях ведет к интенсификации защитного ответа хозяина.

**Ключевые слова:** рецепторподобная киназа *RLK4*, *Solanaceae*, *Pectobacterium carotovorum*, вирус-индуцированный сайленсинг генов

Патоген *Pectobacterium carotovorum* вызывает «черную ножку» стеблей и мягкую гниль клубней картофеля, что является причиной снижения урожайности. Устойчивых к *P. carotovorum* сортов растений не существует, а иммунный ответ растений на контакт с этим патогеном малоизучен.

**Цель.** Установить роль рецепторподобной киназы *RLK4* в иммунном ответе растений сем. Пасленовых на заражение *P. carotovorum*.

Молекулярное клонирование, секвенирование, вирус-индуцированный сайленсинг. Для индукции сайленсинга генов в растениях *Nicotiana benthamiana* использован штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 с конструкциями на основе вируса TRV. Для воссоздания патосистемы Пасленовые – пектобактерии, растения были инфильтрованы суспензиями клеток штаммов *P. carotovorum* дикого типа и мутантов по генам эффектора *dspE* и регулятора его секреции *hrpL*.

Ранее у растений разных видов сем. Пасленовые мы выявили группу родственных рецепторных протеинкиназ, взаимодействующих с *DspE* – основным эффекторным белком *P. carotovorum*. В этой работе клонирован и охарактеризован ген *sbRLK4* дикого вида картофеля *Solanum bulbocastanum*, кодирующий еще один белок из этой группы рецепторов. Выравнивание последовательности *sbRLK4* относительно референсного генома *S. tuberosum* показало наличие 26 отличающихся нуклеотидов, 9 из которых приводят к аминокислотным заменам. Заражение модельных растений *N. benthamiana* с сайленсингом ортолога *sbRLK4* и сравнение их с контрольными растениями показало увеличение интенсивности реакции гиперчувствительности в ответ на инфильтрацию суспензиями *P. carotovorum* вне зависимости от штамма. Более того, реакция гиперчувствительности также развивалась в ответ на инфильтрацию контрольного 10 mM раствора  $MgSO_4$ , чего не наблюдалось у растений без сайленсинга. Поскольку *P. carotovorum* является некротрофом, такая реакция растения-хозяина приводит к увеличению восприимчивости к патогену и успешной колонизации растений. В настоящий момент производится измерение уровней экспрессии защитных генов в растениях с сайленсингом *RLK4* в ответ на развитие пектобактериоза, результаты будут представлены в докладе. В дальнейшем планируется исследовать эффекты увеличения уровня экспрессии *RLK4*, что может повысить устойчивость растений к *P. carotovorum*.

**Metabolic alterations in pea leaves and roots during arbuscular mycorrhiza development**

Shtark O.Y.<sup>1</sup>, Puzanskiy R.K.<sup>2,3</sup>, Avdeeva G.S.<sup>2</sup>, Yemelyanov V.V.<sup>2</sup>, Kliukova M.S.<sup>1</sup>, Shavarda A.L.<sup>4</sup>, Kirpichnikova A.A.<sup>2</sup>, Afonin A.M.<sup>1</sup>, Tikhonovich I.A.<sup>1,2</sup>, Zhukov V.A.<sup>1</sup>, Shishova M.F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Faculty of Biology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia; <sup>3</sup>Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia; <sup>4</sup>Center for Molecular and Cell Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia  
E-mail: oshtark@yandex.ru

**Key message.** A shift in the metabolic profiles of leaves and roots of mycorrhized pea plants towards the profiles of control plants at earlier stages of development was revealed. Thus, mycorrhization led to the retardation of plant development.

**Keywords:** pea (*Pisum sativum* L.), arbuscular mycorrhiza, leaves, roots, metabolic profile

For the proper use of arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis in agriculture, a detailed understanding of the molecular basis of the plant developmental response to mycorrhization is needed. Information for pea (*Pisum sativum* L.) is scarce and its biochemical aspects need further study. The aim of this work was to uncover the metabolic alterations in pea leaves and roots associated with root colonization by the fungus *Rhizophagus irregularis*. Plants were grown in constant environmental conditions under phosphate deficiency. Plants were analyzed at three time points, which corresponded to key developmental stages of the pea – I: first leaf with two pairs of leaflets and a complex tendril; II: the first open flower; and III: when the pod is filled with green seeds. Metabolome was analyzed with gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). Data were processed in the environment of the R language. Both the leaf and root metabolic profiles showed a strong correlation with plant age, and, to a lesser extent, was influenced by mycorrhization. Metabolic shifts influenced the levels of sugars, amino acids and other intermediates of nitrogen and phosphorus metabolism, and lipophilic compounds. Significant differences were revealed between the metabolic profiles of roots and leaves, as well as between those of individual organs at distinct time points. Particularly, in the roots of AM plants at stage II (characterized by the most intensive AM development) higher levels of fatty acids in comparison to roots of both the control plants and the AM plants at other stages were observed. At stages II and III, both the leaf and root metabolic profiles of AM plants shifted towards the profiles of the control plants at earlier developmental stages. Thus, mycorrhization led to the retardation of plant development, which was also associated with an extended vegetation period. A similar effect was found earlier in relation to the level of pea seed maturity [1]. These effects promise to be beneficial for agriculture, especially for the green pea cultivars which are harvested before seed maturation. This work is supported by the grants of RSF (16-16-00118, 17-76-30016) and RFBR (20-04-01136).

**Метаболомные перестройки в листьях и корнях гороха в процессе развития арбускулярной микоризы**

Штark O.Ю.<sup>1</sup>, Пузанский Р.К.<sup>2,3</sup>, Авдеева Г.С.<sup>2</sup>, Емельянов В.В.<sup>2</sup>, Ключкова М.С.<sup>1</sup>, Шаварда А.Л.<sup>4</sup>,  
Кирпичникова А.А.<sup>2</sup>, Афонин А.М.<sup>1</sup>, Тихонович И.А.<sup>1,2</sup>, Жуков В.А.<sup>1</sup>, Шишова М.Ф.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>Биологический факультет Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия; <sup>3</sup>Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия; <sup>4</sup>Центр молекулярных и клеточных технологий Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Выявлено смещение профилей метаболитов листьев и корней микоризованных растений гороха в сторону профилей контрольных растений на более ранних стадиях развития. Таким образом, микоризация привела к замедлению развития растений.

**Ключевые слова:** горох (*Pisum sativum* L.), арбускулярная микориза, листья, корни, профиль метаболитов

Для рационального использования арбускулярной микоризы (AM) в сельском хозяйстве необходимо детальное понимание молекулярных основ ответа растения на микоризацию. Информация о горохе (*Pisum sativum* L.) недостаточна, в частности, дальнейшего изучения требуют биохимические аспекты ответа растения на микоризацию. Данная работа посвящена анализу метаболомных перестроек в листьях и корнях гороха, связанных с колонизацией корней грибом *Rhizophagus irregularis*. Растения были выращены в условиях климатической камеры при дефиците доступного фосфата. Растения анализировали в трех временных точках, что соответствовало ключевым стадиям развития гороха: I – первый лист с двумя парами листочков и сложным усиком; II – первый раскрытый цветок; и III – боб, заполненный зелеными семенами. Анализ метаболома производили с использованием газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией (GC-MS). Полученные данные обработаны в среде языка R. Профили метаболитов как листа, так и корня продемонстрировали сильную корреляцию с возрастом растения и, в меньшей степени, находились под влиянием микоризации. Метаболические сдвиги затрагивали уровни сахаров, аминокислот и других промежуточных продуктов метаболизма азота и фосфора, а также липофильных соединений. Выявлены существенные различия между профилями метаболитов корней и листьев, а также профилями отдельных органов на разных стадиях. В частности, на стадии II (характеризующейся наиболее интенсивным развитием AM) в корнях микоризованных растений наблюдались более высокие уровни жирных кислот, по сравнению с корнями как контрольных, так и микоризованных растений на других стадиях. На стадиях II и III как метаболические профили листьев, так и корней растений AM смещались в сторону профилей контрольных растений, находящихся на более ранних стадиях развития. Таким образом, микоризация привела к замедлению развития растений, что также было ассоциировано с более продолжительным вегетационным периодом. Сходный эффект был обнаружен ранее в отношении степени зрелости семян гороха [1]. Наблюдаемые эффекты могут быть полезны для сельского хозяйства, особенно при выращивании сортов гороха, уборку которых производят до полного созревания семян. Работа поддержана грантами РФ (16-16-00118, 17-76-30016) и РФФИ (20-04-01136).

**In vivo callus formation on the surface of tubers of Manchu tubergourd (*Thladiantha dubia*, Cucurbitaceae)**Shvets D.Yu.<sup>1</sup>, Kuluev B.R.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Bashkir State University, Ufa, Russia; <sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: shvetsdasha99@yandex.ru

**Key message.** For the first time, shingles of callus-like structures were found in *Thladiantha dubia*. Of these formations, shoots and roots are intensively regenerated in vivo. Such a mechanism underlies the active vegetative propagation and wide distribution of this invasive species.

**Keywords:** invasive species, callus, callus formation, Manchu tubergourd, vegetative propagation.

*Thladiantha dubia* Bunge (Manchu tubergourd) is a perennial herb from the *Cucurbitaceae* family, which has a high invasive potential in anthropogenically disturbed areas. This is mainly due to the increased ability of this plant to intensive vegetative propagation through tubers. The characteristics of *T. dubia* tubers that allow this plant to multiply intensively remained unknown. Therefore, the aim of our work was to study shoot formation and root formation on the surface of slices of *T. dubia* tubers in vivo. For experiments, we used tubers of local (invasive) form, collected in the village of Ukarlino (55°1'53"N, 56°29'3"E.) of the Republic of Bashkortostan (Russia). Two months after harvesting, the tubers were washed with warm soapy water, then tap water and rinsed 2-3 times with distilled water. Each tuber was divided into 3-4 pieces and placed in 200 ml vessels with moistened filter paper and closed with a plastic lid on top. Vegetation vessels were stored in a light room at a temperature of 25°C and a light intensity of 4 klux.

As a result of our work, we first discovered a new type of callus-like structures formed on the surface of both native and cut tubers in invasive forms of *T. dubia*. After one week of incubation, it was from these callus-like structures that both shoots and roots began to regenerate. Cutting the tubers into small pieces had a stimulating effect on the formation of such structures. From almost every callus-like structure, the intensive formation of shoots and roots occurred, and the number of the latter was always less.

Based on our data, it can be suggested that the *T. dubia* is vegetatively propagated by small pieces of tubers due to the ability to induce organogenesis on the surface of tubers through the formation of callus-like structures. We suggest that it is such a feature that allows this species to spread rapidly in cultivated lands.

**Каллусообразование in vivo на поверхности клубней тладианты сомнительной (*Thladiantha dubia*, Cucurbitaceae)**Швец Д.Ю.<sup>1</sup>, Кулуев Б.Р.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Башкирский государственный университет, Уфа, Россия; <sup>2</sup>Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

**Аннотация.** Впервые у *Thladiantha dubia* обнаружены опоясывающие каллусоподобные структуры, из которых в условиях in vivo интенсивно регенерируют побеги и корни. Такой механизм лежит в основе активного вегетативного размножения и широкого распространения данного инвазионного вида растений.

**Ключевые слова:** вегетативное размножение, инвазионный вид, каллус, каллусообразование, тладианта сомнительная.

Тладианта сомнительная (*Thladiantha dubia* Bunge) – многолетнее травянистое растение из семейства тыквенных (*Cucurbitaceae*), обладающее довольно высоким инвазионным потенциалом на антропогенно-нарушенных территориях. Это обуславливается, главным образом, повышенной способностью этого растения к интенсивному вегетативному размножению через клубни. Особенности клубней *T. dubia*, которые позволяют этому растению интенсивно размножаться, оставались неизвестными. Исходя из этого, целью нашей работы было изучение побего- и корнеобразования на поверхности кусочков клубней *T. dubia* в условиях in vivo. Для опытов были использованы клубни местной (инвазионной) формы, собранные в селе Укарлино (55°1'53" с. ш. 56°29'3" в. д.) Республики Башкортостан. Через два месяца после сбора клубни промывали теплой мыльной водой, затем водопроводной и 2-3 раза споласкивали дистиллированной водой. Каждый клубень разделяли на 3-4 кусочка и помещали в сосуды объемом 200 мл с увлажненной фильтровальной бумагой и сверху закрывали пластиковой крышкой. Вегетационные сосуды держали в световой комнате при температуре 25°C и интенсивности света около 4 клк.

В результате нашей работы, впервые обнаружен новый тип каллусоподобных структур, образующихся на поверхности как нативных, так и разрезанных клубней у инвазионных форм *T. dubia* в условиях in vivo. Через одну неделю инкубации именно из этих каллусоподобных структур начинали регенерировать как побеги, так и корни. Разрезание клубней на маленькие кусочки оказывало стимулирующее влияние на образование каллусоподобных структур. Почти из каждой каллусоподобной структуры происходило интенсивное формирование побегов и корней, причем количество последних всегда было меньше.

На основании наших данных можно предположить, что тладианта сомнительная активно размножается вегетативно небольшими кусочками клубней благодаря способности индуцировать органогенез на поверхности клубней через образование каллусоподобных структур. Мы полагаем, что именно такая особенность позволяет данному виду стремительно распространяться в обрабатываемых человеком землях.

### Molecular diagnostics of bacterial and fungal plant diseases

Sidarenka A.V., Bareika H.A., Valentovich L.N., Paturemski D.S., Kuptsou V.N., Titok M.A., Kalamiyets E.I.

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

E-mail: a\_sidarenka@mbio.bas-net.by

**Key message.** Taxon-specific primers were developed and PCR conditions were optimized for diagnostics of bacterial and fungal plant pathogens. Methods for phytopathogens DNA isolation from plant material, soil and water were selected.

**Keywords:** phytopathogenic microorganisms, plant diseases, PCR diagnostics

Diseases of agricultural crops caused by phytopathogenic bacteria and fungi lead to significant crop losses, reduced commodity and food quality of the products, and pose a serious threat to food security in any country. A key aspect of the fight against plant diseases of bacterial and fungal etiology is an early and accurate diagnosis of the pathogen, which allows targeted selection and timely application of protectants, and effective measures to prevent mass infection. In recent years, molecular diagnostics of plant pathogens based on PCR has been gaining popularity. Its advantages include high specificity, sensitivity and quickness of analysis.

Objective: to develop a system for PCR diagnostics of bacterial and fungal pathogens of agricultural crops.

Methods: isolation and cultivation of phytopathogenic microorganisms was carried out according to standard methods; commercial kits and protocols described in the literature were used to isolate DNA; designing primers and checking their specificity was performed using *on-line* programs; optimal PCR conditions were selected experimentally.

Results: collection of phytopathogenic bacteria and fungi isolated on the territory of the Republic of Belarus was created. Genus- and species-specific primers were developed and conditions of standard and multiplex PCR, real-time PCR were optimized for the diagnosis of bacterial and fungal pathogens of agricultural crops. It was shown that PCR with developed primers is characterized by high specificity for target pathogens, sensitivity and performance. Effective protocols for isolating of pathogens DNA from plant material, seeds, soil (root substrate), and water were selected. Methods for genotyping phytopathogenic bacteria to reveal strain differences were optimized. The developed system for PCR diagnostics of agricultural crops pathogens was successfully tested to detect and identify pathogenic microorganisms in seeds and plants of tomato, cucumber, pepper, carrot, garlic, samples of soil and water, provided by greenhouse complexes and farms of the Republic of Belarus.

### Молекулярная диагностика болезней растений бактериальной и грибной этиологии

Сидоренко А.В., Барейко А.А., Валентович Л.Н., Потуремский Д.С., Купцов В.Н., Титок М.А., Коломиец Э.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

**Аннотация.** Разработаны таксонспецифичные праймеры и оптимизированы условия ПЦР для диагностики бактериальных и грибных патогенов растений. Подобраны методы выделения ДНК фитопатогенов из растительного материала, почвы, воды.

**Ключевые слова:** фитопатогенные микроорганизмы, болезни растений, ПЦР-диагностика

Болезни сельскохозяйственных культур, вызываемые фитопатогенными бактериями и грибами, приводят к существенным потерям урожая, снижению товарных и пищевых качеств получаемой продукции, и представляют серьезную угрозу продовольственной безопасности любой страны. Ключевым аспектом борьбы с болезнями растений бактериальной и грибной этиологии является ранняя и точная диагностика патогена, позволяющая целенаправленно подбирать и своевременно применять средства защиты, предпринимать эффективные меры для предотвращения массового заражения. В последние годы популярность приобретает молекулярная диагностика возбудителей болезней растений, основанная на ПЦР, к преимуществам которой относятся высокая специфичность, чувствительность и быстрота анализа.

Цель работы: разработка системы ПЦР-диагностики бактериальных и грибных патогенов сельскохозяйственных культур.

Методы: выделение и культивирование фитопатогенных микроорганизмов осуществляли по общепринятым методикам; для выделения ДНК использовали коммерческие наборы и описанные в литературе методы; конструирование праймеров и проверку их специфичности проводили с помощью *on-line* программ; оптимальные условия ПЦР подбирали экспериментально.

Результаты: создана коллекция фитопатогенных бактерий и грибов, выделенных на территории Республики Беларусь. Разработаны родо- и видоспецифичные праймеры, оптимизированы условия стандартной и мультиплексной ПЦР, ПЦР в реальном времени для диагностики бактериальных и грибных возбудителей болезней сельскохозяйственных культур. Показано, что ПЦР с разработанными праймерами характеризуется высокой специфичностью к целевым патогенам, чувствительностью и производительностью. Подобраны эффективные методы выделения ДНК патогенов из растительного материала, семян, почвы (корневого субстрата), воды. Оптимизированы методы генотипирования фитопатогенных бактерий для выявления штаммовых различий. Разработанная система ПЦР-диагностики возбудителей болезней сельскохозяйственных культур успешно апробирована для выявления и идентификации патогенных микроорганизмов в семенах и растениях томата, огурца, перца, моркови, чеснока, образцах почвы и воды, предоставленных тепличными комбинатами и фермерскими хозяйствами Республики Беларусь.

### The influence of cultivation conditions of promising *Bacillus subtilis* strains on their ability to produce antifungal metabolites

Sidorova T.M., Asaturova A.M., Khomyak A.I.

FSBSI All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection, Krasnodar, Russia

E-mail: 0166505@mail.ru

**Key message.** Antifungal compounds, including surfactin and iturin A, are accumulated by *B. subtilis* BZR336g strain at the cultivation temperature of 20.0-25.0 ° C and the nutrient medium acidity pH8.0, for *B. subtilis* BZR517 strain these parameters are 30.0-35.0 ° C and pH8.0-10.0, respectively.

**Keywords:** antifungal compounds, iturin A, surfactin, chromatography, bioautography

The production of antifungal compounds is the basis of the strategy for the phytopathogenic fungi control with *B. subtilis* bacteria, among which cyclic lipopeptides (surfactins, iturins, fengicins) have been studied to a greater extent (Caulier et al., 2019). Variants and ratios of synthesized lipopeptides depend not only on the strain, but also largely on the conditions of cultivation of the bacterium.

Aim. The study of the optimal cultivation parameters of *B. subtilis* BZR336g and *B. subtilis* BZR517 strains that contribute to the maximum production of antifungal metabolites.

Isolation and analysis of synthesized by *B. subtilis* BZR336g and BZR517 strains (bioresource collection of the FSBSI VNIIBZR «State collection of entomocaricidic and microorganisms») as well as commercial (surfactin, iturin A produces by Sigma-Aldrich) lipopeptides were performed using the method of upward thin-layer chromatography (Merck kieselgel plates (Germany), layer thickness 2 mm), mobile phase: ethyl acetate-ethanol-water (40:15:15). After analyzing the chromatograms under UV light at a wavelength of 366 nm, the plates were impregnated with a potato-glucose nutrient medium, then a suspension of propagules of test fungus (*F. oxysporum* var. *orthoceras*) was applied and placed in a humid chamber at a temperature of 28 ° C for 48 h. The localization of active components was judged by the formation of zones of the test fungus growth inhibition (Sidorova et al., 2019).

When comparing the obtained lipopeptide profiles with commercial surfactin (Rf 0.76) and iturin A (Rf 0.28), we found that both strains produce both the first and the second lipopeptide, and *B. subtilis* BZR336g accumulates surfactin and iturin A more than *B. subtilis* BZR517 strain. The analysis of bioautograms of the synthesized metabolites allows us to state that surfactin and iturin A are best produced at a temperature of 20.0-25.0 ° C for *B. subtilis* BZR336g strain and 30.0-35.0 ° C for *B. subtilis* BZR517 strain. A bioautographic study of the culture fluids of the studied strains also showed that pH 8.0 is most optimal for the synthesis of surfactin and iturin A by *B. subtilis* BZR336g, and the acidity index is 8.0-10.0 for *B. subtilis* BZR517 strain.

The studies were carried out in accordance with State Assignment No. 075-00376-19-00 of the Ministry of science and higher education of the Russian Federation as part of research on the topic No. 0686-2019 0013.

### Влияние условий культивирования перспективных штаммов *Bacillus subtilis* на их способность продуцировать антигрибные метаболиты

Сидорова Т.М., Асатурова А.М., Хомяк А.И.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений, Краснодар, Россия

**Аннотация.** Антигрибные соединения, включая сурфактин и итурин А, накапливаются штаммом *B. subtilis* BZR336g при температуре культивирования 20,0-25,0°C и кислотности питательной среды pH8,0, для штамма *B. subtilis* BZR517 эти параметры 30,0-35,0°C и pH8,0-10,0, соответственно.

**Ключевые слова.** Антигрибные соединения, итурин А, сурфактин, хроматография, биоавтография

Актуальность. Производство противогрибных соединений является основой стратегии борьбы бактерий *B. subtilis* с фитопатогенными грибами, среди которых в большей степени изучены циклические липопептиды (сурфактины, итурины, фенгицины) (Caulier et al., 2019). Варианты и соотношения синтезируемых липопептидов зависят не только от штамма, но и в значительной степени от условий культивирования бактерии.

Цель. Изучение оптимальных параметров культивирования штаммов *B. subtilis* BZR336g и *B. subtilis* BZR517, способствующих максимальному продуцированию антигрибных метаболитов.

Методы. Выделение и анализ липопептидов, синтезируемых штаммами *B. subtilis* BZR336g и BZR517 (биоресурсная коллекция ФГБНУ ВНИИБЗР «Государственная коллекция энтомокарифагов и микроорганизмов»), а также коммерческих липопептидов (сурфактин, итурин А фирмы Sigma-Aldrich), проводили методом восходящей тонкослойной хроматографии (кieselгелевые пластины «Merck» (Германия), толщина слоя 2мм), подвижная фаза: этилацетат-этанол-вода (40:15:15). После анализа хроматограмм под УФ-светом (366нм) пластины пропитывали картофельно-глюкозной питательной средой, наносили суспензию пропагул тестового гриба (*F. oxysporum* var. *orthoceras*) и помещали во влажную камеру при температуре 28°C на 48ч. О локализации активных компонентов судили по формированию зон подавления роста тест - гриба (Сидорова с соавт., 2019).

При сравнении полученных липопептидных профилей с коммерческими сурфактином (Rf 0.76) и итурином А (Rf 0.28) обнаружено, что оба штамма продуцируют как первый, так и второй липопептид, причем штамм *B. subtilis* BZR336g накапливает сурфактин и итурин А в большей степени, чем штамм *B. subtilis* BZR517. Анализ биоавтограмм синтезируемых метаболитов позволяет констатировать, что в наибольшей степени сурфактин и итурин А продуцируются при температуре 20,0-25,0°C – для штамма *B. subtilis* BZR336g и 30,0-35,0°C – для штамма *B. subtilis* BZR517. Биоавтографическое исследование культуральных жидкостей изучаемых штаммов также показало, что для синтеза сурфактина и итурина А штаммом *B. subtilis* BZR336g наиболее оптимален pH 8,0, а для штамма *B. subtilis* BZR517 показатель кислотности 8,0-10,0.

Исследования выполнены согласно Государственному заданию № 075-00376-19-00 Министерства науки и высшего образования РФ в рамках НИР по теме №0686-2019 0013.

1. Caulier S., Nannan C., Gillis A., Licciardi F., Bragard C., Mahillon J. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. Front. Microbial., 2019, 10:302.
2. Сидорова Т.М., Асатурова А.М., Хомяк А.И., Томашевич Н.С. Выделение и характеристика антигрибных метаболитов штаммов *Bacillus subtilis* BZR 336g и *Bacillus subtilis* 517 модифицированным методом биоавтографии. Сельскохозяйственная биология, 2019, том 54, № 1, с. 178-185.

### Study of the kinetics of sorption of heavy metal ions by dry biomass of cyanobacteria

Skugoreva S.G.<sup>1,2</sup>, Kantor G.Ya.<sup>1,2</sup>, Domracheva L.I.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Vyatka State University, Kirov, Russia; <sup>2</sup>Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS, Syktyvkar, Russia; <sup>3</sup>Vyatka State Agricultural Academy, Kirov, Russia

E-mail: skugoreva@mail.ru

**Key message.** Sorption of copper (II), lead (II) and cadmium ions from a solution with a concentration of  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L by dry biomass of cyanobacteria *Fischerella muscicola* occurred 1.4-1.9 times faster than *Nostoc paludosum*. The sorption rate of lead and copper ions was 1.9-2.6 times higher compared to cadmium ions.

**Keywords:** Cyanobacteria, sorption kinetics, sorption kinetics models, sorption capacity, sorption rate

Biosorption is one of the effective technologies for treating wastewater and soils contaminated with heavy metals (HM). Microorganisms are used as effective biosorbents, among which cyanobacteria (CB) have a rather high sorption potential in relation to HM.

The purpose of the study was to characterize the sorption ability of cyanobacteria *Fischerella muscicola* and *Nostoc paludosum* with respect to copper (II), lead (II) and cadmium ions.

CB was cultivated for 3 months on Gromov's medium without nitrogen, then CB biomass was thoroughly washed from the nutrient medium with distilled water, dried to constant weight, and ground. A 50 mL TM nitrate solution with a concentration of  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L was poured into a glass, a magnet, an ion-selective electrode, a pH electrode and a two-key reference electrode were immersed in a solution, a magnetic stirrer was turned on, and then the data reception program for the ionomer "Expert-001". Quickly put in a glass with a solution a sample of dry biomass CB (average weight of 50.0 mg). In describing the kinetics of sorption, pseudo-first and pseudo-second-order models, a modified second-order model, and the Elovich's model were used. The values of the parameters of the kinetic models were found by the least squares method using the add-on "Solution Search" of the Microsoft Office Excel software package.

To describe the kinetics of sorption of HM ions, the most acceptable was a modified second-order model ( $r^2 = 0.9305-0.9891$ ). This model assumes that the sorption process limits the ion exchange reaction. The sorbent capacity is characterized by the equilibrium specific gravity of the sorbate, which did not differ much for different ions and types of CB, varying from 93.57 to 108.66  $\mu\text{mol/g}$  of sorbent.

The kinetic coefficient of sorption, which characterizes the rate of sorption, varied over a wider range from 0.039 to 0.185 s<sup>-1</sup>. The smallest coefficient values were calculated for cadmium ions; the rate of sorption of lead and copper ions was 1.9-2.6 times higher. The sorption rate of HM *F. muscicola* was 1.4-1.9 times higher than *N. paludosum*.

During sorption, along with a decrease in the concentration of HM ions in solution, a decrease in the concentration of protons ( $r = 0.9234-0.9884$ ) occurred, i.e. an increase in the pH of the solution was noted. A more significant increase in pH (by 1.52-1.76 pH units) occurred during sorption of *F. muscicola* than during sorption of *N. paludosum* (by 0.58-0.80 units). This fact may be due to the ion-exchange mechanism of HM sorption not with protons, but with other cations, for example, potassium, magnesium or calcium ions, which are contained in the sorbent.

This work was carried out as part of the state assignment of Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS No. 0414-2018-0003.

**Detection and primary characterization of *Rothia amarae* in a suspension culture of *Arabidopsis thaliana* (Heynh.) cells**

Sokolov A.O., Dykman L.A., Galitskaya A.A., Sokolov O.I.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

E-mail: sokolov\_a@ibppm.ru

**Key message.** The presence of non-pathogenic bacterial microflora in *Arabidopsis thaliana* suspension culture has been shown to coexist latently with plant cells for a long time. According to the results of 16S rRNA sequencing, it was shown that the detected bacteria belong to the species *Rothia amarae*. Using microbiological, microscopic and immunochemical methods, the correspondence of the obtained strain to the species *Rothia amarae* was also confirmed.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, plant cell suspension culture, bacteria

*Arabidopsis thaliana* is a model plant used commonly in genetic and molecular-biological research. In the standard maintenance of an *A. thaliana* suspension culture, transfers are made every 10 days, with no visual signs of bacterial or other contamination being observed. However, when growth is extended to 20 and more days or when the culture conditions (temperature, aeration, etc.) are disrupted, the medium thickens and gets turbid, and suspended matter appears in the supernatant liquid. This makes it possible to assume that the culture now contains a bacterial microflora.

Here we tested a suspension culture of *A. thaliana* cells for the presence of bacteria. The tests were followed by the identification of the bacteria. A 10-day-old plant cell culture was filtered, and bacteria were isolated by centrifugation. After sedimentation at 3000 g for 10 min, the supernatant liquid was centrifuged again at 20000 g 30 min. The resulted bacterial pellet was identified on the basis of their 16S rRNA sequence by polymerase chain reaction (PCR) by using a set of universal primers. For specific detection of bacteria in a suspension culture of *A. thaliana*, we obtain a rabbit polyclonal antibody. Confocal and electron microscopy, dynamic light scattering, microbiological methods and immunocytochemical methods are also used in the work. We have shown the ability of the bacteria to grow on blood and tryptone-soya agar preserving the morphological and immunochemical properties of the isolate. An isolated bacteria as veritable symbiont of *A. thaliana* suspension culture remains open in communication with plants.

This work was supported in part by the Russian Foundation for Basic Research (grant no. 18-04-00469).

**Первичная характеристика бактерий *Rothia amarae*, обнаруженных в суспензионной культуре клеток *Arabidopsis thaliana* (Heynh.)**

Соколов А.О., Дыкман Л.А., Галицкая А.А., Соколов О.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

**Аннотация.** Показано присутствие в суспензионной культуре *Arabidopsis thaliana* непатогенной бактериальной микрофлоры длительное время, латентно сосуществующей с растительными клетками. По результатам секвенирования 16S рРНК показано, что обнаруженные бактерии принадлежат к виду *Rothia amarae*. При помощи микробиологических, микроскопических и иммунохимических методов также подтверждено соответствие полученного штамма виду *Rothia amarae*.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana*, суспензионная культура растительных клеток, бактерии

*Arabidopsis thaliana* – модельное растение, широко используемое для проведения генетических и молекулярно-биологических исследований. При стандартном поддержании суспензионной культуры клеток *A. thaliana* пересадка происходит каждые 10 дней. При этом в культуре не выявляется никаких визуальных признаков бактериальных или иных загрязнений. Однако при более длительном культивировании (20 и более суток) или при нарушении условий выращивания (температурный режим, аэрация и др.) среда загущается, мутнеет и в надосадочной жидкости появляется взвесь. Это позволило предположить, что в поддерживаемой культуре может присутствовать бактериальная микрофлора. Целью работы была проверка суспензионной культуры клеток *A. thaliana* на бактериальное присутствие с последующей идентификацией микроорганизмов. Выделение бактерий проводили последовательным центрифугированием суспензии растительных клеток. После осаждения клеток растения при 3000 g 10 мин, полученный супернатант подвергали второму центрифугированию при 20000 g 30 мин. Осадок бактерий подвергали дальнейшему исследованию.

Идентификацию выделенных бактерий проводили методом ПЦР по 16S рРНК с использованием набора универсальных праймеров. Для специфической детекции присутствия бактерий в суспензионной культуре клеток *A. thaliana* были получены кроличьи поликлональные антитела. В работе также использовали конфокальную и электронную микроскопию, метод динамического светорассеяния, микробиологические методы и иммуноцитохимические методы. Выделенные бактерии можно культивировать на кровяном и триптон-соевом агаре с сохранением морфологических и иммунохимических свойств полученного штамма. Является ли выделенная бактерия истинным симбионтом суспензионной культуры *A. thaliana* остается открытым в контексте взаимодействий с растениями.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 18-04-00469.



doi:

**Biochemical features of phoma-like fungi**Sokornova S.V.<sup>1</sup>, Shavarda A.L.<sup>2</sup>, Gusenkov E.A.<sup>3</sup>, Emelianov D.A.<sup>3</sup>, Frolova G.M.<sup>1</sup><sup>1</sup>All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Saint Petersburg State University, Research park, Centre for molecular and cell technologies, Russia; <sup>3</sup>Saint-Petersburg State Institute of Technology, 190013, Russia  
E-mail: svokornova@vizr.spb.ru

**Key message.** Biochemical analysis of phoma-like fungi showed significant differences in the phosphatidic acid and glycosceramides levels and close values of phosphatidylcholine / phosphatidylethanolamine, trehalose, arabitol, mannitol, sorbitol levels.

**Keywords:** phospholipids, polyols, trehalose, phoma-like micromycetes, mycoherbicides

Phoma-like micromycetes are considered as the potential mycoherbicides for the biocontrol of perennial weed and invasive plants. Prediction of efficacy and stability bioherbicides in field, drying survival, wintering ability etc. is based on analysis of structural lipids, polyols and trehalose levels. [1-2]. The aim of this work is to analyze these compounds in the deep mycelium of phoma-like strains: *Stagonospora cirsii* C-211, *Calophoma complanata* 32.121, *Didymella macrostoma* 32.52. The mycelium was grown on the sucrose-soy medium until the early stationary phase of growth. To the polar lipids analyze mycelium was extracted by modified method [3]. The HPTLC plate was developed in chloroform-methanol-water-25% ammonia (65:30:4:2). Staining was carried out with a copper sulfate / sulfuric acid reagent in methanol under heating. The absorbance was measured at 550 nm [2]. To definition of the carbohydrate levels mycelium was extracted by 80% ethanol at 80°C. Chromatography was carried out on a HPTLC plate silica gel 60 using n-butanol-i-propanol-acetic acid-2% boric acid solution (6:14:1:3). Staining was carried out with the aniline diphenylamine *o*-phosphoric acid reagent under heating. The absorbance was measured at 370 nm. Polyol acetate carbohydrate derivatives were analyzed using an Agilent 5975 (column: Agilent Technologies, HP-5ms, 30 m x 0.250 mm, 0.25 mm [1].

The phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidic acid (PA) and glucosylceramides (GC) was identified in the polar lipids fraction. The ratio and proportion of PC and PE was the same for the all strains. In the same time the *C. complanata* 32.121 mycelium contained one and a half times more PA and significantly less GC than other strains. PA is a key component of phospholipids homeostasis and a secondary messenger involved in intracellular signaling in eukaryotes. The PA levels in fungi usually does not exceed 1%. This aspect would certainly require further study.

In all extracts was dominated by disaccharide trehalose and polyols: arabitol, mannitol and sorbitol. The assessment of the carbohydrate levels may be an additional criterion for predicting the stress resistance of mycoherbicides based on phoma-like micromycetes. This work was supported by RSF grant 16-16-00085.

**Биохимические особенности фомоидных микромицетов**Сокоорнова С.В.<sup>1</sup>, Шаварда А.Л.<sup>2</sup>, Гусенков Е.А.<sup>3</sup>, Емельянов Д.А.<sup>3</sup>, Фролова Г.М.<sup>1</sup><sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, научный парк, РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий», Санкт-Петербург, Россия; <sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный технологический институт, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Биохимический анализ фомоидных грибов показал достоверные различия содержания фосфатидной кислоты и гликоцерамидов, близкие значения для фосфатидилхолина/ фосфатидилэтанолamina, трегалозы, арабитола, маннитола, сорбитола.

**Ключевые слова:** фосфолипиды, полиолы, трегалоза, фомоидные микромицеты, микогербициды

Среди потенциальных микогербицидов, разрабатываемых для борьбы с многолетней сорной и инвазивной растительностью, есть фомоидные микромицеты. Прогноз эффективности и стабильности в полевых условиях, устойчивости к высушиванию, способности переносить зимовку и пр., может основываться на данных о содержании структурных липидов, полиолов и трегалозы [1-2]. Цель работы: анализ содержания этих соединений в глубинном мицелии штаммов фомоидных грибов: *Stagonospora cirsii* C-211, *Calophoma complanata* 32.121, *Didymella macrostoma* 32.52. Мицелий выращивали на сахарозо-соевой среде до ранней стационарной фазы роста. Анализ полярных липидов проводили путем экстракции модифицированным методом [3], с последующим разделением на пластинах HPTLC Silica gel 60 F254 в системе хлороформ-метанол-вода-25% аммиак (65:30:4:2), визуализацией реактивом сульфата меди при нагревании и детектировании при 550 нм [2]. Анализ углеводов мицелия проводили путем экстракции 80% этанолом при 80°C. ВЭТСХ проводили в системе н-бутанол-изопропанол-уксусная кислота-2% борная кислота (6:14:1:3). Окраску проводили реагентом анилин-дифениламин-фосфорная кислота при нагревании и детектировании при 370 нм. Полиолы анализировали в виде силильных производных на приборе Agilent с масс-селективным детектором 5975, колонкой HP-5MS, 30 м×0.25 мм [1]. В составе фракции полярных липидов идентифицировали фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидную кислоту (ФК) и гликоцерамиды (ГлЦер). Доля и соотношение ФХ и ФЭ были для всех штаммов одинаковы. В тоже время мицелий *C. complanata* 32.121 содержал в полтора раза больше ФК, чем другие штаммы, и существенно меньшее количество ГлЦер. ФК - ключевой компонент гомеостаза фосфолипидов и вторичный мессенджер клеточных процессов эукариот. Содержание ФК в грибах обычно не превышает 1%, выявленный факт требует дальнейшего изучения.

Доминирующим дисахаридом во всех случаях была трегалоза, а полиолами – арабитол, маннитол и сорбитол. Оценка содержания этих углеводов может быть дополнительным критерием для прогнозирования стресс-устойчивости микогербицидов на основе фомоидных микромицетов. Работа поддержана грантом РФФИ 16-16-00085.

1. Sokornova S, Frolova G, Shavarda A et al. / BIO Web of Conferences 2020, 18, 00028.

2. Фролова ГМ, Сокоорнова СВ, Берестецкий АО / Прикл. биохимия и микробиология. 2019, 55 (5): 506–512.

3. Bligh EG, Dyer WJ / Can. J. Biochem. Physiol. 1959, 37:911–917.

**Mycotoxin degradation by microbial metabolites**

Statsyuk N.V., Shcherbakova L.A., Mikityuk O.D., Nazarova T.A., Dzhevakhya V.G.

All-Russian Research Institute of Phytopathology, Bolshie Vyazemy, Russia

E-mail: nataafg@gmail.com

**Key message.** Extracellular metabolites of *Gliocladium roseum* GRZ7 are able to destroy aflatoxin B1 and zearalenone (by 61.9 and 68%, respectively). The determined optimum pH and temperature confirm the enzymatic nature of these metabolites.

**Keywords:** mycotoxins, zearalenone, microbial degradation, *Gliocladium roseum*

Contamination of plant materials with mycotoxins results in significant economical losses (up to \$16 billion a year) [1]. Physical and chemical methods of decontamination have significant limitations; at the same time, microbial degradation of mycotoxins is considered as a promising line of biotechnological investigation. In the course of search for potential biodestructors of aflatoxin B1 (AFB1), we isolated some microorganisms, which extracellular metabolites possessed the desired activity. The study of their toxin-degrading properties was performed by co-incubation of their culture broth filtrates with target mycotoxins with the further HPLC control of changes in the toxin concentration in the incubation medium. Among the studied microorganisms able to efficiently degrade AFB1, the *Gliocladium roseum* strain GRZ7 was able to convert or destroy zearalenone (ZEN), another one polyketide mycotoxin produced by *Fusarium* fungi. In the case of a 72-h co-incubation with AFB1 (6 µg/ml) or ZEN (0.5 µg/ml) at 27–28°C, the fraction of GRZ7-secreted metabolites with the molecular weight cut-off > 5 kDa was able to destroy no less than 61.9% of AFB1 and 68% ZEN. A 30-min incubation at 50°C of a 5-min boiling (100°C) resulted in a complete deactivation of the studied metabolites; the optimum temperature for the biodegradation process was 30°C. The metabolites are active in the pH range of 6.5–9.5 with the optimum pH 8.5; in the case of pH 5.5 or below, they lost their target activity. The obtained data confirm that the target fraction of extracellular GRZ7 metabolites includes compounds of a protein nature possessing the toxin-destroying activity in relation to AFB1 and ZEN. The further work will allow us to identify zearalenone-destroying enzymes and to evaluate the potential of their use for a biological decontamination of plant products containing mycotoxins.

The study of the ZEN-degrading activity of extracellular GRZ7 metabolites was financially supported by the Russian Science Foundation (project RSF 19-76-10031). The study of the AFB1-degrading activity of these metabolites was carried out within the framework of the earlier completed project RSF 14-16-00150.

**Биодеградация микотоксинов микробными метаболитами**

Стацюк Н.В., Щербакова Л.А., Микитюк О.Д., Назарова Т.А., Дзехахья В.Г.

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Большие Вяземы, Россия

**Аннотация.** Экзометаболиты *Gliocladium roseum* GRZ7 способны разрушать афлатоксин В1 и зearаленон (не менее 61.9 и 68%, соответственно). Установленные оптимумы температуры и pH свидетельствуют о ферментативной природе этих метаболитов.

**Ключевые слова:** микотоксины, зearаленон, микробная деградация, *Gliocladium roseum*

Загрязнение растительной продукции микотоксинами приводит к значительным экономическим потерям (до 16 млрд. долларов в год) [1]. Физические и химические способы деконтаминации имеют существенные ограничения; в то же время, микробная деградация микотоксинов позиционируется как перспективное биотехнологическое направление. В процессе поиска потенциальных биодеструкторов афлатоксина В1 (AFB1) были обнаружены микроорганизмы, экзометаболиты которых обладали целевой активностью. Исследование токсин-деградирующей активности этих метаболитов проводили путем совместного инкубирования фильтрата культуральной жидкости и целевого токсина с последующим определением изменения концентрации токсина в среде методом ВЭЖХ. Среди исследованных микроорганизмов, эффективно деградирующих афлатоксин В1, штамм *Gliocladium roseum* GRZ7 оказался способен разрушать или конвертировать еще один поликетидный микотоксин – зearаленон (ZEN), продуцируемый грибами рода *Fusarium*. При совместной инкубации с AFB1 (6 мкг/мл) или ZEN (0.5 мкг/мл) в течение 72 ч при 27–28°C, фракция секретируемых GRZ7 метаболитов с номинальной отсекаемой молекулярной массой > 5 кДа оказалась способна разрушать не менее 61.9% AFB1 и 68% ZEN. Установлена полная потеря активности метаболитов после термообработки (30 мин при 50°C или 5 мин при 100°C); температурный оптимум для процесса биодеградации соответствует 30°C. Экзометаболиты проявляют активность в диапазоне pH 6.5–9.5 с оптимумом при 8.5; при pH ≤5.5 целевая активность утрачивается. Полученные данные подтверждают присутствие в составе экзометаболитов штамма GRZ7 соединений белковой природы, проявляющих токсин-деградирующую активность в отношении AFB1 и ZEN. Дальнейшие исследования позволят выполнить идентификацию этих соединений и оценить потенциал их использования для биологической деконтаминации растительной продукции, загрязненной микотоксинами.

Изучение ZEN-деградирующей активности экзометаболитов штамма *G. roseum* GRZ7 было выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект РНФ 19-76-10031). Исследование AFB1-деградирующей активности было выполнено в рамках ранее завершеного проекта РНФ 14-16-00150.

### Study of the influence of external factors on the inheritance of forms of dissociants *Pseudomonas mandelii*

Stupak E.E., Vafina G.Kh., Tropynina T.S.

Ufa Institute of Biology, Ufa Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: evgenia\_stupak@mail.ru

**Key message.** Differences in proteolytic, antioxidant, and endoglucanase activity were detected. One of the factors for switching dissociants of the *P. mandelii* strain IB-Ki14 is the pH of the medium; switching and inheritance schemes are drawn up.

**Keywords:** phase variations (phenotypic switching), phenotypic switching factors, *Pseudomonas mandelii*

Bacteria have developed various regulatory strategies to help them adapt to environmental changes. The phenotypic diversity of bacteria on the identical genetic basis (phase variations) is one of them. The phase variations are based on reversible changes in gene activity inherited in cell generations. These processes are the result of a variety of genetic and epigenetic mechanisms: changes in chromatin structure, reversible rearrangements of the genome, modifications of nucleotides and proteins associated with DNA, maintenance of a certain level of transcription factors in a number of cell generations by means of the circulation of signals in cyclic gene systems. The aim of the work was to study the phase variations of *P. mandelii* with the identification of patterns of inheritance and phase switching. In addition, an analysis of antioxidant, proteolytic and endoglucanase activity was carried out, as well as an analysis of the genome methylation of two forms of dissociants. The object of the study was Gram-negative bacteria *Pseudomonas mandelii* placed in the group *P. fluorescens*, strain IB-Ki14 (number in the All-Russian Collection of Microorganisms B-3250). In the experiments, the cells of the strain formed two types of colonies on plates: 1) matted, flat round opaque; 2) mucous, shiny, spreading over the surface. The following factors were used to induce switching: change in cultivation temperature, pH of the medium, amounts of amino acids and sugars, introduction of a source of methyl groups (S-Adenosylmethionine) into the medium. It was shown that one of the main factors for switching dissociants of the *P. mandelii* strain IB-Ki14 is the pH of the medium; according to this factor, switching patterns and inheritance of two forms are compiled. The dissociants showed pronounced differences in proteolytic and antioxidant activity, one of the dissociants has endoglucanase activity, no differences in the dcm-methylases activity were detected.

### Исследование влияния внешних воздействий на наследование форм диссоциантов бактерий *Pseudomonas mandelii*

Ступак Е.Э., Вафина Г.Х., Тропынина Т.С.

Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского Федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

**Аннотация.** Обнаружены различия по протеолитической, антиоксидантной и эндоглюканазной активности. Одним из факторов переключения диссоциантов штамма *P. mandelii* ИБ-Ки14 является pH среды, составлены схемы переключений и наследования.

**Ключевые слова:** фазовые вариации, факторы переключения, *Pseudomonas mandelii*

Бактерии выработали различные регуляторные стратегии, позволяющие им адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. Фенотипическое разнообразие бактерий на единой генетической основе (фазовые вариации) является одной из них. В основе фазовых вариаций лежат обратимые изменения генной активности, наследуемые в клеточных поколениях. Эти процессы являются результатом разнообразных генетических и эпигенетических механизмов: изменения структуры хроматина, обратимых перестроек генома, модификаций нуклеотидов и ассоциированных с ДНК белков, поддержания в ряду клеточных поколений определенного уровня транскрипционных факторов путем циркуляции сигналов в циклических системах генов.

Целью нашей работы было изучение фазовых вариаций у бактерии *P. mandelii* с выявлением схем наследования и переключения фаз. Кроме того, был проведен анализ антиоксидантной, протеолитической и эндоглюканазной активности, а также анализ метилирования генома двух форм диссоциантов. Объектом исследования служили грамтрицательные бактерии вида *P. mandelii* из группы *P. fluorescens*, штамм ИБ-Ки14 (номер во Всероссийской Коллекции микроорганизмов В-3250). Клетки штамма в экспериментах образовывали на чашках два типа колоний: 1) матовые, плоские круглые непрозрачные; 2) слизистые, блестящие, расползающиеся по поверхности. Для индукции переключения были использованы следующие факторы: изменение температуры культивирования, pH среды, изменение содержания в среде аминокислот и сахаров, внесение в среду источника метильных групп (S-Аденозилметионин). Выявлено, что одним из основных факторов переключения диссоциантов штамма *P. mandelii* ИБ-Ки14 является pH среды, по этому фактору составлены схемы переключений и наследования двух форм. У диссоциантов обнаружены выраженные различия по протеолитической и антиоксидантной активности, один из диссоциантов обладает эндоглюканазной активностью, различий по активности dcm-метилаз не выявлено.

## The influence of ferrihydrite nanoparticles on induction and proliferation of *Triticum aestivum* mature embryo callus culture

Stupko V.Yu.<sup>1</sup>, Zobova N.V.<sup>1</sup>, Gurevich Yu.L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Krasnoyarsk Agricultural Research Institute, Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center of the SB of the RAS", Krasnoyarsk, Russia; <sup>2</sup>Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center of the SB of the RAS", Krasnoyarsk, Russian Federation, Krasnoyarsk, Russia

E-mail: stupko@list.ru

**Key message.** The presence of biogenic ferrihydrite nanoparticles at callusogenesis stage decreases the level of necrosis at proliferation stage. Ferrihydrite doesn't influence on callus growth at the second stage, but decreases the percentage of samples with chlorophyll.

**Keywords:** wheat, callus culture, nanoparticles, ferrihydrite

Biogenic ferridyrite (FH) possesses a high catalytic activity for hydrogen peroxide decomposition. Thus, it can influence on the level of active oxygen forms in plant cells and, thereafter, - on their growth and development. The identification of probable points of FH influence on plant cells, using wheat callus culture (CC) as a suitable model system, was the aim of present study.

Callusogenesis was induced in mature embryo culture at Murashige-Skoog media with 2mg/l 2,4-D (control (ICnt)), involving wheat genotypes selected by KrasARI. The experimental media contained 1 (IF1) and 10 (IF10) mg/l of FH. After 1-month calluses (n=50) were moved to proliferation media (P) of the same salt and hormonal composition: to PF1 and PCnt in equal quantities. The callus size, the presence of chlorophyll-containing areas (ChCA) at all stages and the necrosis signs on 30<sup>th</sup> and 44<sup>th</sup> day of cultivation on proliferation media were registered.

The influence of genotype on the callus size at the first stage was confirmed ( $\eta^2=0.22$ ,  $p<0.01$ ). Concentration of FH up to 10 mg/l decreased the callus size ( $p<0.05$ ). While the 1 mg/l of FH didn't results in any changes in culture growth.

The percentage of calluses with necrosis at 30<sup>th</sup> day in CC, moved from IF1, was higher on PF1 media (43.5%) than on PCnt one (27.9%,  $p=0.04$ ). There was no such difference in CC, moved from ICnt. But the level of ChCA decreased twice under these conditions (PF1) compared to the data, recorded on PCnt ( $p=0.01$ ), no matter of callusogenesis induction media composition.

The influence of FH level in induction media on further percentage of sample with necrosis on second stage was marked – 46.2%, 35.7% and 24.5% for CC, moved from ICnt, IF1 and IF10 media, respectively ( $\chi^2=5.89$ ,  $p=0.05$ ).

Thus, in spite of the fact, that FH introduction into the medium in high concentration of 10 mg/l resulted in decrease of induced callus linear growth, the CC, that had developed on such medium, maintained viability much longer. The influence of FH on CC proliferation, that expressed in ChCA percentage decrease and necrotizing calluses level increase, indicates the toxicity of this chemical agent in the present concentration. So, the further investigation of FH lower concentrations influence on CC parameters is required.

## Влияние наночастиц ферригидрита на индукцию и пролиферацию каллусных культур зрелых зародышей *Triticum aestivum*

Ступко В.Ю.<sup>1</sup>, Зобова Н.В.<sup>1</sup>, Гуревич Ю.Л.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Россия; <sup>2</sup>ФИЦ «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Красноярск, Россия

**Аннотация.** Присутствие наночастиц биогенного ферригидрита на этапе каллусогенеза снижает уровень некроза на среде пролиферации. Ферригидрит не влияет на рост каллусов на втором этапе, но уменьшает долю хлорофиллсодержащих образцов.

**Ключевые слова:** пшеница, каллусные культуры, наночастицы, ферригидрит

Биогенный ферригидрит (ФГ) обладает высокой каталитической активностью при разложении пероксида водорода, что может влиять на уровень активных форм кислорода в растительных клетках и, соответственно, - на их рост и развитие. Выявление возможных сайтов воздействия ФГ на растительные клетки с использованием каллусных культур (КК) пшеницы, как удобного модельного объекта, являлось целью настоящей работы.

Каллусогенез индуцировали в культуре зрелых зародышей пшеницы генотипов селекции КрасНИИСХ на среде Мурасиге-Скуга с добавлением 2 мг/л 2,4-Д (контрольный вариант (ICnt)). Опытная среда содержала 1 (IF1) или 10 (IF10) мг/л ФГ. Спустя 1 месяц каллусы (n=50) пассировали на среду пролиферации того же солевого и гормонального состава: на PF1 и PCnt в равных количествах. Фиксировали размер каллусов, наличие хлорофилл-содержащих областей (ХСО) на всех этапах, проявление некроза на 30-е и 44-е сутки на среде пролиферации.

На первом этапе культивирования показано влияние генотипа на размер формируемого каллуса ( $\eta^2=0,22$ ,  $p<0,01$ ). Добавление в среду 10 мг/л ФГ снижало размер каллуса ( $p<0,05$ ), в то время как 1 мг/л ФГ не оказывал эффекта.

На 30-е сутки после пассирования со среды IF1 отмечена большая доля некроза на среде пролиферации с ФГ – 43,5%, против 27,9% на PCnt среде ( $p=0,04$ ). У каллусов со среды ICnt такого эффекта не отмечалось. Наличие ФГ в среде пролиферации не влияло на рост КК. Однако, в этих условиях (PF1), уровень ХСО снижался в 2 раза по сравнению с данными, полученными на среде PCnt ( $p=0,01$ ), независимо от состава среды индукции каллусогенеза.

На 44-е сутки культивирования на средах пролиферации отмечено влияние уровня ФГ в среде индукции на долю некротизированных каллусов на втором этапе, 46,2%, 35,7% и 24,5% - для каллусов, пассированных с ICnt, IF1 и IF10 сред, соответственно ( $\chi^2=5,89$ ,  $p=0,05$ ).

Таким образом, несмотря на то, что внесение ФГ в среду индукции в высокой концентрации 10 мг/л приводило к снижению активного роста индуцированных каллусов, ткани, полученные на данной среде, впоследствии дольше сохраняли свою жизнеспособность. Влияние ФГ на пролиферацию КК, выразившееся в снижении доли ХСО и увеличении доли некроза говорит о токсичности данного агента в заданной концентрации и требует дальнейших исследований в отношении воздействия меньших концентраций на параметры КК.



## Stimulation of anthocyanin pigmentation in *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana tabacum* using CRISPR/Cas9 technology

Sukhareva A.S.<sup>1</sup>, Mikhaylova E.V.<sup>2</sup>, Kuluev B.R.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Bashkir State University, Ufa, Russia; <sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, Ufa, Russia

E-mail: ane4ka.suh@gmail.com

**Key message.** The study is aimed at developing methods for creating plants rich in anthocyanins using the CRISPR/Cas9 genome editing technology to improve consumer and agricultural properties.

**Keywords:** Plant genome editing, CRISPR/Cas9, *Agrobacterium*, anthocyanins

Anthocyanin pigments are flavonoids that have a wide spectrum of biological activity. There is evidence that plants rich in anthocyanins have an advantage in the context of agriculture and human nutrition. In addition, anthocyanin pigmentation can be used as a selective trait for genetically engineered plants, since a change in the color of tissues can be observed with the naked eye. The aim of the study was to modify the plant genome to assess the possibility to create varieties with a high content of anthocyanins using the CRISPR/Cas9 method. The genetic construct pTC223 [1] was intended to introduce a strong constitutive 35S promoter in front of the *ANT1* gene of *Solanum lycopersicum*, which encodes one of the MYB transcription factors. Nevertheless, since tobacco and tomato are related plants, we suggested that the well-known model plant *Nicotiana tabacum* can be transformed with the same construct. An analysis of the literature describing the principles of guide RNA selection [2] and bioinformatic search suggested that the tobacco genome also has a target site in the region of the *CHS6* chalcone synthase gene, which also plays an important role in flavonoid biosynthesis. The plasmid was delivered to tomato plants (Micro-Tom cultivar) and tobacco (Petit Havana cultivar) by *in vitro* and *in planta* agrobacterial transformation [3] with *A. rhizogenes* and *A. tumefaciens*. The number of anthocyanins was determined by pH differential spectrophotometry. After *in vitro* transformation of tomato using *A. tumefaciens*, only a single plant regenerated. It was extremely rich with anthocyanins, as described in original work [1]. During the transformation of tobacco by the same method, brown and pink callus tissues were formed, but all the regenerants did not have anthocyanin pigmentation. As a result of *in vitro* transformation using *A. rhizogenes*, 10 lines of hairy roots of tomato and 28 lines of hairy roots of tobacco were obtained. 73% of the lines contained the target insert (kanamycin resistance gene and 35S promoter), with no agrobacterial contamination. In three lines of tobacco roots, the mass concentration of anthocyanins was 91.8, 5 and 4.2 g/100 g. The remaining tobacco root lines, although brown in color, appeared to accumulate other polyphenolic compounds. Hairy roots of tomato did not differ in color from control and did not contain more anthocyanins. Seedlings from the plants that were transformed *in planta* [3], did not demonstrate any difference in pigmentation from control plants. Thus, genomic editing can be used primarily to study the role of various plant genes, which can presumably affect the economically valuable traits of plants.

The research was carried out according to the state assignment (topic No. AAAA-A16-116020350028-4).

1. Cermak, T., Baltés, N. J., Cegan, R., Zhang, Y., Voytas, D. F. (2015). High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome biology*, 16(1), 232.
2. Gerashchenkov, G. A., Rozhnova, N. A., Kuluev, B. R., Kiryanova, O. Y., Gumerova, G. R., Knyazev, A. V., Vershinina Z. R., Mikhaylova E. V., Chemeris D. A., Matniyazov R. T., Baimiev An. Kh., Gubaidullin I. M., Baimiev Al. Kh., Chemeris A. V. (2020). Design of Guide RNA for CRISPR/Cas Plant Genome Editing. *Molecular Biology*, 54(1), 24-42.
3. Yasmeen, A., Mirza, B., Inayatullah, S., Safdar, N., Jamil, M., Ali, S., Choudhry, M. F. (2009). *In planta* transformation of tomato. *Plant molecular biology reporter*, 27(1), 20-28



### The specificity of nodule symbiosis of legumes in the context of the "arms race" between macro- and microsymbionts

Sulima A.S., Afonin A.M., Maslikova T.I., Zhukov V.A.

ARRIAM; Saint-Petersburg – Pushkin, Russia

E-mail: ASulima@arriam.ru

**Key message.** The specificity of nodule symbiosis of garden pea at different stages was studied. The *Sym2* gene responsible for the specific recognition of microsymbiont has been identified and described. The strain-specificity of symbiosis in two *Fix*-mutants was shown.

**Keywords:** pea, nodule symbiosis, specificity of symbiosis, *Sym2*, ineffective nodules

The nodule symbiosis of legumes (*Fabaceae*) and nitrogen-fixing bacteria from the rhizobia group is an illustration of highly specific endosymbiosis. Using garden pea as an example, it was shown how this specificity can manifest itself at different taxonomic levels and stages of symbiosis. The study of this problem can shed light on the evolution of plant-microbial systems in the context of domestication and help in creating effective complementary pairs of symbionts for agricultural usage.

**Aim:** to study the manifestations of specificity in symbiosis of pea with the bacterium *Rhizobium leguminosarum* at the stages of microsymbiont penetration, persistence in host tissues, and nitrogen fixation.

**Methods:** BAC library screening, TILLING, NGS sequencing (by the Illumina and Oxford Nanopore technologies), as well as classical methods of molecular genetics were used.

**Results:** we identified and thoroughly described the *Sym2* gene responsible for the manifestation of narrow symbiotic specificity in several pea cultivars from the Middle East (the so-called "Afghan" phenotype); *Sym2* was shown to possess two independently arising alleles leading to the "Afghan" phenotype; differences in the manifestation of the "Afghan" phenotype in individual pea variances were revealed; the presence of additional factors affecting the manifestation of the "Afghan" phenotype was confirmed. While studying the interaction between the laboratory strain *Rhizobium leguminosarum* RCAM1026 and *sym25*, *sym26* pea mutants forming inefficient nodules, the strain-specificity of symbiosis was discovered; natural bacterial isolates (3BR352, 1TK341) capable of suppressing the mutant phenotype of *sym25* and *sym26* were found; the search for the genetic determinants of this trait is underway.

The work was supported by the RSF grant № 17-76-30016 and the Government contract № 0664-2020-0022.

### Специфичность клубенькового симбиоза бобовых в контексте «гонки вооружений» между макро-и микросимбионтами

Сулима А.С., Афонин А.М., Масликова Т.И., Жуков В.А.

ФГБНУ ВНИИСХМ; Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Изучена специфичность клубенькового симбиоза гороха посевного на разных стадиях. Выявлен и описан ген *Sym2*, отвечающий за специфичное распознавание микросимбионта. Показана штамм-специфичность симбиоза у двух мутантов *Fix*-.

**Ключевые слова:** горох посевной, клубеньковый симбиоз, специфичность симбиоза, *Sym2*, неэффективные клубеньки

Клубеньковый симбиоз бобовых растений (*Fabaceae*) и азотфиксирующих бактерий из группы ризобий служит иллюстрацией высокоспецифичного эндосимбиоза. На примере гороха посевного показано, как данная специфичность может проявляться на разных таксономических уровнях и стадиях симбиоза. Изучение данной проблемы способно пролить свет на эволюцию растительно-микробных систем в контексте одомашнивания и помочь в создании эффективных комплементарных пар симбионтов для использования в сельском хозяйстве.

**Цель:** изучить проявления специфичности в симбиозе гороха посевного с бактерией *Rhizobium leguminosarum* на стадиях проникновения микросимбионта, персистенции в тканях хозяина и азотфиксации.

**Методы:** использовались методы скрининга ВАС-библиотек, TILLING, NGS-секвенирования (по технологиям Illumina, Oxford Nanopore), а также классические методы молекулярной генетики.

**Результаты:** выявлен и детально описан ген *Sym2*, отвечающий за проявление узкой симбиотической специфичности у форм гороха посевного из Передней Азии (т.н. «афганского» фенотипа); показано, что *Sym2* обладает двумя независимо возникшими аллелями, приводящими к «афганскому» фенотипу; выявлены отличия в проявлении «афганского» фенотипа у отдельных форм гороха; подтверждено наличие дополнительных факторов, влияющих на проявление «афганского» фенотипа. На примере взаимодействия с лабораторным штаммом *Rhizobium leguminosarum* RCAM1026 открыта штамм-специфичность симбиоза у мутантов по генам *Sym25* и *Sym26*, образующих неэффективные клубеньки; выявлены природные изоляты (3BR352, 1TK341), способные супрессировать мутантный фенотип *sym25* и *sym26*; ведётся поиск генетических детерминант данного свойства.

Работа выполнялась при поддержке гранта РФФИ 17-76-30016 и Госзадания № 0664-2019-0022.

### **Stilbene biosynthesis in callus culture of grapes of different resistance to pathogens**

*Sundyreva M.A., Lutsky E.O., Mishko A.E.*

FSBSI NCRRIH&V, Krasnodar, Russia

*E-mail: taurim2012@yandex.ru*

**Key message.** *Low gene expression of CHI and CHS and high expression of PAL and STS were detected in varieties with a high content of stilbenes. A feature of varieties with low stilbene production was a weak level of PAL gene expression.*

**Keywords:** *stilbenes, grapes, callus culture, resistance to pathogens*

Grapes and its products are an important source of stilbenes having the properties of maintaining human health and longevity. Plant cell and tissue cultures have a high proliferation and metabolism rate compared to whole plants. This makes them a convenient system for the biosynthesis of valuable biologically active substances. The purpose of the work was to identify the features of the formation of stilbenes in callus cultures of various grape varieties. Gene expression of chalcone synthase (CHS), chalconisomerase (CHI), phenylalanine ammonia lyase (PAL), stilbensynthase (STS) genes was determined by real-time PCR. The content of stilbenes was determined by capillary electrophoresis. Enzyme activity and total flavonoid content were determined spectrophotometrically. Various passages and the age of the culture did not significantly affect the biosynthesis of stilbenes in callus grapes. Piceid prevailed among stilbenes. High activity of guaiacol peroxidases and polyphenol oxidase was detected in more resistant to pathogens varieties, however, the activity of enzymes did not seem to affect the number of stilbenes. Weakly producing stilbenes callus cultures were characterized by very high expression of CHS, CHI genes with low PAL expression. This confirms the possibility of competitive suppression of the synthesis of stilbenes from the side of the synthesis of chalcones in conditions of substrate deficiency. In general, a feature of the varieties with a lower formation of stilbenes in callus was a weak level of PAL gene expression. Calluses of Krasnostop AZOS and Kober 5BB grape varieties, where the number of stilbenes were higher, are characterized by high expression of PAL genes, the expression of CHI and CHS genes is lower relative to PAL in comparison with weakly producing stilbene grape varieties.

This work was supported by the RFBR and the Ministry of Education and Science of the Krasnodar Territory, grant No. 19-44-233006 r\_mol\_a.

### **Биосинтез стильбенов в каллусной культуре винограда различных по устойчивости к патогенам сортов винограда**

*Сундырева М.А., Луцкий Е.О., Мишко А.Е.*

ФГБНУ СКФНЦСБВ, Краснодар, Россия

**Аннотация.** *Низкая экспрессия генов CHI и CHS и высокая - PAL и STS выявлена у сортов с высоким содержанием стильбенов. Особенностью сортов с низкой выработкой стильбенов был слабый уровень экспрессии гена PAL.*

**Ключевые слова:** *стильбены, виноград, каллусная культура, устойчивость к патогенам*

Виноград и продукты его переработки являются важным источником стильбенов, обладающих свойствами поддержания здоровья и долголетия человека. Культуры клеток и тканей растений обладают большой скоростью пролиферации и метаболизма по сравнению с выращиваемыми растениями, что делает их удобной системой для биосинтеза ценных биологически активных веществ. Цель работы – выявить особенности процессов образования стильбенов в каллусных культурах различных сортов винограда. Экспрессию генов халконсинтазы (CHS), халконизомеразы (CHI), фенилаланинаминлиазы (PAL), стильбенсинтазы (STS) определяли методом ПЦР в реальном времени, содержание стильбенов – методом капиллярного электрофореза, активность ферментов и общее содержание флавоноидов – спектрофотометрическим методом. Различные пассажы и возраст культуры не оказали существенного влияния на биосинтез стильбенов в каллусах винограда. Преобладающим среди стильбенов был пiceiд. Более высокая активность гваяколовых пероксидаз и полифенолоксидазы была выявлена в более устойчивых к патогенам сортах, однако активность ферментов, по-видимому, не оказывала влияния на количество стильбенов. Слабопродуцирующие стильбены каллусные культуры характеризуются очень высокой экспрессией генов CHS, CHI при низкой экспрессии PAL, что подтверждает возможность конкурентного подавления синтеза стильбенов со стороны ветви синтеза халконов при дефиците субстрата. В целом особенностью сортов с более низкой выработкой стильбенов в каллусе был слабый уровень экспрессии гена PAL. Каллусы сортов винограда Краностоп АЗОС и Кобер 5ББ, где количество стильбенов было выше, отличаются высокой экспрессией генов PAL, экспрессия генов CHI, CHS ниже относительно PAL в сравнении со слабопродуцирующими стильбены сортами винограда.

Работа выполнена при поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Краснодарского края, грант № 19-44-233006 p\_mol\_a.

### The effect of sucrose concentration in the culture medium on the formation of abscisic acid and the activity of the photosynthetic apparatus of grape plants *in vitro*

Sundyreva M.A., Rebrov A.N., Mishko A.E., Lutsky E.O.

<sup>1</sup>FSBSI NCRRH&V, Krasnodar, Russia; <sup>2</sup>FSBSI RRIV&W named after Ya.I. Potapenko branch of the FGBNU «FRANZ», Novocherkassk, Russia  
E-mail: taurim2012@yandex.ru

**Key message.** An increase in sucrose in the medium increased the content of pigments, gene expression of the photosynthetic apparatus, growth processes, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but decreased the quantum yield of photosynthesis. With a change in the sucrose content in the medium, the expression of ABA1 increased most intensively. 30 g / l of sucrose in the medium inhibited the expression of genes involved in the formation of ABA.

**Keywords:** grapes, pre-adaptation, composition of the culture medium, photosynthesis, abscisic acid

The difficulty of transferring plants from *in vitro* to non-sterile conditions is associated with the development of water and oxidative stress, a low level of photosynthetic processes, and a poorly developed root system. This requires the selection of *in vitro* conditions that promote pre-adaptation. The study of the physiological mechanism of plant preadaptation will allow more efficient production of planting material, reduce plant losses during acclimatization.

The aim of the study was to determine the effect of the concentration of sucrose in the culture medium on the synthesis of abscisic acid and the activity of the photosynthetic apparatus of grape *in vitro* plants.

The content of pigments, malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide was determined by spectrophotometric methods. Assessment of gene expression was carried out by real-time PCR. Evaluation of the effectiveness of photochemical photosynthesis reactions was carried out using PAM fluorimetry.

High concentrations of sucrose in the medium provoked an increase in the content of photosynthetic pigments, while at the same time they led to a decrease in the quantum yield of photosynthesis and the ratio of chlorophyll A and chlorophyll B. The expression of the genes of the photosynthetic apparatus increased with an increase in the concentration of sucrose in the medium. An increase in the content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in microplants occurred with an increase in the sucrose content in the culture medium. The maximum H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content was observed at 20 and 30 g/l sucrose. The expression of genes involved in the formation of ABA increased with increasing sucrose concentration to 20 g/l. Inhibition of the expression of these genes was detected at a concentration of 30 g/l sucrose in the culture medium. The expression of the ABA1 gene (zeaxanthin epoxidase) changed mainly with a change in the composition of the medium. An increase in the concentration of sucrose in the culture medium led to an increase in the expression of a number of photosynthetic genes and genes involved in the synthesis of ABA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A more efficient functioning of the photosynthetic apparatus was revealed at a low concentration of sucrose in the medium. The reported study was funded by RFBR and Ministry of Education and Science of the Krasnodar Territory, project number 19-44-230037 r-a.

### Влияние концентрации сахарозы в культуральной среде на образование абсцизовой кислоты и активность фотосинтетического аппарата растений винограда *in vitro*

Сундырева М.А., Ребров А.Н., Мишко А.Е., Луцкий Е.О.

<sup>1</sup> ФГБНУ СКФНЦСВВ, Краснодар, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко филиал ФГБНУ «ФРАНЦ», Новочеркасск, Россия

**Аннотация.** Увеличение сахарозы в среде повышало содержание пигментов, экспрессию генов фотосинтетического аппарата, ростовых процессов, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, но снижало квантовый выход фотосинтеза. При изменении содержания сахарозы в среде наиболее интенсивно повышалась экспрессия ABA1. Сахароза 30 г/л в среде ингибировала экспрессию генов, участвующих в образовании АБК.

**Ключевые слова:** виноград, преадаптация, состав культуральной среды, фотосинтез, абсцизовая кислота

Сложность перевода растений из условий *in vitro* в нестерильные условия связана с развитием водного и окислительного стресса, низким уровнем фотосинтетических процессов, слабо развитой корневой системой, что требует подбора условий «в пробирке», способствующих преадаптации. Исследование физиологического механизма преадаптации растений *in vitro* к условиям *ex vitro* позволит более эффективно производить посадочный материал, снизить потери растений в процессе акклиматизации.

Цель – определить влияние концентрации сахарозы в культуральной среде на синтез абсцизовой кислоты и активность фотосинтетического аппарата растений винограда *in vitro*.

Методы. Содержание пигментов, малонового диальдегида (МДА), перекиси водорода определяли спектрофотометрическими методами. Оценка экспрессии генов проводилась методом ПЦР в реальном времени. Оценка эффективности фотохимических реакций фотосинтеза – методом ПАМ-флуориметрии.

Высокие концентрации сахарозы в среде провоцировали повышение содержания фотосинтетических пигментов, в то же время приводили к снижению квантового выхода фотосинтеза и соотношения хлорофилла А и хлорофилла В. Экспрессия генов фотосинтетического аппарата увеличивалась при повышении концентрации сахарозы в среде. Повышение содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в тканях микрорастений происходило параллельно увеличению содержания сахарозы в культуральной среде. Максимальное содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> было отмечено в вариантах опыта 20 и 30 г/л сахарозы. Экспрессия генов, участвующих в образовании АБК, возрастала при повышении концентрации сахарозы до 20 г/л. При концентрации сахарозы в культуральной среде 30 г/л было выявлено полное ингибирование экспрессии данных генов. При изменении состава среды главным образом менялась экспрессия гена ABA1 – зеаксантин эпоксидазы, преобразующей зеаксантин в виолоксантин. Повышение концентрации сахарозы в культуральной среде приводило к повышению экспрессии ряда фотосинтетических генов и генов, участвующих в синтезе АБК, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, в то же время более эффективное функционирование фотосинтетического аппарата выявлено при низкой концентрации сахарозы в среде. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Краснодарского края в рамках научного проекта № 19-44-230037 р-а.



### Phytosanitary effect of the plants – producers of sweet glycosides

Svistova I.D., Kuvshinova N.M.

Voronezh state pedagogical University, Voronezh, Russia

E-mail: i.svistova@mail.ru

**Key message.** In the root zone of plants that accumulate sweet glycosides (honey stevia and naked licorice), a sharp decrease in the phytopathogenic potential of the soil was revealed without increasing its phytotoxic activity.

**Keywords:** phytopathogens, rhizosphere, plants-producers of sweet glycosides

In the rhizosphere of plants, soil properties change, a specific microbiome is formed, the accumulation of phytopathogens and the growth of phytotoxic activity of the soil is possible. To obtain non-metabolized sweet glycosides, non-traditional sugar plants are introduced into the culture. We have previously studied the structure of the saprotrophic microbial community in the root zone of this group of plants [1].

The aim of this work is to study the effect of monoculture of plants producing sweet glycosides (honey stevia, naked licorice) on the infectious potential and development of soil phytotoxicosis. Soil samples were taken in the dynamics of the season under 4-year monocultures of medicinal plants, control-virgin soil. The phytotoxic activity of the soil was evaluated using biotests on soil plates. The species composition, spatial and temporal frequency of occurrence of phytopathogenic species of micromycetes were determined.

The complex of phytopathogens in the control included 9 types of micromycetes, such as pathogens of root rot and leaf-stem diseases. It was found that *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Stemphyllium botryosum*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizoctonia solani*, *Aureobasidium pullulans*, *Drechslera sorokiniana* were not isolated from the soil under the sugar-bearing plants already in the middle of the growing season. In our opinion, the phytosanitary effect of in vivo rhizodeposits of these plants is associated with a decrease in all types of soil acidity (current, exchange, hydrolytic) [2], as well as with the fungicidal effect of their components.

At the same time, the phytotoxic activity of the soil in the root zone of both honey stevia and naked licorice contain 5-12% inhibition of root growth, which did not exceed the control level and the value regulated by state standard.

Thus, growing honey stevia and licorice naked in a 4-year-old monoculture not only does not cause the development of soil fatigue, but these plants can be recommended for recovery of acidified leached chernozems.

### Фитосанитарный эффект растений-продуцентов сладких гликозидов

Свистова И.Д., Кувшинова Н.М.

Воронежский государственный педагогический университет, Воронеж, Россия

**Аннотация.** В прикорневой зоне растений, накапливающих сладкие гликозиды (стевия медовая и солодка голая), выявлено резкое снижение фитопатогенного потенциала почвы без роста ее фитотоксической активности.

**Ключевые слова:** фитопатогены, ризосфера, растения-продуценты сладких гликозидов

В ризосфере растений меняются свойства почвы, формируется специфический микробиом, возможно накопление фитопатогенов и рост фитотоксической активности почвы. Для получения неметаболизируемых сладких гликозидов вводят в культуру нетрадиционные растения-сахароносы. Ранее нами изучена структура сапротрофного микробного сообщества в прикорневой зоне этой группы растений [1].

Цель работы - изучение влияния монокультуры растений-продуцентов сладких гликозидов (стевия медовая, солодка голая) на инфекционный потенциал и развитие фитотоксикоза почвы. Пробы почвы отбирали в динамике по сезону под 4-х летними монокультурами лекарственных растений, контроль – целина. Фитотоксическую активность почвы оценивали методом биотестов на почвенных пластинках. Определяли видовой состав, пространственную и временную частоты встречаемости фитопатогенных видов микромицетов.

В состав комплекса фитопатогенов в контроле входили 9 видов микромицетов, в том числе возбудители корневых гнилей и листовых болезней. Обнаружено, что из почвы под растениями-подсластителями уже в середине вегетации не выделялись *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Stemphyllium botryosum*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizoctonia solani*, *Aureobasidium pullulans*, *Drechslera sorokiniana*. По нашему мнению, фитосанитарный эффект ризодепозитов указанных растений связан со снижением всех видов почвенной кислотности (актуальной, обменной, гидролитической) [2], а также с фунгицидным действием их компонентов.

При этом фитотоксическая активность почвы в прикорневой зоне как стевии медовой, так и солодки голой составляла 5-12% ингибирования роста корня, что не превышало контрольного уровня и регламентированного ГОСТом значения.

Таким образом, выращивание стевии медовой и солодки голой в 4-летней монокультуре не только не вызывает развития почвоутомления, но данные растения могут быть рекомендованы для оздоровления подкисленных выщелоченных черноземов.

1. Свистова И.Д., Кувшинова Н.М., Назаренко Н.Н. Микробно-растительные ассоциации нетрадиционных сахароносов и продуцентов натуральных подсластителей // Теоретическая и прикладная экология. 2016. №3. С. 41
2. Свистова И.Д., Стекольников К.Е., Кувшинова Н.М. // Почвоведение. 2016. №2. С.214.

### The intensity of root colonization by phytopathogenic fungus and rhizobacterium depends on the genotype of tomatoes and abscisic acid

Syrova D.S.<sup>1</sup>, Shakhnazarova V.Y.<sup>1</sup>, Shaposhnikov A.I.<sup>1</sup>, Belimov A.A.<sup>1</sup>, Gogolev Y.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia

E-mail: syr\_daria@ro.ru

**Key message.** The intensity of root colonization by phytopathogenic fungus and rhizobacterium differs depending on the tomato genotype. Inoculation of wild-type tomatoes *Ailsa Craig*, but not of its ABA deficient mutant *flacca*, with *Novosphingobium* sp. P6W inhibits root colonization by *Fusarium oxysporum* MF-G284.

**Keywords:** phytopathogen, *Fusarium*, abscisic acid, PGPB, biocontrol

Infection of plants with phytopathogenic fungi and their following death is an actual problem in modern agriculture. Therefore, there is interest in rhizosphere bacteria that can neutralize the harmful effects of pathogens on plants and thereby avoid infection and plant death. In the rhizosphere of plants, there are bacteria that are antagonistic to phytopathogens, suppressing their activity using biocontrol mechanisms, such as competition for the habitat, production of antibiotics, toxins, siderophores, competition for nutrition by root exudates, as well as others not yet known. We assume that there is a mechanism associated with the opposite effect of these microorganisms on the hormonal status of plants. Abscisic acid (ABA) producing fungi were screened by UPLC methods (Waters) in isocratic mode in the acetonitrile:water:acetic acid (18%:82%:0.1%) solvent system. ABA was determined at a wavelength of 265 nm. Further in the work, vegetative experiment with vermiculite was used. We used tomato plants of two genotypes: *Ailsa Craig* cultivar and its ABA deficient mutant *flacca*. The plants were inoculated with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* MF-G284, growth-stimulating bacterium *Novosphingobium* sp. P6W, as well as with a combination of these microorganisms. Amount of fungus spores was counted using Goryaev's count chamber. The amount of cells in the bacterial culture was calculated by measuring the optical density on a Bio-Rad SmartSpec Plus spectrophotometer at a wavelength of 540 nm. As an inoculum a fungal suspension ( $1 \times 10^5$  spores/ml) and a bacterial suspension ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were used. After inoculation, the plants were grown in a phyto-room for 14 days at a temperature of 23°C under periodic illumination of 16 hours a day / 8 hours a night. The amount of microorganism's DNA on the tomato roots was determined using real-time qPCR method by the CFX96 Touch qPCR System DNA amplifier (Bio-Rad). Determining the intensity of colonization of tomato roots by the bacterium *Novosphingobium* sp. P6W by quantitative real-time PCR was performed for the first time. Inoculation of wild-type tomatoes by *Novosphingobium* sp. P6W inhibited root colonization by phytopathogenic fungi. Root colonization of tomato mutants *flacca* by fungus *F. oxysporum* occurred more intensively than colonization of wild-type tomato roots. Colonization of tomato roots by plant-growth promoting rhizobacteria *Novosphingobium* sp. P6W depended on the tomato genotype. In the roots of *Ailsa-Craig* inoculated with the bacterium *Novosphingobium* sp. P6W the bacterial DNA content was several times higher than in the roots of ABA biosynthesis mutant *flacca*. In the case of root inoculation with a combination of microorganisms, a significant decrease in the amount of fungal DNA was observed on the roots of wild type, but this effect was not observed on the roots of *flacca* tomatoes. These observations indicate the importance of phytohormones in the process of plant root colonization by the phytopathogenic fungus *F. oxysporum* and the bacterial strain *Novosphingobium* sp. P6W, as well as its ability to compete with phytopathogenic fungi.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grants 17-14-01363 and 19-16-00097), Science and Higher Education Committee under the Government of St. Petersburg.

1. Шахназарова В.Ю., Феоктистова А.С., Чижевская Е.П., Вишневецкая Н.А., Струнникова О.К. (2012) Оптимизация способа выделения ДНК для идентификации и количественного определения *Fusarium culmorum* в корнях ячменя и пшеницы методом ПЦР. Микология и фитопатология. Т. 46 (4). С.287-292.
2. Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Dumova V.A., Shaposhnikov A.I., Ladatko A.G., Davies W.J. (2014) Abscisic acid metabolizing rhizobacteria decrease ABA concentrations *in planta* and alter plant growth. Plant Physiology and Biochemistry, № 74, 84-91.
3. Gogoleva N. E., Nikolaichik Y. A., Ismailov T. T. et al (2019) Complete genome sequence of the abscisic acid-utilizing strain *Novosphingobium* sp. P6W. 3Biotech, 9:94.

### Positive effect of application of "Rizoagrin" on the barley production process in the North

Tabalenkova G.N., Golovko T. K.

Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia

E-mail: tabalenkova@ib.komisc.ru

**Key message.** The treatment of barley seeds by the nitrogen-fixing rhizobacteria had a positive effect on photosynthetic productivity and grain yield in northern condition (Komi Republic).

**Keywords:** *Agrobacterium radiobacter*, barley, production process, yield

Biological nitrogen fixation is an environmentally friendly and effective way to improve the supply the agricultural plants by the nitrogen, especially on soils with low natural fertility. The aim of our work was to study the effect of biological product containing the associative nitrogen-fixing rhizobacteria on the growth and photosynthetic productivity of barley cultivated in the Central agro-climatic region of the Komi Republic. Barley seeds (variety Andrey of Zonal North-East Agricultural Research Institute selection) were treated with rizoagrin (*Agrobacterium radiobacter*) before sowing. Seed treatment was performed on the day of sowing at the rate of 600 g bioproduct /ha. Seeds were sown manually on the plots of 12 m<sup>2</sup> in 4-fold repetition. The seeding rate was 500 germinating seeds/m<sup>2</sup>. Untreated plants served as control. Inoculation of barley seeds with *Agrobacterium radiobacter* stimulated the shoot formation. The productive tillering capacity of barley increased by 30% and averaged 2.7 shoots/plant. The treated plants were characterized by better development of the leaf surface and pigment accumulation. In the tillering and earing phase, the chlorophyll content in the leaves of the treated plants was accordingly 15 and 33% higher than in the control ones. The chlorophyll content correlated with the nitrogen content in the leaves. The leaves of the treated plants were characterized by a powerful photosynthetic apparatus. The photosynthetic rate of the subflag leaf of treated plants was on average 22.2±4.5 mg CO<sub>2</sub>/g DW· h, and in the control it was 30% less. In years with a typical weather conditions of vegetation period the inoculation led to an increase in yield by average of 25% due to increasing in the number of shoots per plant and weight of 1000 grains. Rizoagrin had no significant effect on the protein content in the grain, but it contributed to an increase in the concentration of essential amino acids by 14%. However, treatment with rizoagrin contributed more to the growth of vegetative mass of barley plants than to grain productivity in wetter and cooler growing seasons. Thus, we established that the treatment of barley seeds by rizoagrin biological product before sowing had a positive effect on crop due to improving of the nitrogen nutrition and the physiological processes activity. The cost of seed processing is fully repaid by obtaining additional agricultural products. In general, the results of our experiments indicate the feasibility of using biological products based on associative nitrogen-fixing rhizobacteria on grain crops in the Northern regions.

**Agrobacterium-mediated transformation of *Amaranthus cruentus* L. epicotyls by the ARGOS-LIKE transgene**Taipova R.M.<sup>1</sup>, Kuluev B.R.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Bashkir State University, Ufa, Russia; <sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the RAS, Ufa, Russia

E-mail: Taipova.Ragida@yandex.ru

**Key message.** The present study describes the results of our research in *Agrobacterium*-mediated transformation of epicotyl segments of *Amaranthus cruentus* variety “Bagryanyi” by the ARGOS-LIKE transgene of *Arabidopsis thaliana* controlled by the 35S promoter. For shoot regeneration from epicotyl segments after *Agrobacterium*-mediated transformation, Murashige-Skoog (MS) medium containing 13  $\mu$ M 6-benzylaminopurine and 1  $\mu$ M  $\alpha$ -naphthylacetic acid was used. For the selection of transgenic shoots, 10 mg/L of hygromycin B was added to the MS medium.

**Keywords:** *Amaranthus cruentus*, *Agrobacterium*-mediated transformation, transgenic plants, ARGOS-LIKE, *in vitro*

*Amaranthus cruentus* L. is a valuable fodder and grain crop. To generate new varieties of this plant, genetic transformation methods can be used, but for *A. cruentus* such methods remain undeveloped. The purpose of the presented work was to develop a method for *agrobacterium*-mediated transformation of the cultural species of the *A. cruentus* using the genetic engineering structure 35S::ARGOS-LIKE (ARL), containing of *Arabidopsis thaliana* ARGOS-LIKE gene, encoding one of the negative regulators of ethylene signaling. Segments of cotyledons, hypocotyles and epicotyles (explants) were cut out of seven-day seedlings in sterile conditions and cultured for 6 days on a regenerative MS medium containing 13  $\mu$ M 6-benzylaminopurine and 1  $\mu$ M  $\alpha$ -naphthylacetic acid. Then the segments previously subjected to injury were immersed in a bacterial suspension for 10 minutes, after which they were slightly dried with sterile filter paper and transferred to the same regeneration medium for co-cultivation with *agrobacteria*. Joint cultivation of explants with *agrobacterium* was carried out for 2 days, after which they were washed with antibiotic solution of cefotaxime (300 mg/l) and were transferred to selective MS medium with the same growth regulators (BAP and NAA) with similar concentrations and antibiotics with cefotaxime 300 mg/l and hygromycin B (10 mg/L). Explants, which on selective medium started regenerating shoots were replanted on MS medium with 2  $\mu$ M BAP, 2  $\mu$ M 3-indoleacetic acid (IAA) and hygromycin B (10 mg/l). From amaranth plants rooted in a selective environment and acclimated to soil conditions, DNA was isolated by salt extraction and the resulting samples were subjected to PCR analysis for the presence of the target ARL gene and marker genes for  $\beta$ -glucuronidase (GUS) and hygromycin phosphotransferase (HPT).

Three transgenic amaranth plants with the genetic engineering structure 35S::ARL were generated. The efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *A. cruentus* was 4%. Two transgenic plants were acclimatized to soil and open air conditions.

**Агробактериальная трансформация эксплантов эпикотилей амаранта багряного *Amaranthus cruentus* L. трансгеном ARGOS-LIKE**Таипова Р.М.<sup>1</sup>, Кулуев Б.Р.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Башкирский государственный университет, Уфа, Россия; <sup>2</sup>Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

**Аннотация.** Описаны результаты агробактериальной трансформации сегментов эпикотилей *A. cruentus* сорта «Багряный» трансгеном ARGOS-LIKE *Arabidopsis thaliana* L., находящимся под контролем 35S промотора. Для регенерации побегов из сегментов эпикотилей после агробактериальной трансформации использовали среду Мурасиге-Скуга, содержащую 13 мкМ 6-бензиламинопурина и 1 мкМ  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты.

**Ключевые слова:** *Amaranthus cruentus*, агробактериальная трансформация, трансгенные растения, ARGOS-LIKE, *in vitro*

Амарант багряный *Amaranthus cruentus* L. является ценной кормовой и зерновой культурой. Для получения новых сортов этого растения могут быть использованы методы генетической трансформации, однако для *A. cruentus* такие технологии остаются неразработанными. Целью представленной работы была разработка метода агробактериальной трансформации культурного вида амаранта багряного *A. cruentus* с использованием генно-инженерной конструкции 35S::ARGOS-LIKE (ARL). В работе использовали генно-инженерную конструкцию 35S::ARL, содержащую целевой ген ARGOS-LIKE из *A. thaliana*, кодирующий один из негативных регуляторов этиленового сигналинга. Из семидневных проростков в стерильных условиях вырезали сегменты семядольных листьев, гипокотилей и эпикотилей (экспланты) и культивировали на течение 6 суток на регенерационной среде MS, содержащей 13 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП) и 1 мкМ  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (НУК). Затем сегменты, предварительно подвергнутые поранению, погружали в агробактериальную суспензию на 10 минут, после чего немного подсушивали стерильной фильтровальной бумагой и переносили на такую же регенерационную среду для сокультивации с агробактериями. Совместное культивирование эксплантов с агробактериями проводили в течение 2 суток, по истечении которых их промывали раствором антибиотика цефотаксима (300 мг/л) и переносили на селективную среду MS с теми же регуляторами роста (БАП и НУК) с аналогичными концентрациями и антибиотиками цефотаксимом – 300 мг/л и гигромицином В (10 мг/л). Экспланты, на которых на селективной среде начинали регенерировать побеги, пересаживали на среду MS с 2 мкМ БАП, 2 мкМ 3-индолилуксусной кислоты (ИУК) и гигромицином В (10 мг/л). Из укоренившихся на селективной среде и акклиматизированных к условиям почвы растений амаранта выделяли ДНК методом солевой экстракции и полученные образцы подвергали ПЦР-анализу на присутствие целевого гена ARL и маркерных генов, кодирующих  $\beta$ -глюкуронидазу (*GUS*) и гигромицинофосфотрансферазу (*HPT*).

В ходе проведенной работы были получены 3 трансгенных растения амаранта багряного, несущие генно-инженерную конструкцию 35S::ARL. Процент эффективности агробактериальной трансформации *A. cruentus* при использованном нами методе составил 4%. Два трансгенных растения удалось акклиматизировать к условиям почвы и открытого грунта.

## Engineering of vectors essential to derive chimeric proteins based on superfolder green fluorescent protein and harpins

*Tchebotarev L., Valentovich L.*

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

*E-mail: leuch@mbio.bas-net.by*

**Key message.** Conjugation of harpins with green fluorescent protein is aimed at achieving enhanced solubility and stability of chimeric protein, facilitating qualitative and quantitative evaluation of its expression in the routine experiments.

**Keywords:** harpin, superfolder GFP, hypersensitive response, plant immunity, heterologous gene expression

In the course of heterologous expression of certain harpin genes [1] it becomes difficult to define conditions or production of sufficient amounts of protein in soluble form. Nevertheless, coupling harpins to green fluorescent protein (superfolder GFP) [2] may solve the problem of solubility and stability of chimeric protein and simplify qualitative and quantitative assessment of its expression level in the routine experiments. In the study [3] GFP fused with HrpZ<sub>Pss</sub> did not affect immune response of tomato. However, the data are still scarce to estimate the capacity of sfGFP as chimeric protein component to modify plant hypersensitive response.

Aim of the research is to investigate the influence of green fluorescent protein on the ability of harpins fused with GFP to induce hypersensitive response in plants.

The authors modified the genetic constructions based on vector pET42(a)+ and carrying genes *hpa1* and *xopF1* from strain *Xanthomonas campestris* 5.1 by inserting from either N' or C' terminus gene *sfGFP* derived by PCR with specific primers containing nucleotide fragments encoding restriction sites. The modified plasmids were cloned in cells of *Escherichia coli* XL1-Blue strain. Gene expression was carried out in cells of *E. coli* BL21(DE3) strain.

To date the following constructions were created: pEGsf (containing gene *sfGFP*), pEGh.3 (*sfGFP*, *hpa1*), pEhG14.1 (*hpa1*, *sfGFP*) and pExG13 (*xopF1*, *sfGFP*). We tested the expression level of each of them using western blot hybridization technique and fluorimetry. By the date the conference opens, we expect to engineer the vector with alternative positioning of genes *sfGFP* and *xopF1* and to conduct trials of chimeric proteins on tomato / tobacco cultivars.

## Создание векторных конструкций, необходимых для получения химерных белков на основе зелёного флуоресцирующего белка (superfolder GFP) и харпинов

*Чеботарёв Л.Ю., Валентович Л.Н.*

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

**Аннотация.** Объединение харпинов с зелёным флуоресцирующим белком направлено на увеличение растворимости и стабильности химерного белка, упрощение качественной и количественной оценки уровня экспрессии в рутинных экспериментах.

**Ключевые слова:** харпин, superfolder GFP, реакция гиперчувствительности, растительный иммунитет, гетерологичная экспрессия генов.

При гетерологичной экспрессии некоторых генов харпинов [1], сложно подобрать условия для получения достаточного количества белка в растворимой форме. Однако объединение харпинов с зелёным флуоресцирующим белком (superfolder GFP) [2] может решить как проблему растворимости и стабильности химерного белка, так и упростить качественную и количественную оценку уровня экспрессии в рутинных экспериментах. В работе [3] GFP, сшитый с HrpZ<sub>Pss</sub>, не оказывал влияние на иммунный ответ томата. Тем не менее, недостаточно данных, чтобы оценить способность белка sfGFP влиять на проявление реакции гиперчувствительности растений в составе химерных белков.

Цель: изучить влияние зелёного флуоресцирующего белка на способность слитых с ним харпинов вызывать реакцию гиперчувствительности у растений.

Мы модифицировали полученные ранее на основе вектора pET42(a)+ экспрессионные конструкции, содержащие гены *hpa1* и *xopF1* штамма *Xanthomonas campestris* 5.1, путём включения в их состав либо с N- либо с C-конца гена *sfGFP*, полученного с помощью ПЦР со специфичными праймерами, содержащими нуклеотидные навески сайтов рестрикции. Клонирование плазмид выполняли в клетках штамма *Escherichia coli* XL1-Blue. Экспрессия проводилась в клетках штамма *E. coli* BL21(DE3).

К моменту подачи тезисов получены конструкции pEGsf (содержит ген *sfGFP*), pEGh.3 (*sfGFP*, *hpa1*), pEhG14.1 (*hpa1*, *sfGFP*) и pExG13 (*xopF1*, *sfGFP*). Для каждой из них произведена оценка уровня экспрессии с помощью вестерн-блота, а также флуорометрии. К моменту конференции мы надеемся получить конструкцию с альтернативным расположением генов *sfGFP* и *xopF1*, а также провести испытание химерных белков на растениях томата и/или табака.

1. Harpins, multifunctional proteins secreted by gram-negative plant-pathogenic bacteria. / M. Choi [et al.] // Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI. – 2013. – Vol. 26 – P. 1115–22.
2. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein / J.-D. Pédelacq [et al.] // Nat. Biotechnol. – 2006. – Vol. 24, № 1. – P. 79-88.
3. HarpinPss encapsulation in chitosan nanoparticles for improved bioavailability and disease resistance in tomato / S.R. Nadendla [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2018. – Vol. 199 – P. 11-19.

**Wheat yields of herbicide treatment along with auxin-producing bacteria *Pseudomonas* sp. DA1.2**Timergalin M.D.<sup>1</sup>, Feoktistova A.V.<sup>1</sup>, Rameev T.V.<sup>1</sup>, Chetverikov S.P., Sultangazin Z.R.<sup>2</sup><sup>1</sup>Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia;<sup>2</sup>Bashkir Research Institute of agriculture of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: chelab007@yandex.ru

**Key message.** The effect of the identified auxin-producing strain of bacteria on wheat plants when treated with the herbicides Chistalan and Nanometh in the field was studied. The ability of bacterial treatment to increase wheat yield under herbicidal stress due to the positive effect of bacteria on plant growth and development at early stages of development is shown.

**Keywords:** PGPB, wheat, herbicidal stress, auxins

The use of herbicides is an integral part of the modern agricultural system. However, in addition to the positive effect due to the destruction of weeds, a key disadvantage of such substances is the suppression of the development of cultivated plants, the so-called «herbicidal stress». The search for environmentally safe and effective antidotes is an urgent task.

The aim of the study was to assess the effect of auxin-producing strains of bacteria with identified resistance to herbicides on wheat yield under herbicidal stress in the field conditions of the Ural steppe zone of the Republic of Bashkortostan.

The object of the study was plants of soft spring wheat (*Triticum aestivum* L.) of the Kinelskaya Yubileynaya variety. We used an auxin-producing strain of bacteria *Pseudomonas* sp. DA1.2 and a herbicide: Chistalan Extra based on 2,4-D and Dicamba, and Nanomet from the Sulfonylurea group.

The treatment was carried out in the third leaf phase with herbicide solutions at a working concentration of 05 ml/l and tank mixtures of herbicides with a suspension of bacteria, spraying directly on the plants.

The selected samples at the initial stage of tillering showed that the introduction of bacteria led to an increase in the watered tissue of the plant (there was an increase in OSV by 10% relative to the control) and stimulating growth and accumulation of shoot mass. When bacteria were added to the Nanometer variant, the mass of the shoot increased by more than 2 times, and the length of the 3rd leaf in combination with bacterial treatment with herbicides exceeded the control values by more than 1.5 times.

The yield in the control sample of plants was 18.6 C/ha, when treated with Chistalan and Nanometer 18.8 and 18.9 C / ha, respectively. Combined treatment with herbicides and bacteria resulted in a 20% increase in yield. Thus, in the case of successful agricultural tests, the studied strain of bacteria can be recommended for improving the effectiveness of herbicides.

The study was carried out within the framework of the Ministry of education and science of Russia № 075-00326-19-00 on the topic № ААААА-А19-119021390081-1.

**Урожайность пшеницы при обработке гербицидами совместно с ауксин-продуцирующими бактериями *Pseudomonas* sp. DA1.2**Тимергалин М.Д.<sup>1</sup>, Феоктистова А.В.<sup>1</sup>, Рамеев Т.В.<sup>1</sup>, Четвериков С.П.<sup>1</sup>, Султангазин З.Р.<sup>2</sup><sup>1</sup>Уфимский Институт биологии - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия;<sup>2</sup>Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

**Аннотация.** Изучено влияние ауксинпродуцирующего штамма бактерий на растения пшеницы при обработке гербицидами чисталан и наномет в полевых условиях. Показана способность бактериальной обработки повышать урожайность пшеницы в условиях гербицидного стресса за счет положительного влияния бактерий на рост и развитие растений на ранних стадиях развития.

**Ключевые слова:** PGP-бактерии, пшеница, гербицидный стресс, ауксины

Применение гербицидов является неотъемлемой частью современной системы ведения сельского хозяйства. Однако помимо положительного эффекта за счет уничтожения сорной растительности ключевым недостатком таких веществ является подавление развития культурных растений, так называемый «гербицидный стресс». Поиск экологически безопасных и эффективных антидотов является актуальной задачей.

Целью исследования было оценить влияние ауксинпродуцирующего штамма бактерий с выявленной устойчивостью к гербицидам на урожайность пшеницы при гербицидном стрессе в полевых условиях Зауральской степной зоны Республики Башкортостан.

Объектом исследования были растения мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Кинельская Юбилейная. В работе использовали ауксинпродуцирующий штамм бактерий *Pseudomonas* sp. DA1.2 и следующие гербициды: чисталан экстра на основе 2,4-Д и дикамбы и наномет из группы сульфонилмочевин.

Обработку проводили в фазе третьего листа растворами гербицидов в рабочей концентрации 05 мл/л и баковыми смесями гербицидов с суспензией бактерий, распыляя непосредственно на растения.

Анализ отобранных проб на начальном этапе кущения показал, что внесение бактерий приводило к повышению обводнения тканей растения (наблюдалось увеличение ОСВ на 10% относительно контроля) и стимуляции роста и накоплению массы побега. При добавлении бактерий в вариант с нанометом масса побега возрастала более чем в 2 раза, а длина 3-го листа в сочетаниях бактериальной обработки с гербицидами превышала контрольные значения более чем в 1,5 раза.

Урожайность в контрольной выборке растений составила 18,6 ц/га, при обработке чисталаном и нанометом 18,8 и 18,9 ц/га соответственно. Совместная обработка гербицидами и бактериями приводила к повышению урожайности на 20 %. Таким образом, в случае успешных агроиспытаний, изученный штамм бактерий может быть рекомендован для повышения эффективности применения гербицидов.

Исследование выполнено в рамках ГЗ Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А19-119021390081-1.



**Construction of scFv-antibodies to the active center of the Sunn bug (*Eurygaster integriceps* Put)  
gluten-hydrolyzing protease GHP3**

Timofeev S.A., Tsarev A.A., Zhuravlev V.S., Konarev A.V., Dolgikh V.V.  
All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, Russia  
E-mail: ts-bio@ya.ru

**Key message.** This work describes the preparation of immune library and selection of recombinant single-chain (scFv) antibodies to the active center of the gluten-destroying proteinase GHP3 of the *Eurygaster integriceps* Put. bug.

**Keywords:** Sunn bug, proteinases, wheat, scFv-antibodies, phage display

Proteinases of the Sunn bug *E. integriceps* Put. excreted into the wheat grain during nutrition violates the structure of the gluten proteins responsible for the most important qualities of bread flour, which cause enormous damage to the crop in Russia and other countries.

The aim of the work was to create a genetic construct encoding scFv antibodies to the active center of the *E. integriceps* Put. GHP3 proteinase [1], potentially capable of inhibiting the activity of this protein. These constructs allows potential creation of transgenic plants that are resistant to grain damage caused by *E. integriceps*.

Extraction of total RNA from the spleen of mice immunized by chimeric protein consisting of fragments of GHP3 active center [2] and cDNA synthesis were performed with Trizol reagent and oligo-dT primers. PCR amplification of the entire variety of variable fragments of heavy (VH) and light (VL) chains of murine IgG was performed using 22 pairs of specially selected primers (Progen). A gene library of mice scFv antibodies (VH+VL) was created in pSEX81 phagemid vector. Selection of anti- GHP3 scFv antibodies was performed using phage display technology and Hyperphage M13 K07ΔpIII (Progen). To express the selected scFv fragments in bacteria *E. coli*, their genes were re-cloned from pSEX81 into pOPE101 expression vector.

Previously, the data of structure analysis of the GHP3 proteinase of *E. integriceps* [1] were used to design and synthesize the chimeric gene encoding several copies of polypeptide chain involved in the formation of the active center of the protein [2]. The recombinant product overexpressed in *E. coli* was used to immunize mice, and B-cells (mouse spleen) were isolated after four cycles of immunization, which allow us to obtain mRNA from these cells. This resulted sample, contained all transcripts encoding murine antibodies including GHP3-specific molecules, was used for cDNA synthesis and PCR amplification of the variety of VH and VL fragments of murine IgG. The amplified fragments were inserted into pSEX81 phagemid vector and transformation of *E. coli* by the pool of constructed plasmids resulted in creation of immune library containing about 1 million of bacterial clones carrying scFv genes with different VH/VL combinations.

To select from this library sequences encoding scFv-antibodies to GHP3 proteinase by phage display technology, we used the recombinant chimeric protein and native GHP3 from *E. integriceps* salivary glands immobilized on nitrocellulose membrane. Two rounds of panning were followed by re-cloning of selected scFv genes into pOPE101 expression vector. It allowed us to start the analysis of antigen-binding and GHP3-inhibiting activities of selected antibodies.

This work was supported by Ministry of Education and Science of the Russian Federation [Project number 0483–2019-0001] and by Russian Foundation for Basic Research (RFBR 18-08-00828).

1. Konarev AV et al. J. Agric. Food Chem. 59, 2462-70 (2011)
2. Dolgikh V et al. Food Science & Nutrition. 8, :703-8 (2019)

### Reduction of heavy metal phytotoxicity using *Rhodococcus*-biosurfactants

Tishchenko A.V.<sup>1</sup>, Litvinenko L.V.<sup>2</sup>, Ivshina I.B.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Perm State University, Perm, Russia; <sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Perm, Russia  
E-mail: arty.tishchenko@gmail.com

**Key message.** The influence of heavy metals on the germination of crop seeds (*Vicia sativa* L., *Sinapis alba* L., and *Avena sativa* L.) in the presence of *Rhodococcus*-biosurfactants was studied.

**Keywords:** *Rhodococcus*, biosurfactants, heavy metals, phytotoxicity

The environmental pollution increasing by industrial waste negatively affects natural and man-made ecosystems. The application of biosurfactants into soils contaminated with heavy metals (HMs) helps to increase their bioavailability and facilitates the accumulation of metals by microbial cells. The action of biosurfactants reduces the negative effect of HMs due to their binding with the subsequent formation of stable "biosurfactant-metal" complexes [1,2].

The aim of this study was evaluation of the effect of *Rhodococcus*-biosurfactants on seed germination in the presence of HMs. In comparative studies, the effect of different concentrations of *Rhodococcus*-biosurfactants (2.0, 4.0 and 8.0 g/L) on the phytotoxicity of cadmium, chromium, copper, lead, molybdenum, nickel and zinc to the germination of oat (*Avena sativa* L.), white mustard (*Sinapis alba* L.) and common vetch (*Vicia sativa* L.) were examined. The phytotoxicity level was determined in accordance with Standard Methodological Recommendations (Phytotest). HMs were added in concentrations multiple of 1, 10, 50, 100 and 200 maximum permissible concentrations (MPC), taking into account the Clark background in terms of pure metal. The actinobacterial strain *Rhodococcus ruber* IEGM 231 is active producer of biosurfactants (Regional specialised collection of alkanotrophic microorganisms, official acronym IEGM, www.iegmcol.ru, large-scale research facilities number 73559) in a liquid mineral medium containing *n*-dodecane (C<sub>12</sub>) or *n*-hexadecane (C<sub>16</sub>) [3].

In terms of the degree of resistance to HMs, the plants tested could be presented in a row: *Avena sativa* L. > *Sinapis alba* L. > *Vicia sativa* L., where the seeds of oats were the most resistant to HMs. Preliminary seed treatment with *Rhodococcus*-biosurfactants contributed to an increase (up to 4.9 times) in the intensity of seed germination of roots and seedlings compared to seed germination in the presence of HMs without the addition of biosurfactants. The germination rate of crop seeds varied from 10 to 92% depending on the concentrations of HMs ions. After preliminary treatment of seeds with biosurfactants, the energy of their germination and viability increased up to 15 times, while the resistance of plants to HMs increased up to 22 times. It should be noted that seed germination in the presence of biosurfactants obtained on a medium with C<sub>16</sub> was most effective (3 times) than using those obtained on a medium with C<sub>12</sub>. By the degree of phytotoxicity, HMs were presented in a row: Cu<sup>2+</sup> > Zn<sup>2+</sup> > MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > Ni<sup>2+</sup> > CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > Pb<sup>2+</sup> > Cd<sup>2+</sup>, in which copper ions were the most toxic and cadmium ions were the least toxic. In the presence of CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> ions, the growth of roots and shoots was inhibited. Seed treatment with *Rhodococcus*-biosurfactants removed the inhibitory effect of these HMs on seedlings. The data obtained indicate the feasibility of preliminary treatment of seeds with biosurfactants in order to reduce the toxic effect of HMs on the growth of plant crops, as well as improve the conditioning properties of seeds.

The work was carried out within the framework of the state assignment (AAAA-A19-119112290008-4) and RSF (18-14-00140).

1. Litvinenko L.V., Tishchenko A.V., Ivshina I.B. Reduction of copper ion phytotoxicity using *Rhodococcus*-biosurfactants // *Biology Bulletin*. 2019. 46 (10): 135–140.
2. Tishchenko A.V., Litvinenko L.V., Shumikhin S.A. Effects of *Rhodococcus*-biosurfactants on the molybdenum ion phytotoxicity // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2019. 487: 012021.
3. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Philp J.C., Christofi N. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1998. 14: 711–717.



**Biological activity of complexes based on polycarbonyl ligands:  
assessment of the mode of action using molecular docking**

Tobysheva P.D.<sup>1,2</sup>, Khamidullina L.A.<sup>1,2</sup>, Puzyrev I.S.<sup>2</sup>, Pestov A.V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Postovsky Institute of Organic Synthesis, UB RAS, Ekaterinburg, Russia; <sup>2</sup>Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia  
E-mail: lili.khamidullina@gmail.com

**Key message.** The binding ability towards protein biomolecular targets have been analyzed for metal complexes based on polycarbonyl ligands using molecular docking.

**Keywords:** complexation, metal ions, biological activity, biomolecular targets, multi-targeting.

Metal complexes with organic compounds exhibit a wide range of biological activity and have application both in a diagnosis and treatment of infectious, viral, oncological diseases and metabolic disorders. Since systematic attempts to correlate the biological activity of metal complexes in vitro with the oxidation state and the coordination number of the metal or with the geometry of the ligand environment are rarely reported in the literature, it is interesting to compare the biological activity of ligands with a similar structure and their transition metal complexes with each other in order to understand the role of the metal and the ligand.

The objectives of this work are the investigation of the protein–ligand interaction, the comparison of efficiency of binding with several biomolecular targets, the analysis of the correlation between the results of biological experiments and molecular modeling for the estimation of an applicability of the metal complexes based on polycarbonyl ligands as multi-target biologically active agents.

Determination of the spectrum of substances with multiple functionality was carried out by methods of computational chemistry (quantum-chemical calculation of molecular structures) and computational biology (molecular modeling). The molecular docking was conducted with the using of GOLD (CCDC). For the prediction of test compounds locations in the binding sites of biological targets GoldScore and ChemScore scoring functions were used. Structures of ribonucleotide reductase (RNR) and heat shock proteins (Hsp) from the Protein Data Bank were used for docking.

The results indicate stronger biological activity of the complexes compared with the parent ligands, which is correlated with the data of biological tests. Analysis of protein-ligand interactions suggests that the activity of compounds against phyto- and anthropathogenic bacteria, phytopathogenic fungi and tumor cells may be caused by an inactivation of RNR, Hsp90 and Hsp70, which leads to a disruption of the DNA and protein synthesis, as well as the cell cycle in pathogenic cells.

The reported study was funded by RFBR and Sverdlovsk region, project number 20-43-660042.

**Оценка механизма биологического действия комплексов на основе поликарбонильных лигандов с использованием методов молекулярной стыковки**

Тобышева П.Д.<sup>1,2</sup>, Хамидуллина Л.А.<sup>1,2</sup>, Пузырев И.С.<sup>2</sup>, Пестов А.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург, Россия; <sup>2</sup>Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

**Аннотация.** С использованием методов молекулярной стыковки нами была проанализирована связывающая способность металлокомплексов на основе поликарбонильных лигандов с биомолекулярными мишенями белковой природы.

**Ключевые слова:** комплексообразование, ионы металлов, биологическая активность, биомолекулярные мишени, мультитаргетность.

Комплексы металлов с органическими соединениями проявляют широчайший спектр биологической активности и находят применение как в диагностике, так и в терапии инфекционных, вирусных, онкологических заболеваний и нарушений метаболизма. Поскольку систематические попытки соотнести биологическую активность металлокомплексов in vitro со степенью окисления и координационным числом металла или геометрией лигандного окружения редко встречаются в литературе, интерес представляет сравнение биологической активности лигандов, близких по строению, и их комплексов металлов между собой, чтобы понять роль металла и лиганда.

Задачи настоящей работы включают исследование белок-лигандных взаимодействий, сравнение эффективности связывания с рядом биомолекулярных мишеней, анализ корреляции между результатами биологических экспериментов и молекулярного моделирования для оценки перспектив использования металлокомплексов на основе поликарбонильных лигандов в качестве мультитаргетных биологически активных агентов.

Определение спектра веществ с множественной функциональностью осуществлялось методами вычислительной химии (квантовые расчеты строения молекул) и вычислительной биологии (молекулярное моделирование). Молекулярная стыковка проводилась с использованием программы GOLD из пакета Кембриджской базы кристаллографических данных CCDC. Для предсказания расположения исследуемых соединений в сайтах связывания биологических мишеней использовались оценочные функции GoldScore и ChemScore. Для докинга использовались структуры мишеней рибонуклеотидредуктазы (RNR) и белков теплового шока (Hsp) из базы данных белков Protein Data Bank.

Полученные результаты указывают на более выраженную биологическую активность комплексов по сравнению с исходными лигандами, что согласуется с данными биологических испытаний. Анализ белок-лигандных взаимодействий позволяет предположить, что активность соединений в отношении фито- и антропопатогенных бактерий, фитопатогенных грибов и опухолевых клеток может быть обусловлена инактивацией RNR, Hsp90 и Hsp70, что приводит к нарушениям синтеза ДНК и белков, а также клеточного цикла в патогенных клетках.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Свердловской области в рамках научного проекта № 20-43-660042.

**Initiation and characterization of plant cell culture of *Phlojodicarpus sibiricus***Tomilova S.V.<sup>2</sup>, Khandy M.T.<sup>1</sup>, Kochkin D.V.<sup>2</sup>, Nosov A.M.<sup>2</sup><sup>1</sup>M. K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia; <sup>2</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia  
E-mail: handy\_89@mail.ru

**Key message.** In the framework of the present study, callus and suspension cultures of *Phlojodicarpus sibiricus* cells were obtained. Their morphological, physiological and biosynthetic characteristics were investigated.

**Keywords:** *Phlojodicarpus sibiricus*, callus, suspension, coumarins

Currently, the use of plant cell cultures *in vitro* is one of the alternative sources of obtaining plant secondary metabolites. In this aspect, the plant cell culture of *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. Ex Spreng.) K.-Pol., as a source of coumarins, may be promising. It should be noted that, according to the analysis of available literature, the plant cell culture of *Ph. sibiricus* has not been previously obtained. Thus, the purpose of the present work is to obtain and study the cultures of *Ph. sibiricus* cells *in vitro*.

For experiments, we used Murashige and Skoog medium with 2,4-D and BAP [1]. Cell cultures were cultured in the dark at 25±1 °C. Suspensions were grown on a shaker at 100 rpm. Cell culture viability was determined using intravital dye phenosafranin. Growth analysis was carried out according to a standard method [2]. Coumarins in the biomass of cells were analyzed using thin layer chromatography (TLC) [3].

From the seeds of the plant *Ph. sibiricus* grew aseptic seedlings, of which subsequently received callus cell cultures. The intensity of callusogenesis was: for cotyledon leaves – 70%, for hypocotyls – 33%, for roots – 65%. Suspension cultures were induced from calluses of leaf and hypocotyl origin. The resulting suspensions were white-yellow in color, contained aggregates of meristem-like and parenchyma-like cells, and also single cells. Cell viability was at least 70%. The line obtained from callus of leaf origin had high growth rates (growth index 10). The growth index of the line induced from callus of hypocotyl origin was 3.4. TLC analysis showed the presence of coumarins and/or their glycosides in callus and suspension cultures of *Ph. sibiricus* cells. Thus, *Ph. sibiricus* plant cell cultures were first obtained and investigated.

The work was financially supported by the Russian Science Foundation (18-74-00097).

**Получение и характеристика культур клеток вздутоплодника сибирского**Томилова С.В.<sup>2</sup>, Ханды М.Т.<sup>1</sup>, Кочкин Д.В.<sup>2</sup>, Носов А.М.<sup>2</sup><sup>1</sup>Северо-восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, Якутск, Россия<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

**Аннотация.** В рамках настоящего исследования были получены каллусные и суспензионные культуры клеток вздутоплодника сибирского. Исследованы их морфологические, физиологические и биосинтетические характеристики.

**Ключевые слова:** вздутоплодник сибирский, каллус, суспензия, кумарины

В настоящее время культуры клеток высших растений рассматриваются как возобновляемый альтернативный источник получения вторичных метаболитов растительного происхождения. В этом аспекте перспективной может быть культура клеток лекарственного растения вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K.-Pol.), в качестве источника кумаринов. Следует отметить, что, согласно анализу доступной литературы, культура клеток *Ph. sibiricus* ранее получена не была. Таким образом, цель настоящей работы, получение и исследование культур клеток вздутоплодника сибирского.

Для экспериментов использовали среду Мурасиге и Скуга с 2,4-Д и БАП [1]. Выращивание культур клеток проводили в темноте при 25 ± 1°C. Суспензии выращивали на шейкере при 100 об/мин. Жизнеспособность клеток определяли, используя прижизненный краситель феносафранин. Анализ роста проводили по стандартной методике [2]. Кумарины в биомассе клеток анализировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) [3].

Из семян растения *Ph. sibiricus* вырастили асептические проростки, из которых в последующем получили каллусные культуры клеток. Интенсивность каллусогенеза при этом составила: для семядольных листьев – 70%, для гипокотилей – 33%, для корней – 65%. Из каллусов листового и гипокотильного происхождения индуцировали суспензионные культуры. Полученные суспензии имели бело-желтый цвет, содержали агрегаты клеток меристемоподобного и паренхимоподобного типов, также одиночные клетки. Жизнеспособность клеток составила не менее 70%. Линия, полученная из каллусов листового происхождения, имела достаточно высокие показатели роста (индекс роста 10). Индекс роста линии, индуцированной из каллусов гипокотильного происхождения, составил 3,4. Анализ ТСХ показал присутствие кумаринов и/или их гликозидов в каллусных и в суспензионных культурах клеток вздутоплодника сибирского.

Таким образом, впервые получены и исследованы культуры клеток *Ph. sibiricus*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-00097).

1. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum*, 1962, 15, 473–497.
2. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений: Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. М.: БИНОМ, 2011, 386–403.
3. *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas* [Second Edition By H. Wagner and S. Bladt]. Brooklyn, New York. Springer-Verlag 1996. xv+ 384 pp.

doi:

**Search for streptomycetes with antagonistic activity to the aggressive *Fusarium* sp. strain AC**Tovstik E.V.<sup>1</sup>, Bakulina A.V.<sup>2</sup><sup>1</sup>Vyatka State University, Kirov, Russia; <sup>2</sup>Federal Agricultural Research Center of North-East named N.V. Rudnitsky, Kirov, Russia

E-mail: drugaeann1@rambler.ru

**Key message.** The antagonistic activity of 126 *Streptomyces* strains against the fungus *Fusarium* sp. AC was studied. The greatest extent of mycelium growth was inhibited by *S. geldanamicininus* 3K9, which produces validamycin A.

**Keywords:** *Fusarium proliferatum*, identification, *Streptomyces*, phytopatogens biocontrol, antagonistic activity

Representatives of the genus *Streptomyces* are known for their great potential for the synthesis of secondary metabolites, including those with antifungal activity. Every year, significant damage to the yield and quality of various crops grain is caused by *Fusarium* fungi, which can be controlled with streptomycetes. The aim of this research was to identification a phytopathogenic fungus strain isolated from the soil in the Kirov region and to search for streptomycetes that have antagonistic activity to it. According to the nucleotide sequence of the ITS site, the strain AC was assigned to the genus *Fusarium*, and its closest relatives found by the BLAST are the species: *F. proliferatum*, *F. fujikuroi*, and *F. verticillioides*. The cultural and morphological characteristics of the studied strain corresponded to the description of *F. proliferatum* (cotton-like colonies, air mycelium white, fast-growing, the reverse side colorless, hyphae colorless, septic, simple conidiophores). It is known that this species, detected in our country mainly in the southern region, is characterized by the formation of a dangerous mycotoxin – fumosin (Gagkayeva et al., 2011). Screening of antagonistically active cultures was performed among 126 *Streptomyces* strains isolated from soil and rhizosphere (80 and 46 strains, respectively). The ability to suppress the growth of fungal mycelium in pure cultures was found only in three soil *Streptomyces* strains (inhibition zones 16, 22, 24 mm), and among rhizospheric – none. The most active strain was *S. geldanamicininus* 3K9, for which the ability to synthesize an antifungal antibiotic (validamycin A) was previously detected (Tovstik et al., 2019). Thus, the data obtained by us confirm the need to study the biocontrol potential of streptomycetes in order to use them in conducting environmentally safe agriculture.

**Поиск стрептомицетов-антагонистов к агрессивному штамму *Fusarium* sp. AC**Товстик Е.В.<sup>1</sup>, Бакулина А.В.<sup>2</sup><sup>1</sup>Вятский государственный университет, Киров, Россия; <sup>2</sup>Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого, Киров, Россия

**Аннотация.** Изучена антагонистическая активность 126 штаммов стрептомицетов в отношении гриба *Fusarium* sp. AC. В наибольшей степени рост мицелия ингибировал *S. geldanamicininus* 3K9, продуцирующий валидамицин А.

**Ключевые слова:** *Fusarium proliferatum*, идентификация, *Streptomyces*, биоконтроль фитопатогенов, антагонистическая активность

Представители рода *Streptomyces* известны огромным потенциалом в отношении синтеза вторичных метаболитов, в том числе обладающих антифунгальной активностью. Ежегодно значительный ущерб урожаю и качеству зерна различных культур наносят заболевания, вызванные грибами рода *Fusarium*, для борьбы с которыми могут быть использованы биопрепараты на основе стрептомицетов. Целью настоящей работы была идентификация выделенного нами из почвы на территории Кировской области фитопатогенного гриба штамма AC и поиск стрептомицетов, обладающих к нему антагонистической активностью. По нуклеотидной последовательности участка ITS штамм AC был отнесен к роду *Fusarium*, а его ближайшие родственники, найденные сервисом BLAST, – виды: *F. proliferatum*, *F. fujikuroi*, *F. verticillioides*. Культурально-морфологические признаки исследуемого штамма соответствовали описанию *F. proliferatum* (колонии ватообразные, воздушный мицелий белый, быстрорастущий, обратная сторона бесцветная, гифы бесцветные, септированные, конидиеносцы простые). Известно, что для этого вида, выявляемого в нашей стране преимущественно в Южном регионе, характерно образование опасного микотоксина – фумозина (Гагкаева и др., 2011). Скрининг антагонистически активных штаммов проводился среди 126 культур стрептомицетов, выделенных из почвы и ризосферы (80 и 46 штаммов соответственно). Способность подавлять рост мицелия гриба в чистых культурах была установлена только у трех почвенных штаммов *Streptomyces* sp. (зоны ингибирования 16, 22, 24 мм), а среди ризосферных – ни у одного. Наиболее активным оказался штамм *S. geldanamicininus* 3K9, для которого ранее была обнаружена способность к синтезу противогрибкового антибиотика (валидамицина А) (Товстик и др., 2019). Таким образом, полученные нами данные подтверждают необходимость изучения биоконтрольного потенциала стрептомицетов с целью их использования при ведении экологически безопасного сельского хозяйства.

### **Biopreparation "Vegetatin" for protection of cabbage from fungal and bacterial diseases during grows and storage**

Trigubovich A.M.<sup>1</sup>, Popov F.A.<sup>2</sup>, Arashkova A.A.<sup>1</sup>, Volchkevich I.G.<sup>2</sup>, Kolomiyets E.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; <sup>2</sup>Institute of Plant Protection, Priluki, Belarus

E-mail: trigubovich777@gmail.com

**Key message.** Effectiveness of usage biopreparation "Vegetatin" which is based on bacteria of the genus *Bacillus* to protect white cabbage from diseases was studied. Positive effect after treatments of seeds, seedlings and vegetative plants on the productivity and cabbage harvest has been established. Biological effectiveness of "Vegetatin" was at level of 48.9–53.6%, the stored yield –28.1 c/ha of cabbage heads. Processing of cabbage heads before storage reduced the damage of cabbage by mixed rots by an average of 30%.

**Keywords:** biopreparation, antagonist bacteria, biological effectiveness, productivity, white cabbage

One of the main problems in cabbage cultivation is the development of mucous and vascular bacteriosis and alternariosis, leading to significant yield losses during the growing season. Rot development caused by fungal pathogens during storage is one of the reasons of deterioration of cabbage heads. Biopreparations based on bacteria with high antagonistic activity allow to protect plants from phytopathogens, increase plant resistance and improve vegetable quality.

The aim was to evaluate the biological and economic efficiency of the usage of the biopreparation "Vegetatin" against fungal and bacterial cabbage diseases.

Antagonistic activity of the biopreparation "Vegetatin" was determined against phytopathogenic bacteria and fungi. During the growing season protection of cabbage was carried out by spraying suspension of biopreparation on plants at the beginning of cabbage heads formation, then after 10–12 days interval and 5 days before harvesting.

New biopreparation "Vegetatin" based on spore-forming bacteria of the genus *Bacillus* has high antimicrobial and growth-promoting activity. It is shown that pre-sowing seed treatment doesn't inhibit germination of seeds and helps to reduce the number of phytopathogens by 25.0%. Triple treatment of cabbage plants limits development of alternariosis and bacteriosis: biological effectiveness against alternariosis is 53.6%, against mucous and vascular bacterioses – 52.1 and 48.9%, respectively. Usage of biopreparation has a positive effect on productivity and cabbage harvest which was 461.8 c/ha (433.7 c/ha in the control). During the storage of cabbage heads the decrease of mixed rots is about 30.0–33.0%.

### **Биопрепарат «Веgetатин» для защиты капусты от грибных и бактериальных заболеваний в период вегетации и хранения**

Тригубович А.М.<sup>1</sup>, Попов Ф.А.<sup>2</sup>, Арашкова А.А.<sup>1</sup>, Волчкевич И.Г.<sup>2</sup>, Коломиец Э.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь; <sup>2</sup>РУП «Институт защиты растений», Прилуки, Беларусь

**Аннотация.** Установлено положительное влияние биопрепарата «Веgetатин» на продуктивность и накопление урожая капусты. Биологическая эффективность биопрепарата составила 48,9–53,6%, сохраненный урожай – 28,1 ц/га кочанов. Обработка кочанов перед закладкой на хранение снизила поражение капусты смешанными гнилями в среднем на 30%.

**Ключевые слова:** биопрепарат, бактерии-антагонисты, биологическая эффективность, урожайность, капуста.

Одной из основных проблем при возделывании капусты является развитие слизистого и сосудистого бактериоза и альтернариозов, приводящих к значительным потерям урожая в период вегетации. В период хранения развитие гнилей, вызываемых грибными патогенами, является одной из причин порчи уже готовой овощной продукции. Использование препаратов на основе бактерий с высокой антагонистической активностью позволяет защищать растения от фитопатогенов, повышать устойчивость растений, а также повышать качество получаемой продукции. Цель работы – оценить эффективность применения биопрепарата «Веgetатин» против грибных и бактериальных заболеваний капусты.

Эффективность биопрепарата оценивали в отношении комплекса фитопатогенных бактерий и грибов. Обработку посадок капусты белокочанной проводили путем опрыскивания растений суспензией биопрепарата в фазе начала формирования кочана, затем через 10–12 дней и за 5 дней до закладки кочанов на хранение.

Разработанный биопрепарат «Веgetатин» на основе штамма спорообразующих бактерий рода *Bacillus* обладает высокой антимикробной и ростостимулирующей активностью. Показано, что предпосевная обработка семян биопрепаратом «Веgetатин» не угнетает всхожесть семян и способствует снижению пораженности всходов капусты белокочанной черной ножкой на 25,0%. Трехкратная обработка посадок ограничивает развитие альтернариоза и бактериозов: биологическая эффективность против альтернариоза составляет 53,6%, против слизистого и сосудистого бактериозов – 52,1 и 48,9%, соответственно. Применение биопрепарата оказывает положительное влияние на продуктивность и накопление урожая капусты белокочанной, который составил 461,8 ц/га (в контроле 433,7 ц/га). В период хранения кочанов наблюдается снижение распространения смешанных гнилей на уровне 30,0–33,0%.

**Ionic transporters in the root nodule of *Medicago truncatula*: membrane antiporters Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>**

Trifonova N.A., Korolyova M.I., Fedorova E.E.

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia

E-mail: natali.flow@yandex.ru

**Key message.** In root nodules of *Medicago truncatula* subjected to salt stress the level of expression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters NHX1 and NHX7 was estimated. The localization of NHX1 was studied by confocal and electron microscopy.

**Keywords:** rhizobial symbiosis, salt stress, cation/proton antiporter

Symbiosis is a system composed from two organisms: legume plant and the soil bacteria Rhizobia. Nodules are quite sensitive to NaCl in the soil. Based on the low salinity resistance of the nodule, it can be assumed that nodule cells containing bacteria have defects in maintaining the ionic balance. Since the sequestration of sodium ions is one of the most important attribute of salt tolerance in plants, we investigated the cation/proton antiporters that are involved in the sequestration of sodium: NHX1 and NHX7 (Bassil and Blumwald, 2014). In *Arabidopsis thaliana*, these transporters are localized in different membrane compartments: AtNHX7 on the cytoplasmic membrane, AtNHX5-6 on the endosomes, and AtNHX1-4 on the tonoplast. The level of expression was estimated in the nodules of *Medicago truncatula*, from the plants exposed to short-term (5 days) and long-term (30 days) salt stress. Was observed the dynamics of expression of antiporters Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> NHX1 and NHX7 in root nodules depending on the duration of stress.

The localization of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> NHX1 antiporter was studied by immunocytochemistry and confocal microscopy in root nodules of *Medicago truncatula*. Analysis of the localization of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter NHX1 showed the signal over the tonoplast of noninfected and infected cells, the signal was also partially associated with aging symbiosomes.

This work was supported by the Russian Science Foundation (project № 19-04-00570A).

**Ионные транспортеры в корневом клубеньке *Medicago truncatula*: мембранные антипортеры Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>**

Трифорова Н.А., Королева М.И. Федорова Е.Э.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

**Аннотация.** Исследованы ионные антипортеры, участвующие в секвестрировании натрия NHX1 и NHX7: динамика экспрессии при солевом стрессе и локализация в инфицированных и неинфицированных клетках в клубеньках *Medicago truncatula*.

**Ключевые слова:** ризобийный симбиоз, солевой стресс, катион/протон антипортер

Симбиоз – двухкомпонентная система, состоящая из растения и бактерии. Результатом взаимодействия этих двух организмов является новый орган – корневой клубень, где создаются условия для восстановления азота воздуха, происходит симбиотическая азотфиксация. Клубеньки чувствительны к содержанию в почве NaCl. На основании низкой устойчивости клубенька к засолению, можно предположить, что клетки клубеньков имеют дефекты в поддержании ионного баланса. Поскольку выведение ионов натрия – это один из важнейших признаков солеустойчивости у растений, мы исследовали катион/протонные антипортеры, которые участвуют в секвестрировании натрия: NHX1 и NHX7 (Bassil and Blumwald, 2014). У *Arabidopsis thaliana* мембранные антипортеры Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> локализованы в разных мембранных компартментах: AtNHX7 на цитоплазматической мембране, AtNHX5-6 на эндосомах и AtNHX1-4 на тонопласте.

В клубеньках *Medicago truncatula* измерен уровень экспрессии методом qPCR при действии краткосрочного (5 дней) и долгосрочного (30 дней) солевого стресса. Отмечена динамика экспрессии антипортеров Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> NHX1 и NHX7 в корневых клубеньках в зависимости от срока действия стресса. Также исследована локализация Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> антипортера NHX1 методами иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии в клубеньках *Medicago truncatula*. Анализ локализации Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> антипортера NHX1 показал сигнал в неинфицированных и инфицированных клетках на тонопласте, также сигнал был частично связан со стареющими симбиосомами.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-04-00570A).

Bassil E., Blumwald E. The ins and outs of intracellular ion homeostasis: NHX-type cation/H<sup>+</sup> transporters //Current Opinion in Plant Biology. – 2014. – Vol. 22. – P. 1-6.

**Revealing the potential “master regulators” of pathogenesis in plants based on RNA-Seq data**Tsers I.<sup>1</sup>, Gorshkov V.<sup>1,2,3</sup>, Gogoleva N.<sup>1,2,3</sup>, Gogolev Y.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Federal Research Center “Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia; <sup>2</sup>Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Federal Research Center “Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia; <sup>3</sup>Kazan Federal University, Kazan, Russia  
E-mail: ivantsers@gmail.com

**Key message.** We propose an algorithm for RNA-Seq data analysis useful for revealing the “master regulators” of gene expression in experimental condition, as well as of cis-elements regulating transcript level of genes from certain groups.

**Keywords:** Transcriptomics, analysis of promoters, cis-elements

When analyzing plant transcriptomes, we aren't always able to explain the expression patterns of genes encoding similar proteins. The regulation of the expression of such genes may be explained through identifying certain cis-regulatory elements (CREs) in their promoters.

**Aim.** To develop an algorithm for correlating the expression patterns of differentially expressed genes (DEGs) with presence of binding sites for transcription factors (TF) of certain families within their promoters.

We compared transcriptomes of intact plants and plants infected with pectobacteria in order to reveal DEGs. For this, we were following standard pipeline for DE analysis. Using MapMan, KEGG and "manual" search, we split DEGs into functional categories. Using MAST, we searched CREs in the promoters of plant genes. Position weight motif matrices were obtained from PlantPAN3.0. To implement search of CREs that may be significant for the regulation of expression, we developed special scripts in R language. These scripts automatically compose a large number of DEGs samples according to the presence/absence of certain CREs in their promoters, rank the samples by size, test the significance of differences in expression between up- and down-regulated DEGs within samples. Finally, they render diagrams as the output of the analysis. We revealed 8606 DEGs in intact and infected plants. Around 2,3M CRE variants (that are binding sites for 999 different TFs) were found in promoters of plant genes. 18% of these CREs were located in promoters of DEGs. In some cases, pools of genes with specific CREs were enriched in DEGs. Among these CREs were those interacting with WRKY6, 42, 45, 51, 57 and TCP3, 15. The genes encoding the listed WRKYs (except for WRKY57) were up-regulated DEGs. These TFs are potential “master regulators” of infection. We also found that the presence of binding sites for WRKY (W-boxes) and for TCR transcription factors within the promoters of genes for chitinases significantly increases the probability for them to be up-regulated during the infection. Similar patterns were found for a number of other DEG groups.

The study is supported by Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (grant № 075-15-2019-1881).

**Выявление потенциальных «мастер-регуляторов» фитопатогенеза на основе данных РНК-секвенирования**Церс И.Д.<sup>1</sup>, Горшков В.Ю.<sup>1,2,3</sup>, Гоголева Н.Е.<sup>1,2,3</sup>, Гоголев Ю.В.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия;

<sup>2</sup>Казанский институт биохимии и биофизики - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия; <sup>3</sup>Казанский Федеральный Университет, Казань, Россия

**Аннотация.** Предложен алгоритм анализа данных RNA-seq, позволяющий выявить «мастер-регуляторы» экспрессии генов в условиях эксперимента и cis-элементы, наличие которых в промоторах группы генов определяет уровень их транскриптов.

**Ключевые слова:** транскриптомика, анализ промоторов, cis-элементы

При анализе транскриптомов растений не всегда удается объяснить наблюдаемый в условиях эксперимента характер экспрессии генов, кодирующих похожие белки, исходя из сходства первичных структур или функций этих белков. Регуляцию экспрессии таких генов можно объяснить путем выявления в их промоторных областях определенных cis-элементов (cis-regulatory elements, CRE), содержание которых может обуславливать наблюдаемые паттерны экспрессии.

Цель. Разработать алгоритм для поиска корреляций между характером экспрессии групп дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) и наличием в их промоторах сайтов связывания с транскрипционными факторами (ТФ), принадлежащими к определенным семействам.

Для выявления ДЭГ в интактных и инфицированных пектобактериями растениях мы сравнивали их транскриптомы, используя стандартный пайплайн. С помощью MapMan, KEGG и «ручного» поиска распределяли ДЭГ по функциональным категориям. Средствами MAST выполнили поиск CRE в промоторах генов растения (позиционные весовые матрицы мотивов для поиска загружены из PlantPAN3.0). CRE, значимые для регуляции экспрессии, мы искали с помощью специально написанных нами на языке R скриптов. Они автоматически составляют множество выборок ДЭГ по критерию наличия/отсутствия определенных CRE, ранжируют их по размеру и составу, тестируют достоверность различия экспрессии внутри них, представляют результат анализа в виде диаграмм.

В интактных и инфицированных растениях мы выявили 8606 ДЭГ. В промоторах генов растения найдено ~2,3 млн вариантов CRE, которые являются сайтами связывания для 999 различных ТФ. Из этих CRE ~18% расположены в промоторах ДЭГ. Несколько групп генов, содержащих определенные CRE, были насыщены ДЭГ. Это пулы генов, которые имеют CRE, связывающие ТФ: WRKY6, 42, 45, 51, 57 и TCP3, 15. Гены, кодирующие перечисленные WRKY (кроме WRKY57), были ДЭГ с повышенным уровнем экспрессии. Эти ТФ – потенциальные «мастер-регуляторы» развития инфекции. Мы также обнаружили, что присутствие сайтов связывания с WRKY в промоторах генов хитиназ увеличивает вероятность усиления их экспрессии при инфекции; аналогичные закономерности обнаружили для ряда других групп ДЭГ. Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2019-1881.

### Biopreparations for plants produced with basidiomycetes

Tsivileva O.M.<sup>1</sup>, Perfilova A.I.<sup>2</sup>, Pavlova A.G.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia;

<sup>2</sup>Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Irkutsk, Russia;

<sup>3</sup>Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

E-mail: tsivileva@ibppm.ru

**Key message.** Potentialities of the mushroom-originating preparations for potato recovery are shown. The metal(II) containing composites based on the metabolites of basidiomycetes exhibits the effect of enhancing the potato resistivity to phytopathogen.

**Keywords:** potato; mushrooms; phytopathogenic bacteria; metals(II); biocomposites

The development of agents effective against bacteria and safe for plants, for agricultural recovery from the bacterial pathogens remains actual. The chemical pesticides action is ecologically unfavorable. For solving such problems, the application of natural substances seems advisable.

This study is aimed at revealing of viability and response reactions of potato plants *in vitro* in the presence of metal(II)-containing composites manufactured with macromycetes' metabolites, potentially useful for developing the technology for recovery of plants.

The results gained in the course of research into the influence of metal(II)-containing composites made on the basis of extracellular metabolites of basidiomycetes *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola umbellata*, *Laetiporus sulphureus*, on the viability and response reactions of potato plants *in vitro* allow us to conclude the following.

Metal-containing biocomposites based on *G. lucidum* possess the greatest antibiofilm-forming efficiency vs the potato ring-rot causative agent, bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*). Iron- and cobalt-containing biopreparations suppress the occurrence of *Cms* biofilms by 40-50%.

Cobalt-containing agent is characterized by the noticeable increase in root biomass of potato plants, that, taking into account the antibiofilm-forming effect vs *Cms*, could be prerequisite for advisability of cobalt compounds' application to manufacture the biocomposites from basidiomycetes.

Copper-containing preparation based on *G. lucidum* is characterized by the moderate bactericidal and bacteriostatic action, possesses the antibiofilm-forming efficiency against *Cms*, does not exert negative impact in respect to any biometric parameter under question in potato plants, does not show any phytotoxic action with plants, and enhances the potato resistivity to *Cms*.

One of the aspects of further research into the biocomposites based on the mushroom's metabolites should be putting into practice the ecologically safe agents against the bacterial infection of potato, that is actual under the conditions of increasing phytopathogen's resistivity to chemically made pesticides.

### Биопрепараты для растений на основе базидиомицетов

Цивилева О.М.<sup>1</sup>, Перфильева А.И.<sup>2</sup>, Павлова А.Г.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия; <sup>2</sup>Сибирский Институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия;

<sup>3</sup>Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

**Аннотация.** Показана перспективность грибных препаратов для оздоровления картофеля. Содержащие металлы(II) композиты, полученные на основе метаболитов базидиомицетов, обладали эффектом усиления устойчивости картофеля к фитопатогену.

**Ключевые слова:** картофель; высшие грибы; фитопатогенные бактерии; металлы(II); биокомпозиты

Остается актуальной разработка эффективных против бактерий и безопасных для растений субстанций для оздоровления от бактериальных фитопатогенов. Действие химических пестицидов сопряжено с экологическими рисками. К решению подобных задач целесообразно подходить с применением препаратов на основе природных соединений.

Цель исследования – выявление жизнеспособности и ответных реакций растений картофеля *in vitro* в присутствии содержащих металлы(II) композитов, полученных на основе метаболитов макромицетов, с перспективой создания технологии оздоровления сельскохозяйственных растений.

Результаты, полученные в ходе исследования влияния содержащих металлы(II) композитов, полученных на основе внеклеточных метаболитов базидиомицетов *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola umbellata*, *Laetiporus sulphureus*, на жизнеспособность и ответные реакции растений картофеля *in vitro*, позволили сделать следующие выводы.

Металлсодержащие биокомпозиты на основе *G. lucidum* обладают наибольшей антибиопленкообразующей эффективностью против возбудителя кольцевой гнили картофеля, бактерии *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*). Fe- и Co-содержащие биопрепараты подавляют образование биопленок *Cms* на 40-50%.

Кобальт-содержащий агент характеризуется заметным увеличением биомассы корней растений картофеля, что, с учетом эффекта подавления образования биопленок *Cms*, можно считать предпосылкой целесообразности применения соединений кобальта для получения биокомпозитов на основе базидиомицетов.

Медь-содержащий препарат на основе *G. lucidum* характеризуется умеренным бактерицидным и бактериостатическим действием, обладает антибиопленкообразующей эффективностью против *Cms*, не оказывает негативного влияния ни на один из изученных биометрических параметров растений, не проявляет фитотоксического действия в отношении растений, усиливает устойчивость картофеля к *Cms*.

Одним из аспектов дальнейшего исследования биокомпозитов из метаболитов высших грибов должно стать введение в практику экологически безопасных средств против бактериального заражения картофеля, актуальное в условиях повышающейся устойчивости фитопатогенов к пестицидам химического происхождения.

**Effect of *Bacillus* bacteria on activity of pathogen-induced proteins in potato plants and increasing their resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary**Tsvetkov V.O.<sup>2</sup>, Yarullina L.G.<sup>1,2</sup>, Burkhanova G.F.<sup>1</sup>, Sorokan A.V.<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre, Ufa, Russia; <sup>2</sup>Bashkir State University, Ufa, Russia  
E-mail: yarullina@bk.ru

**Key message.** We studied the effect of the *Bacillus* bacteria on the content and activity of defensive compounds in potato plants upon infection with late blight pathogen. Bacterial treatment had a stimulating effect on the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and transcriptional activity of hydrolase inhibitor genes.

**Keywords:** potato, *Phytophthora infestans*, bacteria of the genus *Bacillus*, ROS, protease and amylase inhibitors

In modern conditions of high anthropogenic pressure on agroecosystems, the issue of ecologically safe crop production, which requires new approaches to protecting plants from pathogens, is acute. Of great importance in the signal regulation of plant resistance to pathogens is assigned to non-pathogenic rhizobacteria that regulate plant growth (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR). Most of them trigger a cascade of defense reactions in plant tissues due to the production of various metabolites. Of particular interest among the metabolites of bacteria of the genus *Bacillus* sp. represent cyclic low molecular weight lipopeptides – surfactin, iturin and fengicin. In particular, surfactins trigger the active generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in tobacco plants and a number of components of the oxylipin signaling defense system, including the activity of proteinase inhibitors. Since PGPR positively affects the resistance of plants to pathogens and helps increase their productivity, these compounds are widely used in agricultural practice. At the same time, the mechanisms of the formation of a protective response under the influence of signaling molecules are not well understood.

The object of research was potato plants grown from micro-tubers. Some of the plants were inoculated with a suspension of bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis*, then they were infected with late blight pathogen – oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. A comparative assessment was made of the damage to plants by the pathogen, the content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrolases and their inhibitors, and the transcriptional activity of protease and amylase inhibitor genes in plant tissues. Statistical data processing was carried out using computer software StatSoft Statistica 6.0.

Studies have shown that under the influence of treatment with bacteria *B. subtilis* and *B. thuringiensis* there is a decrease in the degree of development of symptoms of the disease on potato leaves by an average of 25.0 ± 2.0%. The data obtained indicate that endophytic bacteria increase the resistance of potato plants. In response to *B. subtilis* treatment and *P. infestans* infection, the level of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in potato leaves increased. Moreover, *B. subtilis* had a stimulating effect on the production of hydrogen peroxide already 24 hours after infection. Bacteria *B. thuringiensis* exhibited the maximum stimulating effect on the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 48 hours after infection. The formation of ROS is one of the earliest responses of plant cells to contact with a pathogen, as a result of which protective reactions of the plant are induced, including the synthesis of PR proteins.

The main weapon of attack of pathogens are the hydrolytic enzymes produced by them, which destroy the cell walls of plants and ensure the introduction of the fungus into tissues. The protective response of plants is accompanied by the synthesis of inhibitors of these enzymes. In our studies, *B. subtilis* and *B. thuringiensis* stimulated the transcriptional activity of amylase and proteinase inhibitor genes in uninfected potato plants, but especially when infected. Treatment with *B. subtilis* and *B. thuringiensis* caused an increase in protease activity in the absence of *P. infestans* infection, as well as amylases, both in infected and in uninfected plants. The activity of amylase inhibitors in the leaves of infected plants increased when treated with both species of bacteria; in uninfected plants, treatment with *B. thuringiensis* resulted in increased activity of protease inhibitors. Probably, in response to infection with *P. infestans*, *de novo* enzyme inhibitors that can inhibit the pathogen hydrolase activity can be synthesized in potato plants.

The work was partially carried out on the topic of state assignment, No. state. registration AAAA-A16-116020350027-7, and with partial financial support from the Grant of the President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists – candidates of sciences, No. 075-15-2019-293.





### Symbiotic nodule development

Tsyganov V.E.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Saint Petersburg Scientific Center RAS, Saint Petersburg, Russia  
E-mail: [tsyganov@arriam.spb.ru](mailto:tsyganov@arriam.spb.ru)

**Key message.** *The interaction of legumes with rhizobia leads to formation of the symbiotic nodules on their roots, which are specialized plant organs for nitrogen fixation. Considerable progress has been made in deciphering the molecular-genetic and cellular mechanisms of symbiotic nodule development in recent years. However, some aspects of nodule development clearly merit much more attention.*

**Keywords:** *symbiotic nodule, infection thread, symbiosome, cytoskeleton, phytohormones*

The formation of symbiotic nodule is based on a signaling dialogue between symbionts, which begins with the induction of rhizobial *nod* genes by flavonoids, resulting in the synthesis of lipochitooligosaccharides, called Nod factors. Nod factors trigger a signaling cascade leading to the root hair curling, initiation of the infection thread growth, and induction of cell divisions in the pericycle and root cortex. Currently, many elements of the signaling cascade are identified, including receptor kinases, flotillins, remorin, calcium calmodulin-dependent kinase, ion channels, nucleoporins and transcription factors. In addition to perception of Nod factor, the perception of bacterial exopolysaccharides with the specific receptor is important for successful infection. The development of a symbiotic nodule is accompanied by differentiation of both the cells of the host plant and rhizobia. Rhizobia are changing to forms specialized for nitrogen fixation, called bacteroids. Bacteroids, surrounded by a symbiotic membrane of plant origin, form organelle-like structures, called symbiosomes. Legumes belonging to clade Inverted Repeat-Lacking Clade are characterized by terminal differentiation of bacteroids, which is mediated by the action of nodule-specific cysteine-rich peptides (NCR peptides). NCR peptides are also important for bacteroid survival inside host cells. The differentiation of the infected cell is accompanied by a reorganization of the elements of the tubulin and actin cytoskeleton, aimed at creating conditions for a significant increase in cell size and distribution of cellular organelles and symbiosomes in the cell. There are two types of nodule development, which depend on whether the induced meristem is long-lasting (indeterminate) or transient (determinate). In indeterminate nodules due to prolonged meristem activity different histological zones can be distinguished, including infection zone, nitrogen fixation zone and senescence zone. Some cells remain uninfected and they do not increase in size and are characterized by a dense network of cortical microtubules, which are mainly oriented parallel to each other and perpendicular to the cell axis. An important role in the development of nodules is played by phytohormones. For example, gibberellins and cytokinins play a positive role in the functioning of nodules, and ethylene and abscisic acid are negative regulators, stimulating the termination of the functioning of nodules and their transition to senescence, aimed at the recycling of nutrients. The active antioxidant system in nodule maintains concentrations of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in the cell at the certain levels. One of the key components of antioxidant system in nodule is glutathione, which participates at different stages of nodule development. Despite significant progress in studying the mechanisms of development of symbiotic nodules, many questions remain unresolved. It is not known exactly how the signal transduction activated by Nod factors from receptors located on the membrane to the nucleus is carried out. Of great interest is the study of the distribution mechanisms of various organelles, including symbiosomes, in an infected cell. Thus, these aspects of molecular-genetic and cellular mechanisms of nodule development clearly merit much more attention.

This work was financially supported by RSF 16-16-10035.

**The formation of symbiotic interface in root nodules of *Pisum sativum* L. and *Medicago truncatula* Gaertn**Tsyganova A.V.<sup>1</sup>, Seliverstova E.V.<sup>1,2</sup>, Brewin N.J.<sup>3</sup>, Tsyganov V.E.<sup>1,4</sup><sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia; <sup>3</sup>John Innes Centre, Norwich, United Kingdom; <sup>4</sup>Saint Petersburg Scientific Center RAS, Saint Petersburg, Russia

E-mail: isaakij@mail.ru

**Key message.** The infection of root cells of legumes with rhizobia involves the gradual remodelling of the plant-microbial interface. General and species-specific features of symbiotic interface remodelling during nodule development were demonstrated.

**Keywords:** symbiotic nodule, cell wall, extracellular matrix, pectin, arabinogalactan protein

In legumes during the symbiotic interaction with rhizobia, the plant cell walls, extracellular matrix and bacterial surface polysaccharides are part of the intimate interface for developmental coordination and nutrient exchange. Plant symbiotic interface remodelling is a fundamental aspect of the *Rhizobium*-infection process. The aim of this work was to analyze modification and remodelling of the plant cell surface during nodule development in two legume species. We used monoclonal antibodies to characterize the distribution of the homogalacturonan (HG), rhamnogalacturonan-I (RG-I), extensin and arabinogalactan proteins (AGP) in wild-type and ineffective mutant nodules in *Pisum sativum* L. and *Medicago truncatula* Gaertn. Immunocytochemical analyses, fluorescence and transmission electron microscopy were used. During nodule development in *P. sativum* and *M. truncatula*, high methyl-esterified HG recognized by JIM7 was demonstrated throughout both the cell wall and the infection thread wall at all nodule developmental stages. Low methyl-esterified HG recognized by JIM5 participated in increased rigidity of cell walls and walls of infection threads, especially in nodules of *P. sativum* mutant SGEFix-2 (*sym33-3*) and *M. truncatula* mutant TR3 (*ipd3*). RG-I was present in meristematic cell walls, vascular bundles in both species and in infection thread walls in nodules of *P. sativum* only. The membrane anchored AGP recognized by JIM1 was present not only on the plasma membrane of *P. sativum* nodules, but also on the symbiosome membrane. The increase in JIM1 labelling with aging suggests that AGP recognized by JIM1 participates in the maturation of symbiosomes in *P. sativum* wild-type nodules. LM6-M, which recognize both AGP and arabinan side chain of RG-I was present in the cell walls at all nodule developmental stages as well as in juvenile symbiosomes in the infection zone and early nitrogen fixation zone in wild-type nodules of both *P. sativum* and *M. truncatula*, and in mutants of *P. sativum* Sprint2Fix<sup>-</sup> (*sym31*) and *M. truncatula* *dnf-1* characterized by undifferentiated bacteroids. Subsequently, in the nitrogen fixation zone, the label from the symbiosomes disappeared. In the mutants of *P. sativum* SGEFix-2 (*sym33-3*) and *M. truncatula* TR3 (*ipd3*), characterised by the absence of bacterial release, the LM6 label was localized exclusively in the cell walls. Extensins – hydroxyproline-rich proteins – are part of the extracellular matrix. Extensin labelled with JIM11 was localized mainly in the matrix of infection threads and droplets and in the intercellular matrix in both *P. sativum* and *M. truncatula* nodules. An increase in the accumulation of extensin in the extracellular space matrix, especially at the cell junctions, was observed in nodules of mutants Sprint2Fix<sup>-</sup> (*sym31*) and *dnf-1* characterized by undifferentiated bacteroids. Differences in the localization of RG-I and AGP with a GPI anchor between *P. sativum* and *M. truncatula* indicate that in different plants the cell walls and intercellular matrix are formed by various components and are species-specific.

This work was financially supported by Russian Science Foundation (16-16-10035).

### Insecticidal properties of strains of the granulosa virus of the codling moth from the Bioresource collection of FSBI VNIIBZR

Tsygichko A.A., Asaturova A.M., Pavlova M.D., Tomashevich N.S.

Federal State Budget Scientific Institution "All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection", Krasnodar, Russia  
E-mail: 23612361@inbox.ru

**Key message.** The insecticidal activity of strains from DBK of the Federal State Budget Scientific Institution VNIIBZR "State Collection of Entomoacarifagi and Microorganisms" was studied with respect to the test object *Galleria mellonella* L. and with respect to the target insect *Cydia pomonella* L. It was revealed that strain BZR 14 is promising for further study and development of a laboratory sample based on it.

**Keywords:** apple codling moth, granulosis, insect virus.

In the southern region, the codling moth *Cydia pomonella* L. retains the status of a dangerous pest. The use of biologics based on the granulose virus of the codling moth is one of the methods for limiting the number of pests (Gasque, S. N., van Oers, M. M., & Ros, 2019). To evaluate new strains of the virus, it is necessary to establish their insecticidal activity. In this regard, the goal of our study is to identify the insecticidal activity of collection strains of the apple codling moth granulosis virus.

New native strains included in the DBK Federal State Budget Scientific Institution VNIIBZR "State Collection of Entomoacariphages and Microorganisms" were tested on a test object - caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella* L. 4-5 of age and on the caterpillars of the codling moth *Cydia pomonella* L. 3-4 of the age. For this, an insect was fed a substrate pretreated with a viral suspension of strains and the number of dead individuals was recorded (Burov V.N., 1995; Mitrofanov V.B., Smirnov O.V., 1998). The reference was an insecticidal biological product Fermovirin YP, SP, the active substance of which is a strain of the granulose virus, which was isolated and patented abroad. It was found that the strains BZR 10, BZR 1, BZR L-5, BZR L – 7 showed the highest insecticidal activity against the test object. However, when testing these strains on the apple moth, their activity was significantly lower than Fermovirin YaP, SP.

The reverse situation was observed in the study of strain BZR 14, which showed insecticidal activity at the level of 33% with respect to the test object. However, when testing it on a target insect, the mortality of individuals was 86%, which is 15% higher than when using the reference preparation. Thus, the strain BZR 14 is promising for its further study and development of a laboratory sample of bioinsecticide based on it.

Isolation of pure cultures and screening of strains of the granulosis virus of the codling moth were performed in accordance with State Order No. 075-00376-19-00 of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of research on the topic No. 0686-2019-0009, studies of the insecticidal activity of the strains were carried out with financial support from the grant RFBR and the administration of the Krasnodar Territory No. 19-416-233037\_r\_mol\_a.

### Инсектицидные свойства штаммов вируса гранулёза яблонной плодожорки из Биоресурсной коллекции ФГБНУ ВНИИБЗР

Цыгичко А.А., Асатурова А.М., Павлова М.Д., Томашевич Н.С.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений», Краснодар, Россия

**Аннотация.** Изучена инсектицидная активность штаммов из БРК ФГБНУ ВНИИБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов» в отношении тест-объекта *Galleria mellonella* L. и в отношении целевого насекомого *Cydia pomonella* L. Выявлено, что штамм BZR 14 является перспективным для дальнейшего его изучения и разработки лабораторного образца биоинсектицида на его основе.

**Ключевые слова:** яблонная плодожорка, гранулёз, вирус насекомых.

В условиях южного региона яблонная плодожорка *Cydia pomonella* L. сохраняет статус опасного вредителя. Использование биопрепаратов на основе вируса гранулёза яблонной плодожорки – это один из методов ограничения численности вредителя (Gasque, S. N., van Oers, M. M., Ros, 2019). Для оценки новых штаммов вируса необходимо установить их инсектицидную активность. В связи с этим цель нашего исследования – выявить инсектицидную активность коллекционных штаммов вируса гранулёза яблонной плодожорки.

Новые аборигенные штаммы, входящие в БРК ФГБНУ ВНИИБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов», были испытаны на тест-объекте – гусеницах восковой моли *Galleria mellonella* L. 4-5 возраста и на гусеницах яблонной плодожорки *Cydia pomonella* L. 3-4 возраста. Для этого насекомым скармливали субстрат, предварительно обработанный вирусной суспензией штаммов, и фиксировали количество погибших особей (Буров В.Н., 1995; Митрофанов В.Б., Смирнов О.В., 1998). В качестве эталона выступал инсектицидный биопрепарат Фермовирин ЯП, СП, действующим веществом которого является штамм вируса гранулёза, который был выделен и запатентован за рубежом. Было обнаружено, что наибольшую инсектицидную активность в отношении тест-объекта проявляли штаммы BZR 10, BZR 1, BZR L-5, BZR L–7. Однако при испытании данных штаммов на яблонной плодожорке их активность была значительно ниже Фермовирин ЯП, СП.

Обратная ситуация наблюдалась при исследовании штамма BZR 14, который в отношении тест-объекта проявил инсектицидную активность на уровне 33 %. Однако, при испытании его на целевом насекомом смертность особей составила 86%, что на 15% выше, чем при использовании эталонного препарата. Таким образом, штамм BZR 14 является перспективным для дальнейшего его изучения и разработки лабораторного образца биоинсектицида на его основе.

Выделение чистых культур и скрининг штаммов вируса гранулёза яблонной плодожорки выполнены на согласно Государственному заданию № 075-00376-19-00 Министерства науки и высшего образования РФ в рамках НИР по теме № 0686-2019-0009, исследования инсектицидной активности штаммов выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ и администрации Краснодарского края № 19-416-233037\_r\_mol\_a.

1. Буров, В.Н. Методы оценки экологической безопасности пестицидов при использовании их в интегрированной защите растений. Методические указания / В.Н. Буров, С.Л. Тютюрев, Г.И. Сухорученко, Т.М. Петрова. – СПб., 1995. – 14 с.
2. Gasque, S.N., van Oers, M.M., Ros, V.I. Where the baculoviruses lead, the caterpillars follow: Baculovirus-induced alterations in caterpillar behavior / Current Opinion in Insect Science. – № 33. 2019. P. 30-36.
3. Митрофанов В.Б., Смирнов О.В. Энтомопатогенные вирусы в защите растений. Производство экологически безопасной продукции растениеводства / Под общ. ред. М.С. Соколова, Е.П. Угрюмова. - Пушино: ВНИИБЗР, 1998. – 252 с.

### Metabolic transformation of selenium (IV) by bacteria of the genus *Azospirillum*

Tugarova A.V., Mamchenkova P.V., Kamnev A.A.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

E-mail: tugarova\_anna@mail.ru

**Key message.** Possible mechanisms of selenite reduction by bacteria of the genus *Azospirillum* are studied. A method is proposed for producing extracellular Se nanoparticles homogeneous by size which have been characterised by various methods.

**Keywords:** selenium, selenium oxoanions, nanoparticles, *Azospirillum*

Bacteria are involved in the transformation of selenium compounds in different oxidation states, reducing selenium oxyanions, which are toxic owing to their solubility, to less toxic insoluble  $\text{Se}^0$  and selenides, often with the formation of nanoparticles. This phenomenon is of interest to various fields of biotechnology. In this work, we present the results of studies on the reduction of selenite ions ( $\text{SeO}_3^{2-}$ , selenium in the oxidation state +4) by bacteria of the genus *Azospirillum*. Eight species of *Azospirillum* were studied: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. halopraeferens*, *A. thiophilum*, *A. zaeae*, *A. formosense*, *A. palatum* and *A. picis*. All of them were able to reduce selenite and form selenium nanoparticles (Se-NPs). Using the species *A. brasilense*, we studied the role of different mechanisms potentially involved in this process: the denitrification system, glutathione redox system, and  $\text{H}^+$ -dependent transport. A scheme has been developed for obtaining extracellular Se-NPs homogeneous by size, including growth, purification and concentration of bacterial cells followed by incubation with sodium selenite [1]. Se-NPs synthesised by the species *A. brasilense* and *A. thiophilum* were studied using various methods: dynamic light scattering, TEM, vibrational spectroscopy (Fourier transform infrared and Raman spectroscopies), protein electrophoresis, etc. The Se-NPs had zeta potentials of  $-18.5$  to  $-23.7$  mV, contained proteins, polysaccharides and lipids and consisted of  $\text{Se}^0$  in its amorphous modification [2,3]. Basing on the results obtained, we suggest that selenite reduction by azospirilla can include the following stages: (1) transport of  $\text{SeO}_3^{2-}$  inside the cell; (2) intracellular reduction of selenite ions involving the denitrification system; (3) transport of the Se-NPs nuclei out of the bacterial cell involving proton motive force-dependent transport; (4) extracellular assembly of Se-NPs in the vicinity of the cell surface involving biological molecules. This study was supported by The Russian Foundation for Basic Research (Grant 16-08-01302-a).

### Метаболическая трансформация селена (IV) бактериями рода *Azospirillum*

Тугарова А.В., Мамченкова П.В., Камнев А.А.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

**Аннотация.** Изучены возможные механизмы восстановления селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum*. Подобрана схема получения экстраклеточных гомогенных по размеру наночастиц Se, которые охарактеризованы различными методами.

**Ключевые слова:** селен, оксоанионы селена, наночастицы, *Azospirillum*

Бактерии участвуют в трансформации соединений селена в различных степенях окисления, восстанавливая токсичные, в силу своей растворимости, оксоанионы селена до менее токсичных нерастворимых элементарного селена и селенидов, часто – с формированием наночастиц. Этот феномен представляет интерес для различных областей биотехнологии. В данной работе представлены результаты исследования восстановления бактериями рода *Azospirillum* селенит-ионов ( $\text{SeO}_3^{2-}$ , селен в степени окисления +4). Было исследовано 8 видов азоспирилл: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. halopraeferens*, *A. thiophilum*, *A. zaeae*, *A. formosense*, *A. palatum* и *A. picis*. Все они были способны восстанавливать селенит и образовывать наночастицы селена (Se-НЧ). На примере вида *A. brasilense* изучено участие различных механизмов, потенциально вовлеченных в этот процесс: система денитрификации, редокс-система глутатиона и  $\text{H}^+$ -зависимый транспорт. Подобрана схема для получения экстраклеточных гомогенных по размеру Se-НЧ, включающая выращивание, очистку и концентрирование бактериальных клеток с последующей инкубацией с селенитом натрия [1]. Синтезированные видами *A. brasilense* и *A. thiophilum* Se-НЧ исследованы с использованием различных методов: динамического рассеяния света, ПЭМ, колебательной спектроскопии (ИК-фурье-спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния), белкового электрофореза и др. Se-НЧ имели дзета-потенциал от  $-18,5$  до  $-23,7$  мВ, содержали в своем составе белки, полисахариды и липиды и содержали элементарный селен в аморфной модификации [2,3]. На основе полученных результатов мы предполагаем, что восстановление селенит-ионов азоспириллами может включать следующие стадии: (1) транспорт  $\text{SeO}_3^{2-}$  внутрь клеток; (2) внутриклеточное восстановление с включением селенит-ионов в систему денитрификации; (3) вынос зародышей Se-НЧ из бактериальных клеток посредством протон-зависимого транспорта; (4) внеклеточная сборка Se-НЧ вблизи поверхности клеток с участием биологических макромолекул. Работа поддержана грантом РФФИ 16-08-01302-а.

1. Tugarova A.V. et al. New Biotechnol. 58 (2020) 17-24.

2. Kamnev A.A. et al. J. Mol. Struct. 1140 (2017) 106-112.

3. Tugarova A.V. et al. Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. 192 (2018) 458-463.

### **Bireporter vector for analysis of cis-regulatory elements in plants**

Tyurin A.A., Kabardaeva K.V., Suhorukova A.V., Kouchoro F., Fridman V.A., Goldenkova-Pavlova I.V.  
Institute of Plant Physiology K.A. Timiryazev Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
E-mail: alexjofar@gmail.com

**Key message.** A bireporter vector for the study of translational cis-regulatory elements has been created and tested.

**Keywords:** translational enhancers, agroinfiltration, transient expression, *N. benthamiana*

Agroinfiltration of plants has long been one of the main approaches to testing genes and regulatory elements.

The purpose of this study is to create a bireporter vector containing a tandem bundle of the internal control system and the main expression cassette.

To construct the base plasmid was used CPEC (circular polymerase extension cloning). Agroinfiltration of four-week-old *N. benthamiana* plants was carried out using *A. tumefaciens* (GV3101). The expression levels of the target genes were evaluated by fluorescence of their products. Statistical data processing and visualization was performed using the SciPy and Matplotlib libraries for Python.

The pIRF bioreport vector is designed to test translational cis-regulatory elements. The basis for the tandem vector was previously developed by the authors, the plasmid pVIG-T, optimized for transient expression in plants. The internal control system is represented by the *gfp* gene under the control of the actin promoter of *Arabidopsis*, the target expression cassette includes the *rfp* gene and the SmAM430 promoter.

To test the created vector, well-known translational enhancers are integrated into the base plasmid: plant (AT30, AT65, AT100 and AT208) and viral ( $\Omega$ ) origin.

The main idea in the development of PIRF is that the physical coupling of the two reporter systems will give a linear relationship during their translation. Therefore, linear regression was used to analyze fluorimetric data. Thus, the expression levels of the studied constructs were expressed by the slope of the regression line relative to the control variant.

The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 18-14-00026; IVG-P.

### **Бирепортерный вектор для анализа цис-регуляторных элементов в растениях**

Тюрин А.А., Кабардаева К.В., Сухорукова А.В., Кучоро Ф., Фридман В.А., Голденкова-Павлова И.В.  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

**Аннотация.** Создан и апробирован бирепортерный вектор для изучения трансляционных цис-регуляторных элементов.

**Ключевые слова:** трансляционные энхансеры, агроинфильтрация, транзientная экспрессия, *N. benthamiana*

Агроинфильтрация растений уже давно стала одним из основных подходов к тестированию генов и регуляторных элементов.

Цель данного исследования – создание бирепортерного вектора, содержащего тандемную связку системы внутреннего контроля и основной экспрессионной кассеты.

Для конструирования базовой плазмиды применяли CPEC (circular polymerase extension cloning). Агроинфильтрацию 4-х недельных растений *N. benthamiana* проводили, используя *A. tumefaciens* (GV3101). Уровни экспрессии целевых генов оценивали по флуоресценции их продуктов. Статистическую обработку данных и их визуализацию проводили, задействуя библиотеки SciPy и Matplotlib для Python.

Бирепортерный вектор pIRF разработан для тестирования трансляционных цис-регуляторных элементов. Основой для тандемного вектора послужила, ранее разработанная авторами, плазида pVIG-T, оптимизированная для транзientной экспрессии в растениях. Система внутреннего контроля представлена геном *gfp* под контролем промотора актина арабидопсиса, целевая экспрессионная кассета включает ген *rfp* и промотор SmAM430.

Для тестирования созданного вектора в базовую плазмиду интегрированы известные трансляционные энхансеры: растительного (AT30, AT65, AT100 и AT208) и вирусного ( $\Omega$ ) происхождения.

Главная идея при разработке pIRF заключается в том, что физическое сцепление двух репортерных систем даст линейную зависимость при их трансляции. Поэтому для анализа данных флуориметрии применяли линейную регрессию. Таким образом, уровни экспрессии исследуемых конструкций выражались наклоном регрессионной прямой относительно контрольного варианта.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 18-14-00026; IVG-P.



**Association of nitrogen-fixing microorganisms in the surface of nodules in wild perennial leguminous plants  
*Onobrychis transcaucasica* and *Onobrychis chorassanica***

Umarov B.R.

Department natural science. Uzbek State World Language University, Tashkent, Uzbekistan

E-mail: b.r.umarov@mail.ru

**Key message.** The results of molecular genetic analysis root nodule bacteria wild leguminous plants germinating in the Arid zones Central Asia can penetrate into various nitrogen-fixing microorganisms. Bacteria of plants *Onobrychis transcaucasica* and *Onobrychis chorassanica* origin are found bacteria in the class *Alphaproteobacteria* and some nitrogen-fixing bacteria which we are write were in the class of *Betaproteobacteria*.

**Keywords:** leguminous plants, *Onobrychis*, root nodule bacteria, molecular genetic analysis

Over 100 nitrogen-fixing microorganisms were isolated from the nodules of perennial wild leguminous plants *Onobrychis transcaucasica* and *Onobrychis chorassanica* growing in the desert territories of Uzbekistan. According to the results of a taxonomic analysis, the 16S rDNA gene found that the isolated bacteria more than 50% belong to different types of nitrogen-fixing bacteria. Nucleotide sequencing of the 16S rRNA gene and NCBI BLAST analysis showed in the nodule bacteria of *Onobrychis* plants were found many different nitrogen-fixing bacteria's, as *Paenobacillus* sp., *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Enterobacter* and *Pantoea*.

It has been shown a possibility of growing up of *Onobrychis* plants at minimal additional moisture of sabulous soils in the Kyzyl Kum Desert, creating artificial pastures and thereby immobilizing the desert blown sands. Although more than on 32 million ha worldwide alfalfa is grown, it is conducted a search for new special purpose forage legumes supported by smaller plantings of species of *Coronilla*, *Onobrychis*, and *Lotus*.

In all studies on the isolation of bacteria from nodules, acetylene reduction assay, experiments with micro-vegetation, CTAB genomic DNA extraction were used by laboratory manual of the professor Sharon R. Long (<http://longlab.stanford.edu/protocols.html>). Molecular genetic analysis, a study with the PCR analysis, the selection of 16 rDNA primers, *nodC*, *nifHF*, ERIC, Box and other primers, as well as all the methods used, are described in research Laguerre et al. (2001).

The results of molecular genetic analysis root nodule bacteria (or in inside root nodule) wild leguminous plants germinating in the Arid zones Central Asia can penetrate into various nitrogen-fixing microorganisms. As revealed in our studies. According to NCBI BLASTN analysis and phylogenetic analysis, it is that bacteria of plants *Onobrychis transcaucasica* and *Onobrychis chorassanica* origin are found bacteria in the class *Alphaproteobacteria* and some nitrogen-fixing bacteria which we are write were in the class of *Betaproteobacteria*.

The author is grateful to the Dr. Ines Soares, BGU-Israel for conducting molecular genetic analysis of this work.

**Film coatings based on exopolysaccharides of lactic acid bacteria and their use**

Uryadova G.T., Fokina N.A., Karpunina L.V.

Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilova, Saratov, Russia

E-mail: [eni\\_galina@mail.ru](mailto:eni_galina@mail.ru)

**Key message.** It is shown that film coatings based on the exopolysaccharides of lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* B-1662 and *Streptococcus thermophilus* contribute to the healing of burns in rats.

**Keywords:** exopolysaccharides, *Lactococcus lactis* B-1662, *Streptococcus thermophilus*, burn, rats

In recent years, polysaccharides, due to their high biological activity in animals and humans, are increasingly used in cosmeceuticals, medicine, and veterinary medicine [1-2]. Among them, bacterial polysaccharides are gaining importance, the advantage of which is climatic independence, simplicity and economy of production, regulation of properties, and among them – exopolysaccharides (EPS) of lactic acid bacteria, since these bacteria have the GRAS status as safe. The aim of the work was to study the effect of film coatings based on the EPS of *Lactococcus lactis* B-1662 and *Streptococcus thermophilus* on the healing of degree IIIa burns in female rats. The study was conducted on rats, divided into 5 groups: group 1 – intact animals (without a burn), group 2 – animals that caused a burn, group 3 – animals that caused a burn, and after the burn, a commercial preparation of 5% dexpanthenol was applied («Pantoderm», JSC «AKRIKHIN», Russia), group 4 – animals that were film-coated after burns created on the basis of EPS of *L. lactis* B-1662, group 5 – animals, which after the burned film-coated films created on the basis of EPS *S. thermophilus*. To create the film coatings, an aqueous EPS solution of *L. lactis* B-1662 or *S. thermophilus*, carboxymethyl cellulose (CMC) (Fluka, Switzerland) and glycerin plasticizer were used. The result was a homogeneous, transparent, gelatinous gel, which, when solidified, formed a film. A degree IIIa burn was simulated on female outbred rats under ether anesthesia on the rat interscapular space with the bottom of a tube containing boiling water for 30 seconds [3]. 5% dexpanthenol and film coatings were applied to the burn site immediately after the burn was reproduced and then daily for 28 days. The healing process of the burn was judged by changing the area of the damaged surface, restoring the coat, wound healing [3] after 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, and 28 days.

In rats, which in the course of the experiment, a film coating created on the basis of the EPS of *L. lactis* B-1662 (group 4) was applied to the wound, the complete healing of the skin was observed on the 23rd day, and the complete restoration of the coat occurred on the 25th day, while in the control group of animals with a burn without treatment (group 2) and in the group of animals treated with 5% dexpanthenol (group 3), complete healing was observed after 28 days.

When applying a film coating created on the basis of EPS of *S. thermophilus* for treating a burn, in animals of group 5, complete healing of the skin was noted already at 21 days and by this time almost complete restoration of the coat was taking place.

Thus, film coatings based on the EPS of *L. lactis* B-1662 and *S. thermophilus* contributed to the healing of burns in rats and the restoration of skin and wool coat earlier than in animals without treatment and using 5% dexpanthenol. The greatest regenerating effect was revealed with respect to the film coating created on the basis of the EPS of *S. thermophilus*.

1. Patent of Russian Federation № 2108114. A method of treating a deep skin burn. Bull. No. 10. Publ. 04/10/98.
2. Sanin, A.V. Strengthening the regeneration of hematopoiesis and changes in the hematopoietic system of mice under the influence of the bacterial polysaccharide salmosan / A.V. Sanin, T.A. Krasnyanekaya, E.B. Mysyakin [et al.] // Immunology. – 1988. – No. 1. – P. 54-58.
3. Sexton, N.S. The effect of the ionized silver preparation on the reparative regeneration of the skin and underlying tissues in modeling thermal and chemical burns in rats / N. S. Ponomari // Biomedicine. – 2012. – No. 1. – S. 143-148.

### Sequencing and analysis of genomes of bacteria used to protect plants and animals from diseases

Valentovich L.N., Muratova A.A., Shavela Yu.V., Sikolenko M.A. Akhremchuk A.E.

Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

E-mail: valentovich@mbio.bas-net.by

**Key message.** The main stages of work with perspective strains for protecting plants and animals from diseases are presented: genome sequencing and analysis, genetic construction of improved strains and checking their survival under model conditions.

**Keywords:** sequencing, genome, bacteria, bioagents

According to the United Nations Food and Agriculture Organization (FAO), in recent decades the acceleration of agricultural productivity growth has been constrained by the degradation of natural resources, declining biodiversity, and the spread of plant and animal diseases, mainly due to the emergence of pathogens with antimicrobial resistance [1]. At the same time, toxicological criteria for the use of synthetic chemicals to protect plants and animals from diseases are being made more rigorous. Therefore, at present the most promising approach is the use of biological agents, since many microorganisms are able to produce a number of biologically active substances, as well as can more successfully occupy ecological niches typical for pathogens, thereby displacing the pathogenic organisms [2, 3].

The aim of the work was to perform a full genomic analysis of several bacterial strains (*Bacillus* and *Pseudomonas* genera) selected with physiological and biochemical methods. It will make possible to consciously use perspective strains for further work on the development of next generation agents to protect plants and animals from diseases.

Methods: full genome sequencing with MiSeq (Illumina) and MinION (Oxford Nanopore Technologies) instruments, bioinformatic analysis of nucleotide sequences, genetic engineering of bacterial strains.

Bioinformatic analysis of genomes of *Bacillus velezensis* K9, *Bacillus pumilus* B 263D and *Pseudomonas brassicacearum* S-1 bacteria showed the absence of genes encoding pathogenicity factors and revealed a number of genetic loci supposedly responsible for antagonistic properties. With the help of random and site-directed mutagenesis of *P. brassicacearum* S-1 bacteria it was possible to study the regulation of target genes and develop strains with improved industrial-valuable properties. Further, with the help of transgenesis, labeled bacteria capable of autofluorescence were obtained. It promoted the research of survival and localization of tested strains in model biotopes.

### Секвенирование и анализ геномов бактерий, используемых для защиты растений и животных от болезней

Валентович Л.Н., Муратова А.А., Шавела Ю.В., Сиколенко М.А. Охремчук А.Э.

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**Аннотация.** Представлены основные этапы работы с перспективными штаммами для защиты растений и животных от болезней: секвенирование и анализ генома, генетическое конструирование улучшенных штаммов, проверка их выживаемости в модельных условиях.

**Ключевые слова:** секвенирование, геном, бактерии, биопрепараты

По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (FAO) за последние десятилетия ускорение роста продуктивности сельского хозяйства сдерживается деградацией природных ресурсов, сокращением биоразнообразия, и распространением болезней растений и животных, в основном из-за появления устойчивых к противомикробным препаратам патогенов [1]. В то же время ужесточаются токсикологические критерии применения химических веществ синтетического происхождения для защиты растений и животных от болезней. Поэтому на данный момент наиболее перспективным подходом является использование препаратов биологического происхождения, так как многие микроорганизмы способны продуцировать ряд биологически активных веществ, а также могут более успешно занимать экологические ниши, свойственные патогенам, тем самым вытесняя последних [2, 3].

Целью работы было осуществление полногеномного анализа ряда отобранных с помощью физиолого-биохимических методов бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*, что позволит осознанно использовать перспективные штаммы для дальнейшей работы по созданию препаратов следующего поколения для защиты растений и животных от болезней.

Методы: полногеномное секвенирование с помощью приборов МайСек (Иллюмина) и МинИОН (Оксфорд Нанопор), биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей, генно-инженерное конструирование бактериальных штаммов.

Биоинформатический анализ геномов бактерий *Bacillus velezensis* K9, *Bacillus pumilus* B-263Д и *Pseudomonas brassicacearum* S-1 позволил показать отсутствие генов, кодирующих факторы патогенности и выявить ряд генетических локусов, предположительно ответственных за проявление антагонистических свойств. С помощью случайного и направленного мутагенеза бактерий *P. brassicacearum* S-1 удалось проследить регуляцию целевых генов и получить штаммы с улучшенными промышленно ценными свойствами. В дальнейшем, с помощью трансгенеза были получены меченные бактерии, способные к автофлуоресценции, что способствовало изучению выживания и локализации тестируемых штаммов в модельных биотопах.

1. Будущее продовольствия и сельского хозяйства: тенденции и актуальные задачи [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fao.org/3/a-i6644r.pdf>. – Дата доступа: 21.11.2019.

2. Fodor, E. Ecological niche of plant pathogens / E. Fodor // Ann. For. Res. – 2011. – Vol. 54, № 1. – P. 3-21.

3. Markowiak, P. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition / P. Markowiak, K. Śliżewska // Gut Pathog. – 2018. – Vol. 10 – P. 21.





### Endophytic bacteria isolated from garden pea (*Pisum sativum* L.)

Vasileva E.N.<sup>1</sup>, Afonin A.M.<sup>1</sup>, Akhtemova G.A.<sup>1</sup>, Zhukov V.A.<sup>1</sup>, Tikhonovich I.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

E-mail: [evasilieva@arriam.ru](mailto:evasilieva@arriam.ru)

**Key message.** Endophytic bacteria were isolated from surface-sterilized aerial parts of pea. Taxonomic status of isolated strains was determined by sequencing of 16S rRNA gene. Moreover, genomes of growth-promoting endophytes were sequenced.

**Keywords:** endophytic bacteria, *Pisum sativum*, pea, symbiosis

Background. Endophytic bacteria – microorganisms living inside plants – may have a positive impact on host-plant growth and development, which can be used in the environment-friendly crop production. Due to the possibility of using this kind of microorganisms in agriculture, the interest in studying associations of endophytes and plants is constantly increasing.

Our main aim was to study the diversity of endophytic bacteria from garden pea (*Pisum sativum* L.).

Materials and methods. To conduct an experiment, three genotypes were selected: K-8274 which is highly responsive to inoculation with beneficial soil microorganisms ('effective macrosymbiont'), K-3358 – low-responsive genotype ('non-effective'), and commercial cultivar "Triumph", the 'effective' descendant of K-8274. Endophytic bacteria were isolated from surface-sterilized leaves and stems of plants at the flowering stage using the set of different growth media. Taxonomic status of isolated strains was determined using sequencing of 16S rRNA gene.

Results. Eight strains identified as *Bacillus* sp., *Rahnella* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., and *Acinetobacter* sp. have shown significant growth promoting effect on lettuce roots. Furthermore, the genomes of growth-promoting endophytic strains were sequenced. Surprisingly, the analysis revealed that the isolated endophytic cultures were not pure and contained hidden minor components. This data made us talk about the endophytic consortia, and not about single strains. Interestingly, every consortium contained *Rahnella* sp., which thus could play a role of «core», or consortium-forming, bacteria. New results require detailed study: it is planned to visualize the penetration of consortia into host-plant using fluorescent in situ hybridization (FISH) technique.

This work was supported by the grants of RSF (17-76-30016) and RFBR (19-016-00194 A), and the Government contract № 0664-2020-0022.

### Structural peculiarities of biopolymers produced by diazotrophic endobiont *Herbaspirillum* spp.

Velichko N.S.<sup>1</sup>, Bagavova A.R.<sup>2</sup>, Sigida E.N.<sup>1</sup>, Burygin G.L.<sup>1</sup>, Fedonenko Yu.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, RAS, Saratov, Russia; <sup>2</sup>N.G. Chernyshevsky Saratov State University, Saratov, Russia

E-mail: velichko\_n@ibppm.ru

**Key message.** Diazotrophic endobionts *Herbaspirillum* spp. were studied in respect to the structural peculiarities of the lipopolysaccharides (LPS), O-specific polysaccharides (OPS) structure, antigenic composition and genetics.

**Keywords:** *Herbaspirillum*, lipopolysaccharide, bacterial polysaccharide structure; O-specific polysaccharide; O antigen

*Herbaspirillum* spp. is a member of the family Oxalobacteraceae of the phylum  $\beta$ -Proteobacteria harbors mostly diazotrophic bacteria with the potential of endophytic and systemic colonization of a variety of plants. *Herbaspirillum* is capable of promoting the growth of economically relevant plants through biological nitrogen fixation and phytohormone production or protecting the host against pathogenic microorganisms. More recently, some *Herbaspirillum* species have transitioned from environment to human hosts, mostly as opportunistic bacteria. *Herbaspirillum* species are close phylogenetic and phenotypic resemblance to several  $\gamma$ -Proteobacteria species and can be misidentified by phenotypic identification methods used in the clinical laboratory. Endophyte-plant interactions initiates with the attachment to the root surface, preferentially at the intercellular junctions of root epidemics tissue. After this step, cortical intercellular infection occurs, and the bacteria invade the stele and xylem. The molecular basis of suppression the immune system of host is still unclear. Ubiquitously present in the outer membrane, LPS form a protective wall between the bacterial cell and the environment and thus could play an essential role in the process of molecular bacteria-host communication. The array of carbohydrate structures carried on LPS confer resistance to plant defense mechanisms and may serve as signals that trigger the host to allow the infection to proceed. LPS has two potential ways to act as barrier: the packed saccharide portion of the molecule that forms a hydrophilic wall, and the fatty acid portion of the lipid-A that constitutes a hydrophobic wall. Structural and genetic studies of these biopolymers can provide insight into the understanding of possible mechanisms of formation and functioning of host-microbial interactions. To prevent the LPS from being contaminated capsular polysaccharides were removed by repeated resuspending in 0.15 M NaCl. The LPS were isolated by modified phenol extraction of delipidated, dried and dispersed bacterial cells and cleaved by mild acid hydrolysis to yield the OPS, which was studied by sugar analysis along with <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, including <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H COSY, TOCSY, ROESY, and <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C HSQC and HMBC experiments. LPS fatty acids were determined as methyl esters by GLC. The LPS from various strains were quantified, analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), ELISA, and by immunoblotting. The *Herbaspirillum* produce different LPS forms, which has O-polysaccharides, and which has none. The LPS contained different carbohydrate fraction depending on the strain, including Kdo, and phosphates. The LPS's lipid A contained 3-hydroxydecanoic, 3-hydroxydodecanoic, dodecanoic, tetradecanoic, and hexadecanoic acids. The structures of the OPS from two strains of *Herbaspirillum* were established for the first time. To our knowledge, the OPS structures established are unique among known bacterial polysaccharide structures one consisting of two types repeating units, and another consist of tetrasaccharide repeating units. Both characterized by the presence of components, rarely found in Gram-negative bacteria. Analysis of the *Herbaspirillum* genome showed a set of sequentially arranged operons (presumably a cluster of genes) associated with the OPS. Genes responsible for the biosynthesis of OPS are dispersed in the genome and found to be in agreement with the OPS structure established. Amino acid sequences analysis carried out in BLAST demonstrated the specificity of this putative cluster for *Herbaspirillum* spp.

***Amaranthus retroflexus* transgenic plants for phytoremediation**

Vershinina Z.R., Khakimova L.R., Karimova L.R., Baimiev Al.Kh.

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: zilyaver@mail.ru

**Key message.** *Amaranthus retroflexus* was transformed with the *pph6* gene encoding the synthesis of a metal-binding peptide, which on average increased plant resistance to Cd and Ni by 15%, the accumulation of heavy metals in plants increased by an average of 25%.

**Keywords:** *amaranth*, phytochelatin, heavy metals, phytoremediation

Currently, the problem of soil pollution with heavy metals, which are toxic to all living organisms and cause severe diseases of animals and humans, is becoming increasingly urgent. One of the safest methods for cleaning contaminated areas is phytoremediation. The main task in soil phytoremediation is the search for hyperaccumulators plants that are capable of accumulating large concentrations of heavy metals. To increase the phytoremediation efficiency of plants, it is advisable to transform them with genes encoding the synthesis of metal-binding peptides. Amaranth is a widespread culture that has a high potential for use in phytoremediation, as it is characterized by rapid growth, resistance to adverse environmental conditions and the ability to accumulate high concentrations of heavy metals, in particular Cd and Ni. Previously, *Amaranthus retroflexus* plants (amaranth) were obtained, transforming with an artificially synthesized *pph6* gene assembled from complementary blocks 5'ATGGAATGCGAATGTGAGTGCGAGTGCGAGTGCGAATGTGGCTAA3' and 5'TTAGAGACACTCTCGCACTCGCACTCGCAT3'. After stitching these blocks, the sequence was cloned into a vector for plant transformation pCambia 1301 under the control of the 35S promoter of the cauliflower mosaic virus and later used to obtain transgenic amaranth plants. For transformation, hypocotyls and epicotyls of amaranth seedlings were used on day 14 after emergence. To regenerate shoots, 2 mg/L of BAP and 0.2 mg/L of NAA were added to the medium.

The *pph6* gene product was found to increase plant resistance to heavy metals. On average, the dry biomass of transgenic plants increased by 18% when exposed to 100  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup> and by 12% when exposed to 100  $\mu$ M Ni<sup>2+</sup> compared to control plants. The content of Cd<sup>2+</sup> in transgenic plants was 33% higher than in the control; in the case of Ni<sup>2+</sup>, this indicator increased by 17%. In general, Ni<sup>2+</sup> was more toxic to amaranth. The experimental results led to the conclusion that it is advisable to use *pph6* to increase the phytoremediation efficiency of plants.

This research was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project nos. 34-00033 mol\_a).

**Трансгенные растения *Amaranthus retroflexus* для фиторемедиации**

Вершинина З.Р., Хакимова Л.Р., Садыкова Л.Р., Баймиев Ал.Х.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

**Аннотация.** Растения амаранта были трансформированы геном *pph6*, кодирующим синтез металлсвязывающего пептида, что в среднем повышало устойчивость растений к Cd и Ni на 15 %, накопление тяжелых металлов в растениях увеличивалось в среднем на 25%.

**Ключевые слова:** амарант, фитохелатин, тяжелые металлы, фиторемедиация

В настоящее время все более актуальной становится проблема загрязнения почв тяжелыми металлами, которые токсичны для всех живых организмов и вызывают тяжелые заболевания животных и человека. Одним из наиболее безопасных методов очистки загрязненных территорий является фиторемедиация. Главной задачей в фиторемедиации почв является поиск растений-гипераккумуляторов, которые способны накапливать большие концентрации тяжелых металлов. Для повышения фиторемедиационной эффективности подобных растений целесообразна их трансформация генами, кодирующими синтез металлсвязывающих пептидов. Амарант является широко распространенной культурой, который имеет высокий потенциал для использования в фиторемедиации, так как отличается быстрым ростом, устойчивостью к неблагоприятным условиям среды и способностью накапливать высокие концентрации тяжелых металлов, в частности Cd и Ni. Ранее были получены растения *Amaranthus retroflexus*, трансформированные искусственно синтезированным геном *pph6*, собранным из комплементарных блоков 5'ATGGAATGCGAATGTGAGTGCGAGTGCGAGTGCGAATGTGGCTAA3' and 5'TTAGAGACACTCTCGCACTCGCACTCGCAT3'. После сшивки данных блоков, последовательность была клонирована в вектор для трансформации растений pCambia 1301 под регуляцией 35S промотора вируса мозаики цветной капусты и в дальнейшем использована для получения трансгенных растений амаранта. Для трансформации использовали гипокотили и эпикотили проростков амаранта на 14 день после появления всходов. Для регенерации побегов в среду добавляли 2 мг/л БАП и 0,2 мг/л НУК.

Было выявлено, что продукт гена *pph6* повышает устойчивость растений к тяжелым металлам. В среднем на 18% повышалась сухая биомасса трансгенных растений при воздействии 100 мкМ Cd<sup>2+</sup> и на 12% при воздействии 100 мкМ Ni<sup>2+</sup> по сравнению с контрольными растениями. Содержание Cd<sup>2+</sup> в трансгенных растениях было на 33% выше, чем в контрольных, в случае Ni<sup>2+</sup> этот показатель повышался на 17%. В целом Ni<sup>2+</sup> оказался более токсичным для растений амаранта. Результаты экспериментов позволили сделать вывод о целесообразности использования *pph6* для повышения фиторемедиационной эффективности растений.

Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований №18-34-00033 мол\_a.

**Lipopeptide producing endophytic bacteria of the genus *Bacillus* regulate wheat resistance to cereal aphids**

Veselova S.V., Alekseev V.Yu., Rumyantsev S.D., Burkhanova G.F., Cherepanova E.A., Kasimova A.R., Maksimov I.V.  
Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia  
E-mail: veselova75@rambler.ru

**Key message.** We have shown the direct and indirect effect of lipopeptide-producing endophytic bacteria of the genus *Bacillus* on the viability of greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. and the induction of systemic resistance in wheat plants.

**Keywords:** *Bacillus* spp., lipopeptides, *Schizaphis graminum*, insecticidal activity, induced systemic resistance

The most important condition for obtaining high yields is the integrated protection of crops from pests. In recent times, interest in biocontrol agents based on endophytic bacteria that stimulate plant growth and inhibit development of pests on plants due to various mechanisms, including the production of lipopeptides and the regulation of the pro-/antioxidant system of plants has increased. The aim of the work was to identify mechanisms of formation protective reactions of wheat plants under the influence of lipopeptide-producing endophytic bacteria of the genus *Bacillus* to greenbug aphid *S. graminum* Rond. Three strains of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* 26D, *B. subtilis* 11BM, *B. thuringiensis* B-6066 from the ARRIAM collection, and two *B. subtilis* isolates Tas-1 and Tas-8.2 isolated from the internal tissues of wheat plants were selected during the studies. The set of modern methods was used in the work: PCR, real-time PCR, high performance liquid chromatography (HPLC), spectrophotometric methods for determining redox-state of wheat plants. The method for checking insecticidal activity of bacterial strains against aphids has been adapted. The *sfp* gene encoding surfactin synthetase was found in the genomes of *B. subtilis* 26D, Tas-1, and Tas-8.2 strains, the *ituA* gene encoding iturin synthetase was detected in the *B. subtilis* 11BM genome. The *ituA* gene and *fenD* gene encoding fengicin synthetase were found in the *B. thuringiensis* B-6066 genome. The production of surfactin and iturin in *B. subtilis* 26D and 11BM strains respectively was confirmed by HPLC. All bacterial strains and their metabolites showed insecticidal activity against *S. graminum* under direct effect. With indirect (through the plant) effect on greenbug aphid bacterial strains synthesizing surfactin and fengicin, but not iturin, had the greatest effect on the viability of greenbug aphid and increased the tolerance of wheat plants, and also induced systemic resistance, which was manifested in the accumulation of ROS, increased peroxidase activity and the accumulation of genes transcripts encoding protective proteins are markers of salicylate and jasmonate signaling pathways (PR-1, PR-2, PR-3, PR-6, PR-9). This work was supported by State Project no. 0246-2018-0035 and the RFBR project no. 17-29-08014.

**Липопептид продуцирующие эндофитные бактерии рода *Bacillus* в регуляции устойчивости пшеницы к злаковой тле**

Веселова С.В., Алексеев В.Ю., Румянцев С.Д., Бурханова Г.Ф., Черепанова Е.А., Касимова А.Р., Максимов И.В.  
Институт биохимии и генетики ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

**Аннотация.** Показано прямое и опосредованное влияние липопептид-продуцирующих эндофитных бактерий рода *Bacillus* на жизнеспособность злаковой тли *Schizaphis graminum* Rond. и индукцию системной устойчивости в растениях пшеницы.

**Ключевые слова:** *Bacillus* spp., липопептиды, *Schizaphis graminum*, инсектицидная активность, системная индуцированная устойчивость

Важнейшим условием получения высоких урожаев является интегрированная защита посевов от вредителей. В последнее время возрос интерес к биологическим препаратам на основе эндофитных стимулирующих рост растений бактерий, сдерживающих развитие вредителей на растениях за счет различных механизмов, том числе за счет продукции липопептидов и регуляции работы про-/антиоксидантной системы растений. Целью работы было выявление механизмов формирования защитных реакций растений пшеницы под влиянием липопептид-продуцирующих эндофитных бактерий рода *Bacillus* к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* Rond. В ходе исследований было отобрано три штамма эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ, *B. thuringiensis* В-6066 из коллекции ВКПМ и два изолята *B. subtilis* Tas-1 и Tas-8.2, выделенные из внутренних тканей растений пшеницы. В работе использован комплекс современных методов: ОТ-ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, ВЭЖХ, спектрофотометрические методы определения концентрации активных форм кислорода (АФК) и активности про-/антиоксидантных ферментов, выделение и очистка метаболитов из среды культивирования микроорганизмов; адаптирован метод проверки инсектицидности бактериальных штаммов по отношению к тлям. В геномах штаммов *B. subtilis* 26Д, Tas-1 и Tas-8.2 обнаружен ген *sfp*, кодирующий сурфактин-синтетазу, в геноме *B. subtilis* 11ВМ выявлен ген *ituA*, кодирующий итурин-синтетазу. В геноме *B. thuringiensis* В-6066 обнаружены ген *ituA* и ген *fenD*, кодирующий фенгицин-синтетазу. Методом ВЭЖХ подтверждена продукция сурфактина и итурина штаммами *B. subtilis* 26Д и 11ВМ, соответственно. Все бактериальные штаммы и их метаболиты проявляли инсектицидную активность по отношению к *S. graminum* при прямом воздействии. При опосредованном через растение воздействии штаммы синтезирующие сурфактин и фенгицин, но не итурин оказывали наибольший эффект на жизнеспособность злаковой тли и выносливость растений пшеницы, также индуцировали системную устойчивость, что проявлялось в накоплении АФК, повышении активности пероксидаз и накоплении транскриптов генов, кодирующих защитные белки маркеры салицилат- и жасмонат-сигнальных путей (PR-1, PR-2, PR-3, PR-6, PR-9).

Работа выполнена в рамках госзадания № 0246-2018-0035 и при финансовой поддержке РФФИ № 17-29-08014.

### Characteristics of dose-response dependence between zeatin and resistance of wheat plants to the pathogenic fungus *Stagonospora nodorum*

Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Burkhanova G.F., Rummyantsev S.D.

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: veselova75@rambler.ru

**Key message.** The effect of three concentrations of *trans*-zeatin on the indices of wheat plant resistance to *S. nodorum* was studied. Two concentrations of *trans*-zeatin showed a maximum increase in the resistance of wheat plants to *S. nodorum*.

**Keywords:** *Stagonospora nodorum*, *Triticum aestivum*, *trans*-zeatin, redox-status

When plants respond to attack of pathogens, protective signaling systems are activated, and numbers of phytohormones are involved in their work. Cytokinins (CK) are the most important class of phytohormones that promote active metabolism and plant growth. However, they play a dual role in protecting plants from pathogens (as an agent of both virulence and defense). It is still unclear what this dual action of cytokinins is associated with. Since the effect of phytohormones, growth regulators, or other physiologically active substances on various processes in plants depends on the concentration, we assume that the phenomenon of the double action of CK has concentration dependence. It is known that the effect of CK is characterized by multiphase concentration curves with several extreme points. Thus, different concentrations of *trans*-zeatin may have the opposite immunomodulatory activity. The reasons for this phenomenon have not been studied. The aim of the work was to study concentration dependence of the *trans*-zeatin effect on the resistance of wheat plants to the *Stagonospora nodorum*. We used spectrophotometric methods for determining the concentration of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and peroxidase (PO) activity, as well as the Image program for calculating the damage area of wheat leaf by pathogen. The effect of three concentrations of *trans*-zeatin 0.25, 1 and 2.5 μM on the resistance indices of wheat plants of the susceptible cultivar Zhnitsa and the development of the pathogen *S. nodorum* on plant leaves were studied. The susceptible variety Zhnitsa was characterized by decrease in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content, slight increase in PO activity, and the development of extensive lesion zones, occupying more than 70% of the total leaf area. Treatment with *trans*-zeatin at concentrations of 0.25 and 2.5 μM increased the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and enhanced PO activity to a greater extent than treatment with concentration of 1 μM. However, leaf lesion zones (3.1%) were the smallest under the influence of *trans*-zeatin treatment at a concentration of 2.5 μM. Thus, we observed concentration dependence with two maxima for increasing the resistance of wheat plants to *S. nodorum*. It is possible that such concentration variability is crucial for plant survival under adverse conditions. The work was supported by RFBR no. 18-04-00978-A.

### Особенности концентрационной зависимости действия зеатина на устойчивость растений пшеницы к патогенному грибу *Stagonospora nodorum*

Веселова С.В., Нужная Т.В., Бурханова Г.Ф., Румянцев С.Д.

Институт биохимии и генетики ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

**Аннотация.** Изучено влияние трех концентраций *транс*-зеатина на показатели устойчивости растений пшеницы к *S. nodorum*. Две концентрации *транс*-зеатина показали максимум повышения устойчивости растений пшеницы к *S. nodorum*.

**Ключевые слова:** *Stagonospora nodorum*, *Triticum aestivum*, *транс*-зеатин, редокс-статус

При ответе растений на атаку патогенов активируются защитные сигнальные системы, в работу которых вовлекается целый ряд фитогормонов. Цитокинины (ЦК) – важнейший класс фитогормонов-стимуляторов, способствующих активному метаболизму и росту растений. Однако в защите растений от патогенов они играют двойную роль (как агента вирулентности и защиты). До сих пор остается неясным, с чем это двойное действие ЦК связано. Так как действие фитогормонов, регуляторов роста или других физиологически-активных веществ на различные процессы в растениях зависит от концентрации, мы предполагаем, что феномен двойного действия ЦК носит концентрационную зависимость. Известно, что воздействие ЦК характеризуется многофазными концентрационными кривыми с несколькими экстремальными точками. Таким образом, различные концентрации зеатина могут обладать противоположной иммуномодулирующей активностью. Причины этого феномена практически не изучены. Цель работы состояла в исследовании концентрационной зависимости действия *транс*-зеатина на устойчивость растений пшеницы к возбудителю септориоза *Stagonospora nodorum*. В работе использованы спектрофотометрические методы определения концентрации перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и активности пероксидазы (ПО), а также программа Image для обсчета площади поражения листа пшеницы патогеном. Было изучено влияние трех концентраций *транс*-зеатина 0.25, 1 и 2.5 мкМ на показатели устойчивости растений пшеницы восприимчивого сорта Жница и развитие патогена *S. nodorum* на листьях растения. Восприимчивый сорт Жница характеризовался снижением содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, незначительным повышением активности ПО и развитием обширных зон поражения, занимающих более 70% от общей площади листа. Обработка *транс*-зеатином в концентрациях 0.25 и 2.5 мкМ увеличивала содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и повышала активность ПО в большей степени, чем обработка в концентрации 1 мкМ. Однако зоны поражения на листьях (3.1%) были наименьшими под влиянием обработки *транс*-зеатином в концентрации 2.5 мкМ. Таким образом, мы наблюдали концентрационную зависимость с двумя максимумами повышения устойчивости растений пшеницы к *S. nodorum*. Возможно, что такая вариабельность концентраций имеет решающее значение для выживания растения в неблагоприятных условиях.

Работа выполнена в рамках РФФИ №18-04-00978-А.

## Comparative analysis of transcriptomes of different morphological structures of the basidiomycete *Lentinus edodes*

Vetchinkina E.P.<sup>1</sup>, Gorshkov V.Yu.<sup>2</sup>, Gogoleva N.E.<sup>2</sup>, Gogolev Yu.V.<sup>2</sup>, Nikitina V.E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia;

<sup>2</sup>Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FIC "KazSC RAS", Kazan, Russia

E-mail: elenavetrus@yandex.ru

**Key message.** A comparative analysis of transcriptomes at the vegetative and generative stages of the development of *Lentinus edodes* basidiomycetes was carried out. The nature of differential gene expression was described, and the activated/repressed metabolic pathways were visualized.

**Keywords:** Basidiomycetes morphogenesis, sequencing, analysis of transcriptome profiles, differential gene expression

The xylotrophic basidiomycete *L. edodes* (shiitake) is an important and popular culture in terms of biotechnological use. However, many questions remain unclear regarding the molecular-physiological aspects of the morphogenetic development of basidiomycetes. The purposes of this study are to comparatively analyze the transcriptomes of morphological structures that are sequentially formed during the ontogenesis of this type of macromycete and to characterize the differences in the physiological processes occurring at these stages. We carried out a comparative analysis of the transcriptomes of *L. edodes* nonpigmented vegetative mycelium, brown mycelial mat, primordia, and fruit bodies, describing the nature of differential gene expression (DEG). The analysis used high-throughput sequencing methods and the Illumina HiSeq 2500 platform. DEG was classified by functional category by using information from the KEGG and Gene Ontology databases (Blast2Go), as well as the BioCyc web resource. It was found that in a brown mycelial mat, 10216 genes were differentially expressed, as compared with the nonpigmented mycelium. The expression of 5166 genes was activated, and that of 5050 genes was repressed. At the generative stages of development relative to the vegetative mycelium, 5395 genes were differentially expressed in primordia. Of these, 2775 genes were activated and 2620 genes were repressed. In fruit bodies, 5567 genes were activated and 5634 were repressed (11201 DEG in total). At the stage of the mycelial mat, preceding fruiting, as in the basidiomas themselves (relative to the vegetative mycelium), there was activation of the categories associated with G-proteins (Rho protein signal transduction, heterotrimeric G-protein complex, G-protein coupled receptor activity, Rho guanylnucleotide exchange factor activity), which are important components of signaling pathways, also including MAP-kinases (MAPK signaling pathway, AMPK signaling pathway, and sphingolipid signaling pathway). The activated pathways also included metabolic pathways associated with lipid and pigment biosynthesis (fatty acid metabolism, biosynthesis of unsaturated fatty acids, melanogenesis), cysteine, lysine, tryptophan (cysteine biosynthesis, lysine biosynthesis, tryptophan biosynthesis), phenolic compounds (chorismate biosynthesis, tryptophan biosynthesis), as well as with ion transport, including metal ion transport, copper ion binding, iron ion transmembrane transporter activity, and calcium ion transmembrane transporter activity. The activated categories were those responsible for programmed cell death (phagosome, ubiquitin-mediated proteolysis, mitophagy, apoptosis), intercellular contacts and the cytoskeleton (gap junction, regulation of actin cytoskeleton, focal adhesion, carbohydrate-binding glycoproteins), and cell differentiation of walls and biogenesis of cell wall (cell wall biogenesis, chitin biosynthetic process, phenol oxidase, glucanase, chitinase and chitin synthase). The functional categories related to the storage, transmission, and realization of genetic information (DNA replication, purine metabolism, mismatch repair, nucleotide excision repair, RNA polymerase, ribosome biogenesis in eukaryotes, spliceosome, ribosome, non-homologous end-joining) at the stage of the mycelial mat and in primordia were saturated with repressed genes. However, in the fruit bodies, the genes of these categories were activated, as were the groups of genes associated with intercellular transport of substances (protein export, SNARE interactions in vesicular transport, endocytosis). The categories saturated with repressed genes at the stage of the mycelial mat and activated in the basidiomas included those related to cell division (mitotic cell cycle cytoskeleton-dependent cytokinesis, regulation of the cell cycle, mitotic cytokinesis) and to the proteasome-dependent degradation of biopolymers (proteasome accessory complex, proteome complex, proteasome regulatory particle). Thus, the analysis of the transcriptomes and the visualization of the activated/repressed metabolic pathways in different morphological structures of the fungus made it possible to identify the physiological peculiarities of *L. edodes* during ontogenesis.

### Functional specificity of NifA protein among nodule bacteria

Vladimirova A.A., Akimova E.S., Baymiev An.K., Baymiev Al.K.

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,  
Ufa, Russia

E-mail: vladimirovaw@bk.ru

**Key message.** The functional specificity of the NifA protein within the group of nodule bacteria was studied.

**Keywords:** nodule bacteria, nitrogenase, nitrogen fixation, nifA gene, recombinant bacteria

The NifA protein is a transcriptional activator of *nif*-genes, which encode the enzyme nitrogenase. This enzyme allows bacteria to convert inert atmospheric nitrogen into the ammonia form assimilable for eukaryotic organisms in the process of biological nitrogen fixation. Localization of *nif* genes on symbiotic plasmids may indicate the involvement of these genes in horizontal transfer between strains of the same species and between strains of different genera of nodule bacteria. The aim of the research was to study the functional specificity of the *nifA* gene product among nodule bacteria. The object of the study was wild rhizobia strains selected from the «symbiont» collection of the IBG UFRC RAS. To modify the strains, the vector pJN105 was used, where the target gene was various variants of the *nifA* gene belonging to the three main genera: *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*. Nitrogen-fixing activity was determined by the acetylene method using a gas chromatograph (Shimadzu GC-2014, Japan). A comparative analysis of the amino acid sequences of the NifA protein was carried out in the Megalign program (Lasergene, DNASTAR). The obtained recombinant rhizobia strains showed nitrogen-fixing activity in a free-living state. The level of this activity was in the range of 0,04-0,17  $\mu\text{gN}_2/\text{ml/h}$ , depending on the generic strain and the introduced gene. To check the effect of NifA protein on the start of the nitrogenase system, the level of production of core protein of nitrogenase NifH, was evaluated. Thus, the appearance of nitrogen-fixing activity, regardless of the genus of the introduced *nifA* gene, indicates that the NifA protein is not strictly specific. This is also confirmed by the fact that the regulatory region of the genes of the nitrogenase complex has a consensus sequence TGT-N10-ACA with which the C-terminal domain of the NifA protein binds. However, the high variability of the amino acid sequence of the N-terminal domain of a given protein, possibly, determines the generic and species specificity of regulation. This probably explains the fact that not every variant of the *nifA* gene leads to the appearance of such highly efficient nitrogen-fixing ability of *ex planta* in nodule bacteria.

The work was supported by the grant of the Russian Foundation for Basic Research №18-34-00034.

### Функциональная специфичность белка NifA среди клубеньковых бактерий

Владимирова А.А., Акимова Е.С., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

**Аннотация.** Исследована функциональная специфичность белка NifA внутри группы клубеньковых бактерий.

**Ключевые слова:** клубеньковые бактерии, нитрогеназа, азотфиксация, nifA ген, рекомбинантные бактерии

Белок NifA является транскрипционным активатором генов нитрогеназного комплекса (*nif*-гены), которые кодируют фермент – нитрогеназу. Данный фермент позволяет бактериям преобразовывать инертный атмосферный азот в усвояемую для эукариотических организмов форму аммиака в процессе биологической фиксации азота. Локализация *nif*-генов на симбиотических плаزمидов может свидетельствовать о вовлеченности данных генов в горизонтальный перенос как между штаммами одного вида, так и между штаммами разных родов клубеньковых бактерий. Целью исследования являлось изучение функциональной специфичности продукта гена *nifA* среди клубеньковых бактерий. Объектом исследования являлись дикие штаммы ризобий, отобранные из коллекции «Симбионт» ИБГ УФИЦ РАН. Для модификации штаммов использовали вектор pJN105, где целевым геном являлись различные варианты *nifA* гена, принадлежащие трем основным родам: *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*. Азотфиксирующую активность определяли ацетиленовым методом с использованием газового хроматографа (Shimadzu GC-2014, Япония). Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белка NifA проводили в программе Megalign (Lasergene, DNASTAR). У полученных рекомбинантных штаммов ризобий была отмечена азотфиксирующая активность в свободноживущем состоянии. Уровень данной активности находился в диапазоне 0,04-0,17  $\text{мкгN}_2/\text{мл/ч}$  в зависимости от родовой принадлежности штамма и привнесенного гена. Для проверки влияния белка NifA на запуск нитрогеназной системы оценивали уровень наработки корового белка нитрогеназы – NifH. Таким образом, появление азотфиксирующей активности вне зависимости от родовой принадлежности привнесенного гена *nifA* свидетельствует о том, что белок NifA не является строго специфичным. Это подтверждает и тот факт, что регуляторная область генов нитрогеназного комплекса имеет консенсусную последовательность TGT-N10-ACA с которой связывается C-концевой домен белка NifA. Однако, высокая вариабельность аминокислотной последовательности N-концевого домена данного белка, возможно, определяет родовую и видовую специфичность регуляции. Вероятно, это объясняет тот факт, что не каждый вариант гена *nifA* приводит к появлению столь высокоэффективной азотфиксирующей способности *ex planta* у клубеньковых бактерий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-34-00034 мол\_а.

### Raman spectroscopic characterization of selenite reduction by the bacterium *Azospirillum thiophilum* in the presence of an increased concentration of sulphate

Vladimirova A.A., Kamnev A.A., Tugarova A.V.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

E-mail: vladimirova-nastyusha@bk.ru

**Key message.** In the biomass of *A. thiophilum* BV-S grown in the presence of 7 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Raman spectroscopy showed a peak at 348 cm<sup>-1</sup> (Se–S bond) in addition to a peak at 250 cm<sup>-1</sup> (amorphous modification of Se).

**Keywords:** selenium, nanoparticles, *Azospirillum thiophilum*, Raman spectroscopy

Many microorganisms, including *Azospirillum* [1, 2], can reduce toxic selenium oxyanions to non-toxic Se<sup>0</sup>. Investigation of this phenomenon may be of interest for bioremediation, bio- and nanotechnology, etc. *A. thiophilum* (isolated from a sulphur-containing source) is one of the least studied *Azospirillum* species. The features of the sulfur metabolism in *A. thiophilum* are of interest for studying possible ways of S involvement in the transformation of selenite ions. Note that *A. brasilense* was shown to form nanoparticles (NPs) containing both S and Se [3]. The aim of this work was to study SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup> reduction in the presence of an increased concentration of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> by *A. thiophilum* BV-S. The investigation was carried out in two systems: aerobic bacterial growth (7 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 1 mM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 7 days, 31°C) and incubation in sterilised physiological saline solution (7 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 5 mM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 1 day, 32°C). Cell biomass and NPs were investigated using transmission electron microscopy (TEM) and Raman spectroscopy. To identify differences in sulphur metabolism, a comparative bioinformatics analysis of the *A. thiophilum* BV-S, *A. brasilense* Sp245 and Sp7 genomes was performed using the NCBI Genome web resource (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). TEM of biomass showed the presence of both cells and fairly uniform spherical electron-dense NPs, mainly localized outside the cells. Raman spectra of the biomass showed the appearance of peaks at 250 cm<sup>-1</sup>, which corresponds to Se<sup>0</sup> in its amorphous modification, and at 348 cm<sup>-1</sup>, which corresponds to the Se–S bond. On the Raman spectra of biomass (after incubation), as well as of isolated NPs (both after growth and after incubation), only one peak at 250 cm<sup>-1</sup> was observed (showing the absence of S in Se NPs). Bioinformatics analysis showed that *A. thiophilum* BV-S has a number of sulphur metabolism genes that are absent in *A. brasilense* Sp245 and Sp7. The investigation on transformations of selenite ions may be of interest both for practical applications and for clarifying biogeochemical transformations of S and Se compounds.

### Характеристика восстановления селенит-ионов бактерией *Azospirillum thiophilum* в присутствии повышенной концентрации сульфата методом спектроскопии комбинационного рассеяния

Владимирова А.А., Камнев А.А., Тугарова А.В.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

**Аннотация.** В биомассе штамма *A. thiophilum* BV-S, выращенного в присутствии 7 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, методом спектроскопии комбинационного рассеяния показано наличие пика при 348 см<sup>-1</sup> (связь Se–S) в дополнение к пику при 250 см<sup>-1</sup> (аморфная модификация Se).

**Ключевые слова:** селен, наночастицы, *Azospirillum thiophilum*, спектроскопия комбинационного рассеяния

Многие бактерии, включая азоспириллы [1, 2], способны к трансформации токсичных оксоанионов селена до нетоксичного Se<sup>0</sup>. Изучение этого феномена актуально для биоремедиации, био- и нанотехнологии и т.д. *A. thiophilum* (выделенный из серосодержащего источника) является одним из наименее изученных видов азоспирилл. Особенности серного метаболизма *A. thiophilum* интересны с точки зрения изучения возможных путей включения S в процесс трансформации селенит-ионов. Так, у *A. brasilense* отмечено образование наночастиц (НЧ), содержащих S вместе с Se [3]. Целью работы было исследование восстановления Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> в присутствии повышенной концентрации Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> штаммом *A. thiophilum* BV-S. Исследование проводили в двух системах: аэробное выращивание бактерий (7 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 1 mM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 7 сут, 31°C) и инкубация в стерильном физиологическом растворе (7 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 5 mM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 1 сут, 32°C). Биомассу клеток и НЧ исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и спектроскопии комбинационного рассеяния (СКР). Для выявления отличий в серном метаболизме проводили сравнительный биоинформатический анализ геномов *A. thiophilum* BV-S, *A. brasilense* Sp245 и Sp7 с помощью web-ресурса NCBI Genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). ПЭМ биомассы показала присутствие как клеток, так и сферических электроноплотных достаточно однородных по размеру НЧ, преимущественно локализованных вне клеток. С помощью СКР выявлено, что при выращивании на спектрах биомассы наблюдаются пики при 250 см<sup>-1</sup>, что соответствует Se<sup>0</sup> в аморфной модификации [2], и при 348 см<sup>-1</sup>, что соответствует связи Se–S [3]. На спектрах КР биомассы (после инкубации), а также выделенных НЧ (как после выращивания, так и после инкубации) наблюдается лишь один пик при 250 см<sup>-1</sup> (отсутствие S в НЧ Se). Биоинформатический анализ показал, что *A. thiophilum* BV-S имеет ряд генов серного метаболизма, отсутствующих у *A. brasilense* Sp245 и Sp7. Изучение трансформации селенит-ионов является актуальной задачей как для практического применения, так и в фундаментальном отношении – для выяснения биогеохимических превращений соединений S и Se.

1. Tugarova A.V. et al. Microb. Ecol. 68 (2014) 495-503.
2. Tugarova A.V. et al. New Biotechnol. 58 (2020) 17-24.
3. Vogel M. et al. J. Hazard. Mater. 344 (2018) 749-757.



**Phylogenetic analysis of genomic islands in closely-related species belonging to *Sinorhizobium* sp.**

Vladimirova M.E., Muntyan V.S., Saksaganskaya A.S., Simarov B.V., Roumiantseva M.L.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia

E-mail: mariiavladirova@mail.ru

**Key message.** Genomic islands of closely related *S. meliloti* and *S. medicae* species were evaluated and homologous sequences were identified; it has been suggested that horizontal gene transfer occurs at homologous tRNA sites.

**Keywords:** genomic islands, site-specific integration, nodule bacteria, *Sinorhizobium* sp.

Genomic islands (GIs) are widespread among strains of *Sinorhizobium meliloti* – nitrogen-fixing symbionts of alfalfa [Muntyan et al. 2016]. While data about GIs in the genomes of a closely related *S. medicae* species, symbionts of annual alfalfa are limited [Cherkasova et al. 2019].

Chromosomes of the reference strains *S. medicae* WSM419 and *S. meliloti* Rm1021 are contained GIs of unknown function inserted into different tRNA genes. GIs of WSM419 designated as Sme4.42S and Sme4.51K (42 and 51 kb), GIs of Rm1021 are Sme21T, Sme19T and Sme80S (19, 21 and 80 kb): hereinafter 42S, 51K, 21T, 19T and 80S. GI in genomes of 60 strains of *S. medicae* and 26 strains of *S. meliloti* (GenBank) were searched by applying Islander algorithm, GIs sequences analysis was done by Mauve and BLASTn.

In the genomes of 26 strains of *S. meliloti* the 30 GIs inserted into tRNAs in which were identified GIs: 42S, 51K, 21T, 19T, and 80S, were found. The 10 out of 30 GIs were inserted into tRNA-Trp<sup>GGT</sup> and in tRNA-Lys<sup>CTT</sup>. In the genomes of *S. medicae* the 14 GIs were detected, but the 6 GIs were inserted into tRNA-Thr<sup>CGT</sup> and the 5 GIs into tRNA-Ser<sup>TGA</sup>. The occurrence of GIs among *S. meliloti* and *S. medicae* strains were significantly distinct ( $P = 0.006$ ).

The analysis of GIs inserted into identical tRNAs in *S. meliloti* and *S. medicae* was carried out. It was found that GIs of the 3 *S. medicae* strains were inserted into tRNA-Thr<sup>CGT</sup> and these GIs had extended sequences homologous to GI of *S. meliloti* B399 (tRNA-Thr<sup>CGT</sup>; cover/identity is 61/88%). GI integrated into the same tRNA-Thr<sup>CGT</sup> of *S. medicae* USSDA1611 is homologous to GI of *S. meliloti* AK83 (tRNA-Thr<sup>CGT</sup>); GI of *S. medicae* Str8 (tRNA-Thr<sup>CGT</sup>) had also similar homologous sequences (cover/identity (%): 20/84). It was found that the sequences of the 4 GIs of *S. medicae* did not have homology with GIs of *S. meliloti*, although they were inserted into the corresponding analogous tRNAs (tRNA-Thr<sup>GGT</sup>, tRNA-Ser<sup>TGA</sup> and tRNA-Lys<sup>CTT</sup>).

Thus, common predominant sites for site-specific recombination in closely related species of *Sinorhizobium* sp. and the presence of homologous gene blocks in GIs of *S. meliloti* and *S. medicae* were identified. That is indicated at the intensive horizontal transfer of genetic information between bacteria from the same genus.

This work was supported by the RFBR 18-04-01278 a (analysis of GIs of *S. medicae*).

**Филогения геномных островов у близкородственных видов рода *Sinorhizobium* sp.**

Владимирова М.Е., Мунтян В.С., Саксаганская А.С., Симаров Б.В., Румянцева М.Л.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Показано, что геномные острова ризобий близкородственных видов *S. meliloti* и *S. medicae* имеют гомологичные последовательности; выдвинуто предположение, что горизонтальный перенос генов происходит по сайтам гомологичных тРНК.

**Ключевые слова:** геномные острова, сайт-специфическая рекомбинация, клубеньковые бактерии, *Sinorhizobium* sp.

Геномные острова (ГО) – сайт-специфически интегрированные в геном бактерий последовательности, функциональная роль которых предопределяется локализованными в них генами. Показано, что ГО распространены у *Sinorhizobium meliloti* – азотфиксирующие симбионты люцерны [Мунтян и др. 2016]. Данные о наличии ГО в геномах близкородственного вида *S. medicae*, симбионтов однолетних видов люцерн, ограничены [Cherkasova et al. 2019].

В хромосомах модельных штаммов *S. medicae* WSM419 и *S. meliloti* Rm1021 выявлены ГО неизвестной функции: Sme4.42S и Sme4.51K (42 и 51 т.п.н.) в WSM419, а Sme21T, Sme19T и Sme80S (21, 19, и 80 т.п.н.) в Rm1021 (далее 42S, 51K, 21T, 19T и 80S); указанные ГО встроены в последовательности разных генов тРНК. Проведен анализ геномов 60 штаммов *S. medicae* и 26 штаммов *S. meliloti* (GenBank) на наличие ГО с использованием алгоритма Islander и их последовательностей с применением Mauve и BLASTn.

В геномах 26 штаммов *S. meliloti* выявлено 30 ГО, встроенных в тРНК, в которых присутствуют ГО 42S, 51K, 21T, 19T и 80S. При этом по 10 ГО выявлены в тРНК-Trp<sup>GGT</sup> и в тРНК-Lys<sup>CTT</sup>. В геномах *S. medicae* выявлено 14 ГО, при этом наибольшее число ГО (6 ГО) было встроено тРНК-Trp<sup>GGT</sup>, и тРНК-Ser<sup>TGA</sup> (5 ГО). Различия по встречаемости ГО между *S. meliloti* и *S. medicae* достоверны ( $P = 0.006$ ).

Проведен анализ ГО, встроенных в одинаковые тРНК у *S. meliloti* и *S. medicae*. Установлено, что ГО 3-х штаммов *S. medicae*, встроенные в тРНК-Trp<sup>GGT</sup>, имели протяженные последовательности гомологичные таковым ГО *S. meliloti* B399 (тРНК-Trp<sup>GGT</sup>) (cover/identity (%): 61/88). ГО, встроенный в тРНК-Trp<sup>GGT</sup> *S. medicae* USSDA1611 гомологичен ГО *S. meliloti* AK83 (тРНК-Trp<sup>GGT</sup>); ГО *S. medicae* Str8 также имел гомологичные им последовательности (cover/identity (%): 20/84). Установлено, что последовательности 4-х ГО *S. medicae* не имели гомологии с ГО *S. meliloti*, хотя они были встроены в соответствующие аналогичные тРНК (тРНК-Trp<sup>GGT</sup>, тРНК-Ser<sup>TGA</sup> и тРНК-Lys<sup>CTT</sup>).

Таким образом, выявлены общие преимущественные сайты специфической рекомбинации для близкородственных видов *Sinorhizobium* sp. и наличие гомологичных блоков генов в ГО *S. meliloti* и *S. medicae*, что указывает на интенсивный обмен генетической информацией между бактериями внутри рода.

Работа выполнена при поддержке РФФИ 18-04-01278 а (анализ ГО *S. medicae*).

## Efficiency of *Pseudomonas aureofaciens* colonization in wheat rhizosphere under model condition

Vlasova A.I., Minaeva O.M.

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

E-mail: ales1995.com@mail.ru

**Key message.** The survival of *Pseudomonas aureofaciens* in the wheat rhizosphere was studied. A significant increase in the number of pseudomonads and tetracycline resistant bacteria was shown when introduced into the model system of strains.

**Keywords:** *Pseudomonas aureofaciens*, colonization, phytopathogen, rhizosphere

In modern agriculture, the use of bioformulations as an alternative to chemical pesticides is widespread. This makes it relevant to study the bacteria ability to survive in the rhizosphere and successfully compete with its natural inhabitants. Marking of strains, in particular resistance to increased doses of antibiotics, is used to evaluate the results of the colonization of bacterial strains into the agricultural plant rhizosphere under natural and laboratory conditions.

The aim of this research was to assess the introduction efficiency of *Pseudomonas aureofaciens* bacteria into the wheat rhizosphere in a model experiment.

The artificial terrestrial ecosystem was used in the experiment: sterile sand (substrate), wheat (*Triticum aestivum* L., cultivar Iren), bacteria *P. aureofaciens*, phytopathogen (*Bipolaris sorokiniana*). The parental and tetracycline resistant (0.4 g / l) bacterial strains were used in the experiment. Plants without bacterial inoculation with and without the phytopathogen were used as a control. The inoculation was carried out with liquid bacterial suspensions with a titer of  $1 \cdot 10^6$  cells/seed. The bacterial titer was analyzed by the Koch method on a general medium (total microbial number), media for genus *Pseudomonas* bacteria, and medium with tetracycline (0.4 g/l) on the 14th day after the experiment.

A statistically significant increase ( $p < 0.05$ ) in the total bacterial number when bacterial inoculation with and without phytopathogen was noted (more than 100 times in comparison with the control). Inoculation of the parental and tetracycline-resistant strains without a phytopathogen increased the number of the genus *Pseudomonas* bacteria in the substrate and on the roots of wheat over 20 times in relation to the control, and in antibiotic-resistant strains over 40 times, with a phytopathogen - 75 times and 170 times, respectively. This indicates the colonization efficiency of the studied bacteria. In addition, the possibility of using tetracycline resistance as a genetic marker of *P. aureofaciens* bacteria in the study of their properties has been experimentally shown.

## Эффективность интродукции бактерий *Pseudomonas aureofaciens* в ризосфере пшеницы в модельных условиях

Власова А.И., Минаева О.М.

Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

**Аннотация.** Проведена оценка выживаемости *Pseudomonas aureofaciens* в ризосфере пшеницы. Показано значимое увеличение численности псевдомонад и бактерий, устойчивых к тетрациклину, при интродукции в модельную систему опытных штаммов.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aureofaciens*, интродукция, фитопатоген, ризосфера

В современном сельском хозяйстве широко распространено применение биопрепаратов как альтернативы химическим пестицидам, что делает актуальным изучение способности бактерий выживать в зоне ризосферы, успешно конкурируя с ее естественными обитателями. Для оценки успешности интродукции используются маркировки штаммов, в частности устойчивость к повышенным дозам антибиотиков, которая позволяет проследить судьбу используемых для бактериализации сельскохозяйственных растений бактерий в естественных и лабораторных условиях.

Цель работы: оценка эффективности интродукции бактерий *Pseudomonas aureofaciens* в ризосферу пшеницы в модельном эксперименте.

Для проведения эксперимента была создана наземная искусственная экосистема: стерильный песок (субстрат), пшеница (*Triticum aestivum* L., сорт Ирень), бактерии *P. aureofaciens*, фитопатоген (*Bipolaris sorokiniana*). В эксперименте использовали бактерии родоначального и резистентного к тетрациклину (0,4 г/л) штаммов. Контроль – растения без инокуляции бактериями с фитопатогеном и без. Интродукцию проводили жидкими бактериальными суспензиями из расчета  $1 \cdot 10^6$  клеток/семя. Численности учитывали методом Коха на общепотребительной среде (общее микробное число), средах для бактерий рода *Pseudomonas* и среде с тетрациклином (0,4 г/л) на 14 сутки после постановки эксперимента.

Отмечено статистически значимое увеличение общей численности бактерий в вариантах с бактериальной интродукцией как с фитопатогеном, так и без него (более чем в 100 раз по сравнению с контролем). При интродукции родоначального и резистентного к тетрациклину штаммов в вариантах без фитопатогена в субстрате и на корнях пшеницы увеличивалась численность бактерий рода *Pseudomonas* свыше 20 раз по отношению к контролю, а резистентных к антибиотику – свыше 40, в вариантах с фитопатогеном – 75 раз и 170 раз соответственно, что свидетельствует об успешности интродукции изучаемых бактерий. Кроме того, экспериментально показана возможность применения резистентности к тетрациклину в качестве генетического маркера бактерий *P. aureofaciens* при изучении их свойств.

**Features of relationship of *Trichoderma* saprotrophic fungi-antagonists with the phytopathogenic micromycetes**

Voitka D.V., Yuzefovich E.K., Mikhnyuk A.V.

Plant Protection Institute, Priluki, Republic of Belarus

E-mail: d.voitka@tut.by

**Key message.** The analysis of the genus *Trichoderma* saprotrophic fungi-antagonists antagonistic interaction with the phytopathogenic micromycetes is done. The complex mechanism of the antagonistic activity is shown.

**Keywords:** *Trichoderma*, phytopathogenic micromycetes, antagonistic activity, types of antagonism

The phytopathogenic micromycetes cause plant diseases and provoke economic losses. The chemical control of phytopathogens is associated with the toxicity of pesticides for biocenoses, as well as the risk of resistance formation in pathogens. Soil saprotrophic fungi of the genus *Trichoderma* are natural antagonists of phytopathogens, and, considering their biological characteristics, cosmopolitanism, represent an effective and environmentally friendly alternative for regulating the phytopathological situation. To justify the use of antagonists in biological control, it is necessary to study their relationships with the target objects. In this regard, the objective of our researches has been to study the mechanisms of antagonistic activity of the genus *Trichoderma* fungi against phytopathogens causing the diseases of a wide crop spectrum. In the researches the genus *Trichoderma* fungi isolated from natural biocenoses of the Republic of Belarus, and selected as promising isolates for creating a microbial inoculant for soil improvement have been used. In relation to *Fusarium* spp. phytopathogenic fungi, the isolates of *Trichoderma* spp. have inhibited the growth of pathogens at the level of 41.4-69.4%. In relation to *Alternaria* genus fungi, the growth inhibition has made 70.9-82.4%. The antagonistic activity against the fungus *Rhizoctonia solani* has ranged from 49.5 to 65.5%. It is pointed out that with the genus *Fusarium* fungi the majority of *Trichoderma* spp. isolates have shown the fungistatic nutritional (unilateral) antagonism, as well as the hyperparasitic activity. Some isolates have been characterized by the presence of antibiotic antagonism, some others have got a mixed type — the fungistatic alimentary and antibiotic. In relation to *Alternaria* genus and *R. solani* genus fungi all the isolates have shown the fungistatic nutritional antagonism. The analysis of antagonistic activity of the genus *Trichoderma* fungi indicates a complex mechanism of interaction with the phytopathogenic micromycetes. The vast majority of isolates of *Trichoderma* spp. have been characterized by a mixed type of antagonism with the pronounced presence of fungistatic nutritional as well as antibiotic action.

**Особенности взаимоотношений сапротрофных грибов-антагонистов рода *Trichoderma* с фитопатогенными микромицетами**

Войтка Д.В., Юзефович Е.К., Михнюк А.В.

Институт защиты растений, Прилуки, Республика Беларусь

**Аннотация.** Проведен анализ антагонистического взаимодействия сапротрофных грибов-антагонистов р. *Trichoderma* с фитопатогенными микромицетами. Показан комплексный механизм антагонистической активности.

**Ключевые слова:** *Trichoderma*, фитопатогенные микромицеты, антагонистическая активность, типы антагонизма

Фитопатогенные микромицеты вызывают болезни растений и провоцируют экономические потери. Химический контроль фитопатогенов сопряжен с токсичностью пестицидов для биocenозов, а также риском формирования резистентности у возбудителей болезней. Почвенные сапротрофные грибы р. *Trichoderma* являются естественными антагонистами фитопатогенов, а с учетом своих биологических особенностей, космополитизма, представляют эффективную и экологически безопасную альтернативу для регулирования фитопатологической ситуации. Для обоснования использования антагонистов в биологическом контроле необходимо изучение их взаимоотношений с целевыми объектами. В связи с этим, целью наших исследований было изучение механизмов антагонистической активности грибов рода *Trichoderma* в отношении фитопатогенов, вызывающих болезни широкого спектра культур. В исследованиях использовали грибы р. *Trichoderma*, изолированные из естественных биocenозов Республики Беларусь, и отобранные в качестве перспективных изолятов для создания микробного инокулянта для оздоровления почвы. В отношении фитопатогенных грибов *Fusarium* spp. изоляты *Trichoderma* spp. ингибировали рост патогенов на уровне 41,4-69,4%. В отношении грибов р. *Alternaria* ингибирование роста составило 70,9-82,4%. Показатель антагонистической активности в отношении гриба *Rhizoctonia solani* варьировал от 49,5 до 65,5%. Отмечено, что с грибами р. *Fusarium* большинство изолятов *Trichoderma* spp. показали фунгистатический алиментарный (односторонний) антагонизм, а также гиперпаразитическую активность. Некоторые изоляты характеризовались наличием антибиотического антагонизма, части был присущ смешанный тип – фунгистатический алиментарный и антибиотический. В отношении грибов р. *Alternaria* и *R. solani* все изоляты проявили фунгистатический алиментарный антагонизм. Анализ антагонистической активности грибов р. *Trichoderma* свидетельствует о комплексном механизме взаимодействия с фитопатогенными микромицетами. Подавляющее большинство изолятов *Trichoderma* spp. характеризовалось смешанным типом антагонизма с выраженным наличием фунгистатического алиментарного, а также антибиотического действия.

### Analysis of the expression of maize genes encoding chromatin-modifying proteins

*Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Moiseeva Ye.M., Gutorova O.V., Chumakov M.I.*

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Saratov, Russia

E-mail: volokhina\_i@ibppm.ru

**Key message.** The expression of maize genes encoding chromatin-modifying proteins was studied in embryo sacs from maize parthenogenetic AT-3 line before and after pollination.

**Keywords:** *Zea mays*, parthenogenesis, DNA methylation genes, chromatin-modifying proteins

The apomictic reproduction is desirable and economically attractive for agricultural plants. The modern maize plants cannot reproduce by fertilization-independent seeds (apomixis way), although apomixis has been observed in its wild ancestor *Tripsacum* and in maize-*Tripsacum* hybrids.

The development of embryos independent of fertilization was found for the AT-3 maize line with inherited high-frequency matroclin parthenogenesis in embryo sacs with experimental delay in pollination [1]. It is believed that apomixis can occur as a result of changes in the regulation of transcription programs that control sexual reproduction in plants [1]. In particular, the Dmt102, Dmt103, Dmt105, Hdt104, Chr106, and Hon101 genes have clear qualitative expression differences between three developmental stages – sporogenesis, mature embryo sac before fertilization and early embryogenesis at 3 days after pollination (DAP) in maize and apomictic maize-*Tripsacum* hybrids [2].

We observed the parthenogenetic pro-embryos developed from unpollinated AT-3 ovules at 7–10 DAAPS [3]. The Dmt102, Dmt103, Dmt105, Hdt104, Hon101, and Chr106 genes expression during spontaneous embryo development was compared in parthenogenetic (AT-3) and ordinary (DDH-1) maize lines by qPCR. We suppose that the differences in the expression of the Chr106, Hon101 and Hdt104 could explain the development of a spontaneously developing embryo in AT-3 at 7-10 DAAPS in comparing with DDH-1 embryo sacs 3 DAP. Thus, Hon101, Chr106 and Hdt104 genes expression are differ between investigated lines and could be the reason for parthenogenetic AT-3 proembryo developing without pollination.

The reported study was funded by RFBR, project number (18-016-00155) and by the Program of the fundamental scientific research (registration no. AAAA-A17-117102740101-5).

### Изучение экспрессии генов кукурузы, кодирующих хроматин-модифицирующие белки

*Волохина И.В., Гусев Ю.С., Моисеева Е.М., Гудорова О.В., Чумаков М.И.*

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, Саратов, Россия

**Аннотация.** Изучалась экспрессия генов, кодирующих хроматин-модифицирующие белки, в зародышевых мешках у партеногенетической линии кукурузы AT-3 до и после опыления.

**Ключевые слова:** кукуруза, партеногенез, гены метилирования, хроматин-модифицирующие белки

Апомиктическое размножение является экономически привлекательным способом размножения для сельскохозяйственных растений. Современные растения кукурузы не могут размножаться путем апомиксиса, в отличие ее дикого предка *Tripsacum*, а также у гибридов кукурузы с *Tripsacum*.

У кукурузы было обнаружено независимое от оплодотворения развитие зародышей для линии AT-3 с наследуемым высокочастотным матроклинным партеногенезом в зародышевых мешках с экспериментальной задержкой опыления [1]. Считается, что апомиксис может возникнуть в результате изменения регуляции транскрипционных программ, которые контролируют половое размножение у растений [1]. В частности, гены, кодирующие хроматин-модифицирующие белки (Dmt102, Dmt103, Dmt105, Hdt104, Chr106 и Hon101), имели различия в экспрессии в зародышевых мешках до и после опыления кукурузой и апомиктического гибрида кукурузы и *Tripsacum* [2].

Как и авторы линии AT-3, мы наблюдали развитие партеногенетических проэмбрио, развившиеся из неопыленных яйцеклеток AT-3 через 7–10 дней после появления пестичных нитей (7-10ДППР) [3]. Экспрессию генов Dmt102, Dmt103, Dmt105, Hdt104, Hon101 и Chr106 при спонтанном развитии зародыша сравнивали у партеногенетической (AT-3) и обычной (ГПЛ-1) линий кукурузы методом РВ-ПЦР. В спонтанно-развивающихся зародышах у линии AT-3 (10ДППР) было зарегистрировано изменение экспрессии генов Chr106, Hon101 и Hdt104 по сравнению с ГПЛ-1 (3ДПО). Таким образом, экспрессия генов Chr106, Hon101 и Hdt104 различается между исследуемыми линиями и может быть причиной развития партеногенетических проэмбрио, развивающегося у линии AT-3 без опыления.

Работа выполнена по Программе фундаментальных научных исследований (№ гос. регистрации AAAA-A17-117102740101-5) и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-016-00155.

[1] Grimanelli D. Epigenetic regulation of reproductive development and the emergence of apomixis in angiosperms // *Curr. Op. Plant Biol.* 2012. V. 15. P. 57-62.

[2] Тырнов В.С., Еналеева Н.Х. Автономное развитие зародыша и эндосперма у кукурузы // *ДАН.* 1983. Т. 272. С. 722-725.

[3] Volokhina I., Gusev Y., Moiseeva Y., Fadeev V. Kolesova A., Gutorova O., Chumakov M. Expression of genes coding for chromatin-modifying enzymes in maize lines // *Plant Gene.* 2020 V. 22. P. 100221e.

## Screening of metal tolerant plant growth-promoting endophytic (PGPE) bacteria for the preparation of bioformulation

Voropaeva O.V., Tripti, Kumar A., Panikovskaya K.A., Maleva M.G., Borisova G.G.

Ural Federal University named after the first President of Russia B. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia

E-mail: Olga.voropaeva@urfu.ru

**Key message.** Metal tolerant plant growth-promoting bacteria capable of synthesizing IAA from tryptophan, solubilizing phosphates and converting protein nitrogen into ammonia were isolated from plants growing on contaminated soils.

**Keywords:** endophytic bacteria, metal tolerance, growth-promoting activity, bioformulation

In the Urals, as in many regions with developed industry, the problem of soil pollution by heavy metals is becoming increasingly important, which leads to a reduction in land suitable for use in the agricultural sector and a decrease in biodiversity. To restore damaged areas, it is advisable to stabilize the state of microbiota by introducing bioformulations based on environmentally friendly bacterial cultures. The aim of this study is to screen metal tolerant plant growth-promoting endophytic (PGPE) bacteria that can tolerate stressful environmental conditions, as well as to study its role in the cultivation of plant resistance to adverse factors. Heavy metal-tolerant PGPE cultures were isolated from the roots of the nickel hyperaccumulator *Odontarrhena obovata* (C.A.Mey.) Turcz., Syn. *Alyssum obovatum* (oblique beetroot) collected from the slopes of the Karabash massif located in the vicinity of the copper smelter JSC "Karabashmed" (Karabash town, Chelyabinsk region). Morphologically different strains were selected from the grown colonies, and pure cultures were grown from them for further research. Isolates were checked for their capability to withstand elevated concentrations of copper and nickel (100 and 200 mg/L, respectively) as well as ability to synthesize siderophores, indole-3-acetic acid (IAA) from *L*-tryptophan, solubilize phosphates and produce ammonia. As a result of the work, a metal tolerant PGPE strain was selected, which showed high plant growth promoting activities according to all the studied characteristics. According to the morphological, physiological and biochemical characteristics, the strain was preliminary identified to the genus *Pseudomonas*. Furthermore, the strain was identified as *P. lurida* according to the 16S rRNA gene sequencing. The above strain was used as a bioformulation to grow sunflower plant under metal enriched condition. The conducted pot experiments confirmed the growth promoting and metal tolerant efficacy of this isolated PGPE strain.

The work was supported by RFBR and DST according to the research project № 19-516-45006 and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (02.A03.21.0006).

## Скрининг металлоторантных стимулирующих рост растений эндофитных (PGPE) бактерий для создания биопрепаратов

Воропаева О.В., Трипти, Кумар А., Паниковская К.А., Малева М.Г., Борисова Г.Г.

Уральский Федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина (УрФУ), Екатеринбург, Россия

**Аннотация.** Из растений, растущих на загрязненных почвах, были выделены металлоторантные ростстимулирующие бактерии, способные синтезировать ИУК из триптофана, солибилизировать фосфаты и переводить азот протеинов в аммонийную форму.

**Ключевые слова:** эндофитные бактерии, металлоторантность, ростстимулирующая активность, биопрепарат

На Урале, как и во многих регионах с развитой промышленностью, все большую актуальность приобретает проблема загрязнения почвенного покрова тяжелыми металлами, что приводит к сокращению пригодных для использования в аграрном секторе земель и снижению биоразнообразия. Для восстановления нарушенных участков целесообразно стабилизировать состояние микробиоты путем внесения биопрепаратов на основе экологически безопасных культур бактерий. Целью настоящего исследования является скрининг металлоторантных эндофитных бактерий, стимулирующих рост растений (PGPE), способных переносить стрессовые воздействия окружающей среды, а также изучение роли этих бактерий в формировании устойчивости культурных и дикорастущих растений к неблагоприятным факторам. Выделение чистых культур металлоторантных PGPE проводили из корней гипераккумулятора никеля *Odontarrhena obovata* (C.A.Mey.) Turcz., ранее *Alyssum obovatum* (бурячок обратнойцевидный), собранного на склонах гор Карабашского массива, расположенного в зоне деятельности медеплавильного комбината АО «Карабашмедь» (г. Карабаш, Челябинская область). Из выросших колоний были отобраны морфологически разные, а затем из них были выделены чистые культуры для дальнейших исследований. Из них были отобраны бактерии, способные выдерживать повышенные концентрации меди и никеля (100 и 200 мг/л, соответственно), а также обладающие способностью синтезировать сидерофоры, индолилуксусную кислоту (ИУК) из *L*-триптофана, солибилизировать фосфаты и осуществлять минерализацию белков до ионов аммония. В результате работы был отобран штамм металлоторантных PGPE, обладающий высокой активностью по всем изученным нами характеристикам. По морфологическим и физиолого-биохимическим характеристикам данный штамм были отнесен к роду *Pseudomonas*. Генетическая идентификация штамма методом определения нуклеотидной последовательности фрагмента 16S рНК гена позволила определить его принадлежность к *P. lurida*. Проведенные в дальнейшем модельные эксперименты на подсолнечнике подтвердили ростстимулирующую и металлоторантную эффективность выделенного штамма PGPE.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и ДНТ в рамках научного проекта № 19-516-45006 и Министерства науки и высшего образования РФ (02.A03.21.0006).

## Identification of bacterial virulence factors based on an integration of experimental and *in silico* transcription factor target discovery

Vychyk P.V., Nikolaichik Y.A.

Belarusian State University, Minsk, Belarus

E-mail: p.vychik@gmail.com

**Key message.** *In silico* transcription factors binding sites analysis in *Dickeya dadantii* genome matches published experimental results and predicts new regulators for genes inducing soft-rot disease in plants.

**Keywords:** virulence factors, transcriptional factor binding sites, bioinformatical analysis, LacI family, *Dickeya dadantii*

Potential novel targets involved in bacterial virulence, for transcriptional regulators LfeR and LfgR of *D. dadantii* were predicted using the motif discovery algorithm of Sigmoid.

**Goal.** Demonstrate the effectiveness of experimental data and *in silico* methods integration in the study of transcriptional regulation and find new virulence-related targets for LacI family regulators in *D. dadantii*.

**Methods.** Transcription factor binding site inference, operon prediction and database searches were all done with version 2 of Sigmoid software (1).

The *Pectobacteriaceae* family unites many species of soft rot plant pathogens. Like in most enterobacteria, their genomes encode about 300 transcription factors (TFs). According to the published transcriptomic data, about half of the TFs are either induced or repressed in planta. Despite the obvious importance for understanding plant-pathogen interaction, few of these TFs have been studied so far in most species. However, there were several important works on transcriptional regulation in *D. dadantii*, including a systematic experimental study of the LacI family regulators (2). Therefore, we have started our systematic *in silico* screen of plant pathogen transcription factor binding sites from the best-studied TF family in *D. dadantii*.

The previously reported experimental data (2) characterised 7 TFs without any proposed function at that time: LfaR, LfbR, LfcR, LfdR, LfeR, LffR, LfgR. Plants infected by bacteria with inactivated regulator genes demonstrated a change of the virulence in *lfaR*, *lfcR*, *lfdR*, *lfeR* and *lfgR* mutants. However, laborious experiments are needed to unveil a regulator's targets outside its own locus. *In silico* inference of TF binding sites could simplify ‘wet’ experiment design and provide a hypothesis about potential virulence mechanism.

*De novo* TF binding site inference algorithm implemented in Sigmoid is based on the information about specific amino acid-DNA base contacts of TF-operator complexes (available in the PDB for many TF families) and analysis of regulatory regions of the TF encoding gene and nearby operons. Full genome scan of *D. dadantii* with hidden Markov model of LacI family DNA binding domain (PF00356) has shown the presence of 19 TFs, 15 of them could be analyzed with our procedure. Plausible motifs were successively inferred for 12 of these TFs in the positions suitable for TF autoregulation and/or control of the linked target gene. Importantly, a motif was found for every target experimentally verified in (2). The newly identified motifs have been added to the growing library of the experimentally verified motifs distributed with Sigmoid.

We next looked for motifs located outside the regulator loci and have found two TFs that could control important virulence-related genes unlinked to the regulator genes. LfgR has a high scoring binding site near pyoverdine biosynthesis operon involved in iron acquisition which is known to be very important for this pathogen. A high scoring LfeR binding site is located 61 b.p. upstream from the translation start of the largest flagellar operon *fliF-fliR* right in front of the FliA-dependent promoter. This location suggests positive control of motility by LfeR. According to (2), *lfeR* mutant has reduced virulence which may indicate the importance of such regulation.

It is known that LacI family regulators most often control one or few tightly linked transcriptional units. However, our *in silico* approach can find new putative targets for uncharacterized regulators even for this TF family. We expect this method to be more efficient for other TF families and advocate its wide use to provide testable hypotheses for further experimental research of regulatory networks controlling plant-pathogen interaction.

1. Sigmoid, a cross-platform open-source application: <https://github.com/nikolaichik/Sigmoid>

2. Analysis of the LacI family regulators of *Erwinia chrysanthemi* 3937, involvement in the bacterial phytopathogenicity / F. Van Gijsegem [et al.] // MPMI. – 2008. – Vol. 21, № 11. – P. 1471-1481.

### Species diversity of natural rhizobia populations of the Russian Far East

Yakimenko M.V., Begun S.A., Sorokina A.I.

FSBSI All-Russian Scientific Research Institute of Soybean, Blagoveshchensk, Amur region

E-mail: mariy-y@yandex.ru

**Key message.** The specificity of the soils of the Far East is the presence of aboriginal soybean nodule bacteria in them. A detailed study of the morphological and cultural, physiological and economically useful properties of these microorganisms made it possible to identify the most valuable strains of *B. japonicum*, *S. fredii*, *B. elkanii* from the Far Eastern natural populations for their preservation in the collection.

**Keywords:** soybean, legumes, rhizobia, species, strains

The Far East region as a region engaged in soybean cultivation is the only one in Russia where natural populations of soybean nodule bacteria occur universally in soils. Their formation in the natural-historical terms is associated with the spread of wild-growing (ussurian) soybean in the region, and later – with the systematic expansion of cultivated soybean crops [1]. In fact, the Far Eastern natural populations of rhizobia are a significant natural resource that allows selecting the most valuable strains by economically useful properties. Until recently, research of rhizobia in the Far East was limited to the study of *Sinorhizobium fredii* (Scholla, Elkan, 1984), *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982) species [2]. Since 1997 various legumes have been grown on the experimental plot of the laboratory for biological research of the All-Russian Scientific Research Institute of Soybean (meadow chernozem soils) in order to identify the species diversity of rhizobia, nodulating soybean. The most active and annual nodule formation was observed in soybean. Nodule formation on the roots in lupine, lablab bean and lentil did not occur for three years of observation. Other legumes (haricot bean, peas, vigna, peavine, chick-peas, beans, peanuts) had unstable nodule formation. According to the technique proposed by the All-Russian Scientific Research Institute of Agricultural Microbiology, in the modification of S.A. Begun, the strains that we assigned to the new species *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendall et al., 1992) were first isolated in a pure culture from the formed nodules on the roots of vigna (*V. radiata* and *V. unguiculata*) (2012) [1, 3]. The isolated strains turned out to be virulent on soybean varieties Garmoniya, MK 100 and Khabarovskaya 4. In total, since 2012, 92 strains of rhizobia *Bradyrhizobium elkanii* have been isolated in a pure culture from the natural populations of the Russian Far East. These strains were tested by the growth indicators on the agarized mineral-plant medium (MPM) with mannitol and lactose, control medium of MPA (meat-peptone agar), antibiotic resistance.

### Видовое разнообразие природных популяций ризобий Российского Дальнего Востока

Якименко М.В., Бегун С.А., Сорокина А.И.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сои, Благовещенск, Россия

**Аннотация:** Спецификой почв Дальнего Востока является наличие в них аборигенных клубеньковых бактерий сои. Детальное изучение морфолого-культуральных, физиологических и хозяйственно-полезных свойств этих микроорганизмов позволило выявить из дальневосточных природных популяций наиболее ценные штаммы *B. japonicum*, *S. fredii*, *B. elkanii* для сохранения их в коллекции.

**Ключевые слова:** соя, зернобобовые, ризобии, виды, штаммы.

Дальневосточный соеосеющий регион – единственный в России, где в почвах повсеместно распространены природные популяции клубеньковых бактерий сои. Формирование их в естественно-историческом плане связано с распространением в регионе дикорастущей (уссурийской) сои, а позднее – с систематическим расширением посевов культурной сои [1]. Фактически дальневосточные природные популяции ризобий – это значимый природный ресурс, позволяющий вести отбор наиболее ценных по хозяйственно-полезным свойствам штаммов. Исследования ризобий на Дальнем Востоке до недавнего времени ограничивались изучением видов *Sinorhizobium fredii* (Scholla, Elkan, 1984), *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982) [2]. С целью поиска видового разнообразия ризобий, нодулирующих сою, на опытном участке лаборатории биологических исследований Всероссийского научно-исследовательского института сои (луговые чернозёмовидные почвы) с 1997 года выращивались различные зернобобовые культуры. Наиболее активное и ежегодное образование клубеньков отмечено у сои. У люпина, лобии и чечевицы образование клубеньков на корнях не происходило на протяжении трёх лет наблюдений. У остальных зернобобовых культур (фасоль, горох, вигна, чина, нут, бобы, горох, арахис) образование клубеньков было неустойчивым. Из образовавшихся клубеньков на корнях вигны (*V. radiata* и *V. unguiculata*) (2012 г.), впервые были выделены в чистую культуру штаммы, отнесенные нами к новому виду *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendall et al., 1992), по методике предложенной ВНИИСХМ, в модификации С.А. Бегуна [1, 3]. Выделенные штаммы оказались вирулентны на сое сортов Гармония, МК 100 и Хабаровская 4. Всего за период с 2012 г. из природных популяций Российского Дальнего Востока выделено в чистую культуру 92 штамма ризобий *Bradyrhizobium elkanii*. Эти штаммы проверены по показателям роста на агаризованной среде МРС с маннитом и лактозой, контрольной среде МПА, устойчивости к антибиотикам.

1. Бегун С. А. Способы, приемы изучения и отбора эффективных штаммов клубеньковых бактерий сои. Методы аналитической селекции: методические рекомендации. – Благовещенск: ПК «Зоря», 2005. – 70с.
2. *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / пер. с англ. под ред. И. А. Тихоновича и Н. А. Проворова. – Санкт-Петербург: ООО «ИПК «Бионт», 2002. – 567 с.
3. Kuykendall L. D., Roy M. A., O'Neill J. J., Devine T. E. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum* // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1988. – Vol.38. – P. 358 – 361.

### Evaluation of the effectiveness of *in vitro* fungicides against the pathogen of rot of the core of apple fruit *Alternaria alternata* (Fries: Fries) Keissler

Yakuba G.V., Astapchuk I.L.

Federal State Budget Scientific Institution “North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Wine-making” Russia, Krasnodar  
E-mail: galyayaku@gmail.com

**Key message.** We studied the sensitivity to fungicides *in vitro* of the rot pathogen of the core of apple fruit *A. alternata*. The Luna Tranquility, SC showed an effectiveness of 95 %, the fungicides Granuflo, WDG and Chorus, WDG – 70 and 75 %, respectively.

**Keywords:** apple-tree, *Alternaria alternata*, fungicides, *in vitro*, efficiency

In the mycopathocenosis of an apple tree in Southern Russia, the fungus *Alternaria alternata* (Fries: Fries) Keissler infects flowers with the subsequent development of core rot in the fruit [1]. Since 2015, there has been an increase in the prevalence, severity of the disease and a decrease in the effectiveness of protective measures against mycosis in some areas [2]. Goal of research: to determine the effectiveness of fungicides of chemical origin against the pathogen of rot of the fruit core *A. alternata in vitro*. Sowing of the isolate of the fungus was performed on potato glucose agar (PGA) medium in triplicate. Calculation of the concentration of conidia and the amount of the drug per area of one Petri dish, as well as analysis of the effect on the suppression of culture growth (aerial mycelium) after 7 days at 25 ° C, was carried out according to the generally accepted method [3]. The following preparations were used in the work: Chorus (cyprodinil, 750 g/kg), WDG – 0.025% (concentration of fungicide); Luna Tranquility (fluopyram, 125 g/l + pyrimethanil, 375 g/l), SC – 0.12%; Granuflo (tiram, 800 g/kg), WDG - 0.30%; Score (diphenconazole, 250 g/l) served as the standard, EC - 0.035%, control - distilled water. In specie *A. alternata*, a high sensitivity to the studied fungicides *in vitro* was revealed. On the 7th day of the growth of pathogen colonies, the coating of the Petri dish with air mycelium in the variants of the tested preparations was from 5 to 30 %, in the control – 100 %. The drug Luna Tranquility, SC showed high efficacy against micromycete – 95 %, fungicides Granuflo, WDG and Chorus, WDG - slightly less effective in suppressing the growth of *A. alternata* aerial mycelium: 70 and 75 %, respectively. Fungicide Score, EC inhibited the growth of the mycelium of the fungus by 100 %. Now therefore, initial *in vitro* fungicide screening showed that the fungicides studied have a rather high efficiency of suppressing the growth of the mycelium of the pathogen of alternative rot of the fruit core. However, our studies have found that drugs do not completely reduce the number of fungal colonies, therefore, work on the evaluation of drugs *in vitro* must be continued with the study of more signs.

### Оценка эффективности фунгицидов *in vitro* против возбудителя гнили сердцевинны плодов яблони *Alternaria alternata* (Fries: Fries) Keissler

Якуба Г.В., Астапчук И.Л.

ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»

**Аннотация.** Была изучена чувствительность к фунгицидам *in vitro* возбудителя гнили сердцевинны плодов яблони *Alternaria alternata*. Препарат Луна Транквилити, КС показал эффективность 95 %, фунгициды Грануфло, ВДГ и Хорус, ВДГ – 70 и 75 % соответственно, при эффективности стандарта 100 %.

**Ключевые слова:** яблоня, *Alternaria alternata*, фунгициды, *in vitro*, эффективность

В микопатозе яблони на Юге России гриб *Alternaria alternata* (Fries: Fries) Keissler заражает цветки с последующим развитием у плодов гнили сердцевинны [1]. С 2015 г. отмечено увеличение распространенности, вредоносности заболевания и снижение на отдельных участках эффективности защитных мероприятий против микоза [2]. Цель исследования: определить эффективность фунгицидов химического происхождения против возбудителя гнили сердцевинны плодов *A. alternata in vitro*. Посев изолята гриба был произведен на среду КГА в трехкратной повторности. Расчет концентрации конидий и количества препарата на площадь одной чашки Петри, а также анализ влияния на подавление роста культуры (воздушного мицелия) спустя 7 суток при 25°C производили по общепринятой методике [3]. В работе были использованы следующие препараты: Хорус (750 г/кг ципродинила), ВДГ – 0,025 % (концентрация по препарату); Луна Транквилити (125 г/л флуопирама + 375 г/л пириметанила), КС – 0,12 %; Грануфло (800 г/кг тирама), ВДГ – 0,30 %; стандартом служил Скор (250 г/л дифеноконазола), КЭ – 0,035 %, контролем – дистиллированная вода. У вида *A. alternata* была выявлена высокая чувствительность к изученным фунгицидам *in vitro*. На 7-е сутки роста колоний патогена покрытие чашки Петри воздушным мицелием составляло в вариантах испытуемых препаратов от 5 до 30 %, в контроле – 100 %. Препарат Луна Транквилити, КС показал высокую эффективность против микромицета – 95 %, фунгициды Грануфло, ВДГ и Хорус, ВДГ – несколько меньшую эффективность в подавлении роста воздушного мицелия *A. alternata*: 70 и 75 % соответственно. Фунгицид Скор, КЭ подавлял рост мицелия гриба на 100 %.

Таким образом, первичный скрининг фунгицидов *in vitro* показал, что изученные фунгициды имеют достаточно высокую эффективность подавления роста мицелия возбудителя альтернариозной гнили сердцевинны плодов. Однако наши исследования выявили, что препараты полностью не сокращают количество колоний гриба, следовательно, работу по оценке препаратов *in vitro* необходимо продолжить с изучением большего количества признаков.

1. Якуба Г.В. Эволюция паразитических свойств *Alternaria alternata* (Fries: Fries) Keissler на яблоне в условиях Краснодарского края / Плодоводство и ягодоводство России. 2010. Т. 24. № 2. С. 380-386.
2. Якуба Г.В. Видовая структура комплекса микромицетов, возбудителей гнили сердцевинны плодов яблони Краснодарского края / Г.В. Якуба, И.Л. Астапчук, А.И. Насонов // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2019. № 60 (6). С. 148-162.
3. Методика определения биологической эффективности фунгицидов в отношении грибов рода *Fusarium* и их резистентности к химическим препаратам / В.В. Чекмарев и др.; Из-во обр. и науки РФ (и др.). – Тамбов: Принт–Сервис, 2015. – 61 с.



### ***Agrobacterium tumefaciens* - associative microsymbionts of grain crop**

Yakubovskaya A.I.<sup>1</sup>, Kameneva I.A.<sup>1</sup>, Melnichuk T.N.<sup>1</sup>, Matveeva T.V.<sup>2</sup>, Gritchin M.V.<sup>1</sup>, Abdyrashitov S.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSBSI "Research Institute of Agriculture of Crimea", Simferopol; <sup>2</sup>St Petersburg University, Saint-Petersburg, Russia

E-mail: yakubovskaya\_alla@mail.ru

**Key message.** The installed absence of Ti-plasmids in the genome structure of strains of diazotrophic bacteria *Agrobacterium tumefaciens* 32 and *A. tumefaciens* P3 was found, which characterizes the strains as non-pathogenic. Bacterization of grain seeds by associative bacterial strains stimulates root development by up to 40%.

**Keywords:** *Agrobacterium tumefaciens*, *Triticum aestivum* L., *Oryza sativa* L., associativity, rhizosphere

One of the alternative ways to increase the productivity of agricultural plants is to optimize the plant-microbial interaction. From the taxonomic diversity of bacteria that are the basis of microbial preparations, agrobacteria are widely used, which are found in almost all types of soil, rhizoplane, rhizosphere of plants and can have both positive and negative (root cancer pathogens) effects on the plant.

The purpose of the research was to find new associative strains of bacteria with economically valuable properties and study the likely mechanisms of their positive effect on plants.

Selection of strains with a high degree of associativity to a specific plant species was carried out from the apical part of the roots using a systematic methodological approach. Genetic identification was performed using 16S rDNA software, search for virulence genes, using PCR with primers to the *virF*, *virB2*, and *virD2* genes. We determined the properties of stimulation in fittest on seeds of grain crops.

From the apical part of the roots of *Oryza sativa* L. and *Triticum aestivum* L., strains *A. tumefaciens* 32 (RCAM 043226) and *A. tumefaciens* P3 (RCAM 05219) were isolated. PCR with primers to *vir* genes found the absence of target fragments in the studied strains during amplification of conservative sections of virulence genes *virD2* and *virB2*, which indicates their avirulence.

Bacterization of seeds by *A. tumefaciens* 32 and *A. tumefaciens* P3 strains contributed to an increase in the length of triticale roots by 20.0 and 18.8%, rye – by 23.0 and 40.2%, winter barley – by 8.0 and 23.1%, respectively, and winter wheat – by 22.0% in the variant with *A. tumefaciens* 32, in comparison with the control variant. Thus, *Agrobacterium tumefaciens* bacteria are associative symbionts for cereals and a promising basis for the development of microbial preparations.

The work is done in the framework of the state tasks fundamental study № 0834-2019-0005 and supported by a grant RFBR A18-016-00197.

### ***Agrobacterium tumefaciens* - ассоциативные микросимбионты зерновых культур**

Якубовская А.И.<sup>1</sup>, Каменева И.А.<sup>1</sup>, Мельничук Т.Н.<sup>1</sup>, Матвеева Т.В.<sup>2</sup>, Гритчин М.В.<sup>1</sup>, Абдурашитов С.Ф.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», Симферополь; <sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Установлено отсутствие Ti-плазмид в структуре геномов штаммов азототрофных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* 32 и *A. tumefaciens* P3, что характеризует штаммы как непатогенные. Бактеризация семян зерновых культур ассоциативными штаммами бактерий стимулирует развитие корней до 40%.

**Ключевые слова:** *Agrobacterium tumefaciens*, *Triticum aestivum* L., *Oryza sativa* L., ассоциативность, ризосфера

Одним из альтернативных путей повышения продуктивности сельскохозяйственных растений является оптимизация растительно-микробного взаимодействия. Из таксономического многообразия бактерий, выступающих основой микробных препаратов, широкое применение находят агробактерии, которые встречаются практически во всех типах почв, ризоплане, ризосфере растений и могут оказывать как положительное, так и отрицательное (возбудители корневого рака) воздействие на растение.

Цель исследований заключалась в поиске новых ассоциативных штаммов бактерий с хозяйственно-ценными свойствами и изучение вероятных механизмов их положительного действия на растения.

Выделение штаммов с высокой степенью ассоциативности к конкретному виду растений осуществлялось из апикальной части корней с использованием системного методического подхода. Генетическую идентификацию проводили по 16S рДНК, поиск генов вирулентности, используя ПЦР с праймерами к генам *virF*, *virB2*, *virD2*. Стимулирующие свойства определяли в фитотестах на семенах зерновых культур.

Из апикальной части корней *Oryza sativa* L. и *Triticum aestivum* L. выделены штаммы *A. tumefaciens* 32 (RCAM 043226) и *A. tumefaciens* P3 (RCAM 05219). ПЦР с праймерами к *vir* генам установил отсутствие целевых фрагментов у исследуемых штаммов при амплификации консервативных участков генов вирулентности *virD2*, и *virB2*, что свидетельствует об их авирулентности.

Бактеризация семян штаммами *A. tumefaciens* 32 и *A. tumefaciens* P3 способствовала увеличению длины корней тритикале на 20,0 и 18,8%, ржи – на 23,0 и 40,2%, озимого ячменя – на 8,0 и 23,1% соответственно, озимой пшеницы – на 22,0 % в варианте с *A. tumefaciens* 32, в сравнении с контрольным вариантом. Таким образом, бактерии *Agrobacterium tumefaciens* являются ассоциативными симбионтами для зерновых культур и перспективной основой для разработки микробных препаратов.

Работа выполнена в рамках государственного задания фундаментальных исследований № 0834-2019-0005 и при поддержке гранта РФФИ A18-016-00197.

**Biofilms of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* and their resistance to abiotic stresses**

Yevstigneyeva S.S., Fedonenko Yu.P., Shelud'ko A.V.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Saratov, Russia

E-mail: Stels20295@yandex.ru

**Key message.** The biofilms of the bacteria *A. brasilense* and *A. lipoferum* are resistant to salt (over 400 mM NaCl in the medium) and temperature (up to 48° C) stresses. The nature of resistance to these stressors is determined by the type of biofilm.

**Keywords:** bacteria of the genus *Azospirillum*, biofilms, abiotic stress

The biofilm formation of rhizobacteria *Azospirillum* on the root surface is a key step in the colonization of plants and the establishment with them of mutually beneficial relationships. Cells in microbial communities not only populate plant roots more efficiently, but are also more resistant to various environmental factors. The aim of the work was to estimate the stability of the *Azospirillum* biofilms formed on various surfaces under the influence of salt and temperature stresses. Strains *A. brasilense* Sp7, Sp245, and *A. lipoferum* Sp59b were cultivated under standard conditions (selective synthetic medium, 2 mM NaCl, 30°C) and under salt (selective synthetic medium, 250-500 mM NaCl, 30°C) and temperature (selective synthetic medium, 2 mM NaCl, 40-50°C) stresses for 5 days without shaking at the air-liquid and liquid-solid hydrophilic / hydrophobic surface interfaces. The thickness of the biofilms was determined using light phase contrast microscopy [1]. To evaluate the relative amount of biofilm biomass, bacteria were stained by crystal violet dye [2]. It was shown that strains Sp7 and Sp59b are more resistant to salt stress within biofilms in the air-liquid phase separation in comparison to other biofilm types and withstand concentrations above 400 mM NaCl in the medium. In the case of temperature stress, the highest resistance of these strains (48°C) was revealed for biofilm communities in the liquid-solid hydrophilic surface. Endophytic bacteria *A. brasilense* Sp245 in biofilms showed similar results under both salt and temperature stresses: pronounced resistance to 350 mM NaCl in the medium and 46°C was observed for biofilms formed at the air-liquid interface. It is likely that differences in the strategy of colonization of the plant roots determine the dominant type of *Azospirillum* biofilm formation, which allows it to resist the damaging environmental factors with maximum productivity and to increase competitiveness in the formation of plant-microbial associations.

**Биопленки бактерий *Azospirillum brasilense* и *Azospirillum lipoferum* и их устойчивость к абиотическим стрессам**

Евстигнеева С.С., Федоненко Ю.П., Шелудько А.В.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

**Аннотация.** Биопленки бактерии *A. brasilense* и *A. lipoferum* являются устойчивыми к солевому (свыше 400 mM NaCl в среде) и температурному (до 48°C) стрессам. Характер резистентности к данным стрессорам определяется типом формируемой биопленки.

**Ключевые слова:** бактерии рода *Azospirillum*, биопленки, абиотический стресс

Формирование биопленок ризобактерий р. *Azospirillum* на поверхности корней является ключевым этапом колонизации растений и образования с ними взаимовыгодных ассоциаций. Клетки в составе микробных сообществ не только эффективнее заселяют корни растений, но и становятся более устойчивыми к различным факторам окружающей среды. Цель работы состояла в оценке устойчивости биопленок бактерий *Azospirillum*, сформированных на различных поверхностях, под воздействием солевого и температурного стрессов. Штаммы *A. brasilense* Sp7, Sp245 и *A. lipoferum* Sp59b культивировали без перемешивания в течение 5 суток для получения биопленок на поверхности раздела фаз «воздух-жидкость» и «жидкость-твердая гидрофильная/гидрофобная поверхность» в стандартных условиях (селективная синтетическая среда, 2 mM NaCl, 30°C) и при солевом (селективная синтетическая среда, 250-500 mM NaCl, 30°C) и температурном (селективная синтетическая среда, 2 mM NaCl, 40-50°C) стрессах. Толщину биопленок устанавливали с помощью световой фазово-контрастной микроскопии [1]. Для оценки относительного количества биомассы в биопленках бактерии окрашивали красителем кристаллическим фиолетовым [2]. Показано, что штаммы Sp7 и Sp59b являются более устойчивыми к солевому стрессу в составе биопленок на разделе фаз «воздух-жидкость» по сравнению с другими типами биопленок и выдерживают концентрации свыше 400 mM NaCl в среде. В случае температурного стресса наибольшая резистентность данных штаммов (48°C) была выявлена для биопленочных сообществ на разделе фаз «жидкость-твердая гидрофильная поверхность». Эндофитные бактерии *A. brasilense* Sp245 в составе биопленок проявляли сходные результаты как при солевом, так и при температурном стрессах: выраженная устойчивость по отношению к 350 mM NaCl в среде и 46°C наблюдалась для биопленок, сформированных на границе «воздух-жидкость». Вероятно, различия в стратегии колонизации корней растений определяют доминирующий тип биопленкообразования у азоспирилл, который позволяет максимально продуктивно противостоять повреждающим факторам среды и, в тоже время, увеличивать конкурентоспособность при формировании растительно-микробных ассоциаций.

1. Шелудько с соавт. (2015). *Микробиология*. 84 (2): 175–183.
2. O'Toole and Kolter. (1998). *Mol. Microbiol.* 28 (3): 449–461.

### Sewage and natural water treatment with higher plants

Yukhnevich G.G., Belova E.A.

Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus

Email: guhnev@grsu.by

**Key message.** The application of *Eichhornia azurea* and *Eichhornia crassipes* for the treatment of organomineral wastewater of small production facilities in model experiments and the waters of surface water bodies saturated with nutrients was studied.

**Keywords:** biological wastewater treatment, phytoremediation of water bodies, eichornia

Natural processes associated with the life of aquatic higher plants, ensure the formation of water quality in natural reservoirs and can be used for biological wastewater treatment.

The aim of the work is to assess the effectiveness of wastewater and natural water treatment by various types of eichornia in Belarus.

The treatment of organomineral wastewater of small production facilities using *Eichhornia azurea* and *Eichhornia crassipes* was studied in model experiments. The study of the possibility of purifying natural waters with water hyacinth was carried out at the Yubileynoye reservoir (Grodno), in which plants were planted in special foam pontoons.

It was established that during the cultivation of eichornia in the wastewater generated during the cultivation of fish fry, the content of dissolved substances, various nitrogen-containing compounds and microorganisms decreases. Moreover, *E. crassipes* purifies wastewater most effectively, which allows it to be recommended for the organomineral sewage treatment of effluents.

In the free water area of natural reservoirs near pontoons with *E. crassipes*, chemical and microbiological pollution of water is also reduced. However, the purification of surface waters by artificially planted eichornia is lower compared to the pole-breeze *Agrostis stolonifera* and common reed *Phragmites communis*, constantly growing in the coastal zone. In addition, when using water hyacinth for phytoremediation, it is necessary to take into account the multifaceted processes in the reservoir and to control the impact of the invasive species at different trophic levels.

### Очистка сточных и природных вод высшими растениями

Юхневич Г.Г., Белова Е.А.

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

**Аннотация.** Изучено применение *Eichhornia azurea* и *Eichhornia crassipes* для очистки органоминеральных сточных вод малых производственных объектов в модельных опытах и вод поверхностных водоемов, насыщенных биогенными элементами.

**Ключевые слова:** биологическая очистка сточных вод, фиторемедиация водоемов, эйхорния.

Естественные процессы, связанные с жизнедеятельностью водных высших растений, обеспечивают формирование качества вод природных водоемах и могут применяться для биологической очистки сточных вод. Морфологические и физиологические особенности водного гиацинта определяют его широкое применение для очистки вод от разных неорганических и органических загрязнителей в южных регионах.

Целью работы является оценка эффективности очистки сточных и природных вод различными видами эйхорнии в условиях Беларуси.

Для очистки органоминеральных сточных вод малых производственных объектов использовали *Eichhornia azurea* и *Eichhornia crassipes* в модельных опытах. Изучение очистки природных вод водным гиацинтом проводили на водохранилище Юбилейном (г. Гродно), где были высажены растения в специальные пенопластовые понтоны.

Установлено, что при культивировании эйхорний в сточных водах, образуемых при выращивании мальков рыбы, снижается содержание растворенных веществ, различных азотсодержащих соединений и микроорганизмов. Причем наиболее эффективно сточную воду очищает *E. crassipes*, что позволяет ее рекомендовать для удаления этих загрязнений из стоков.

Использованием *E. crassipes* для очистки вод поверхностных водоемов показало, что в свободной акватории вблизи понтонов с растениями также снижается химическое и микробиологическое загрязнение воды. Однако очистка поверхностных вод искусственно высаженной эйхорнией ниже по сравнению с постоянно растущими в прибрежной зоне полевицей побегообразующей *Agrostis stolonifera* и тростником обыкновенным *Phragmites communis*. Кроме того, при применении водного гиацинта для фиторемедиации необходимо учитывать протекающие многоплановые процессы в водоемах и контролировать воздействие инвазивного вида на разных трофических уровнях.

**Effective arbuscular mycorrhiza development between *Medicago lupulina* and *Rhizophagus irregularis* under conditions of different phosphorus levels in the substrate**Yurkov A.P.<sup>1</sup>, Kryukov A.A.<sup>1</sup>, Gorbunova A.O.<sup>1,2</sup>, Mikhaylova Yu.V.<sup>3</sup>, Dobryakova K.S.<sup>3</sup>, Afonin A.M.<sup>1</sup>, Kurbaniyazov Sh.K.<sup>2</sup>, Rodionov A.V.<sup>3</sup>, Shishova M.F.<sup>2</sup><sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia; <sup>3</sup>Komarov Botanical Institute, Saint-Petersburg, Russia  
E-mail: yurkovandrey@yandex.ru

**Key message.** The expressions of phosphate transport and carbohydrate metabolism genes in *Medicago lupulina* with and without *Rhizophagus irregularis* inoculation were evaluated. Differences in their transcript levels were found under conditions of different phosphorus levels in substrate.

**Keywords:** arbuscular mycorrhiza, phosphate transport, carbohydrate metabolism, genetic model, *Medicago lupulina*, *Rhizophagus irregularis*

Detection of the mechanisms controlling the formation and development of efficient arbuscular mycorrhiza (AM) is an urgent task for symbiogenetics. The aim of the present study was to evaluate the expression of 10 genes of carbohydrate metabolism and phosphate transport in highly mycotrophic MLS-1 *M. lupulina* line with and without *R. irregularis* AM fungus inoculation at 6 key stages of host plant development. *M. lupulina* genome is not yet assembled, but preliminary results of the transcriptome analysis by MACE were successfully used to identify in *M. lupulina* the *M. truncatula* homologues of genes of interest. Several pairs of primers were selected for each gene, and effective ones were applied to estimate relative expression using the generally accepted  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. A reference gene was selected: *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), *UBI* (ubiquitin), *EF1 $\alpha$*  (elongation factor 1-alfa) genes showed less stable expression in comparison with *Actin* ( $\beta$ -actin) during *M. lupulina* development, so  $\beta$ -actin was used to normalize the expression of genes of interest. The analysis showed specific expression of *MIATP1* (H<sup>+</sup>-ATPase 1) and *MIPT4* (phosphate transporter) genes in *M. lupulina* root cells with AM fungus under conditions of low and medium phosphorus (P) levels in the substrate. *MISUS2* (sucrose synthase 2) gene was characterized by significantly ( $P < 0.05$ ) higher expression in AM plants at the key stages of *M. lupulina* development (shooting stage, beginning of lateral branching and lateral branching) under conditions medium P level. *MISUS2* had lower expression under conditions of low P level. It is possible that *MISUS2* has a special role in the development of effective AM under conditions of medium phosphorus levels in the substrate. The research was supported by RFBR (18-016-00220, and partly 19-29-05275, 20-016-00245). The research was performed using equipment of the Core Center "Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology" in ARRIAM.

**Формирование эффективной арбускулярной микоризы *Medicago lupulina* с *Rhizophagus irregularis* при различных уровнях фосфора в субстрате**Юрков А.П.<sup>1</sup>, Крюков А.А.<sup>1</sup>, Горбунова А.О.<sup>1,2</sup>, Михайлова Ю.В.<sup>3</sup>, Добрякова К.С.<sup>3</sup>, Афонин А.М.<sup>1</sup>, Курбаниязов Ш.К.<sup>2</sup>, Родионов А.В.<sup>3</sup>, Шишова М.Ф.<sup>2</sup><sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; <sup>3</sup>Ботанический институт им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Проведена оценка экспрессии генов фосфатного транспорта и углеводного метаболизма у *Medicago lupulina* при инокуляции и без инокуляции *Rhizophagus irregularis*. Выявлены различия в их работе при разных уровнях фосфора в субстрате.

**Ключевые слова:** арбускулярная микориза, транспорт фосфата, углеводный метаболизм, генетическая модель, *Medicago lupulina*, *Rhizophagus irregularis*

Выявление механизмов, контролирующих формирование и развитие эффективной арбускулярной микоризы (АМ), является актуальной задачей симбиогенетики. Целью работы была оценка экспрессии 10 генов углеводного метаболизма и фосфатного транспорта у растений сильно микотрофной линии MIS-1 *M. lupulina* при инокуляции и без инокуляции АМ-грибом *R. irregularis* в 6 ключевых фаз развития растения-хозяина. Геном *M. lupulina* еще не собран, но для работы были успешно использованы предварительные результаты транскриптомного анализа с помощью MACE, что позволило выявить у *M. lupulina* гены интереса гомологичные генам *M. truncatula*. Для каждого гена были подобраны несколько пар праймеров, из которых оставлены эффективные для оценки относительной экспрессии общепринятым методом  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Проведен подбор референсного гена: гены *GAPDH* (глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназа), *UBI* (убиквитин), *EF1 $\alpha$*  (фактор элонгации 1 $\alpha$ ) показали менее устойчивую экспрессию в сравнении с *Actin* ( $\beta$ -актин) в течение развития *M. lupulina*, поэтому для нормализации экспрессии генов интереса в работе использовали  $\beta$ -актин. Анализ показал специфическую экспрессию генов *MIATP1* (H<sup>+</sup>-зависимой АТФазы 1) и *MIPT4* (транспортера фосфата) в клетках корней *M. lupulina* с АМ-грибом в условиях низкого и среднего уровня фосфора (P) в субстрате. Ген *MISUS2* (сахарозосинтазы 2) в условиях среднего P характеризовался существенно ( $P < 0.05$ ) более высокой экспрессией в растениях с АМ в ключевые фазы развития *M. lupulina*: стеблевание, начало бокового ветвления и боковое ветвление. В условиях низкого уровня P ген *MISUS2* обладал более низкой экспрессией. Возможно, *MISUS2* играет особую роль в развитии эффективной АМ в условиях среднего уровня фосфора в субстрате. Работа была поддержана РФФИ (18-016-00220, и частично 19-29-05275 и 20-016-00245). Часть работы выполнена на оборудовании ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

**The role of transcription factor genes in the tolerance of common wheat to abiotic stress**

Zaikina E.A., Galimova A.A., Kuluev B.R.

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,  
Ufa, RussiaE-mail: [evishева@yandex.ru](mailto:evishева@yandex.ru)

**Key message.** The expression profile of transcription factor genes was studied in varieties of common wheat in the pre-Ural steppe zone in response to drought and hypothermia. Increased transcriptional activity under stress is indicated for the *TabZIP1*, *TabZIP60*, *TaDREB1*, and *TaNAC 69* genes.

**Keywords:** *Triticum aestivum*, drought, hypothermia, stress tolerance, RT-PCR

Drought and hypothermia are major environmental factors affecting crop productivity and quality. The most important regulators of stress reactions are transcription factors (TFs), which control the transcription of genes encoding protective proteins. The aim of our study was to analyze the level of gene expression of transcription factors NAC, DREB and bZIP in response to drought and hypothermia. Plants underwent drought - 7 and 12 days and hypothermia at + 5 ° C for 20 hours, and 0°C – 4 hours. RNA samples from young wheat leaves were isolated using trizol reagent; semi-quantitative RT-PCR was performed to determine the expression level. Under the influence of stress factors, an increase in the transcriptional activity of the *TaDREB1* gene was detected, which remained at a high level throughout the experiment. With a drought of 7 days, the highest activity was observed in Bashkirskaya 28 variety, and with a drought of 12 days in samples L43466 and Tulaykovskaya 108. Of all the genes studied, the *TabZIP1* gene reacted most strongly to drought. The highest transcriptional activity in a drought of 7 days was observed in the variety sample L434366, and in a 12-day drought in Ecada 113. Under the action of hypothermia, high transcriptional activity of the *TabZIP60* gene was observed. Line L43466 showed the highest percent activity, and kept it at a high level throughout the experiment. In the remaining studied samples, an increase in transcriptional activity was observed. In the study of the transcriptional activity of the *TaNAC69* gene, the line L43466 is noteworthy; already on the 7th day, the transcriptional activity under stress increased and remained at a high level throughout the entire experiment. On day 12, the highest transcriptional activity was observed in the varieties: Omskaya 36, Ekada 113, Bashkirskaya 28, Omskaya 35. According to the results of our studies, the *TaNAC69* and *TaDREB1* genes can potentially serve as DNA markers of drought and cold tolerance. The *TabZIP1* and *TabZIP60* genes can be drought tolerance DNA markers for common wheat varieties and lines. The most promising of the common wheat cultivars studied by the nature of the expression profile of all studied TFs are: L43466 and Bashkirskaya 28.

**Роль генов транскрипционных факторов в устойчивости мягкой пшеницы к абиотическим стрессам**

Заикина Е.А., Галимова А.А., Кулуев Б.Р.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

**Аннотация.** Исследован профиль экспрессии генов транскрипционных факторов у сортообразцов мягкой пшеницы Предуральской степной зоны при действии засухи и гипотермии. Повышение транскрипционной активности при стрессе показано для генов *TabZIP 1*, *TabZIP 60*, *TaDREB 1* и *TaNAC 69*.

**Ключевые слова.** *Triticum aestivum*, засуха, гипотермия, стрессоустойчивость, ОТ-ПЦР

Засуха и гипотермия являются основными экологическими факторами, влияющими на продуктивность и качество сельскохозяйственных культур. Важнейшими регуляторами стрессовых реакций являются транскрипционные факторы (ТФ), которые контролируют транскрипцию генов, кодирующих защитные белки. Целью нашего исследования был анализ уровня экспрессии генов транскрипционных факторов NAC, DREB и bZIP при действии засухи и гипотермии. Растения подверглись засухе – 7 и 12 суток и гипотермии при +5°C 20 часов, а также 0°C - 4 часа. Образцы РНК из молодых листьев пшеницы были выделены при помощи тризола, для определения уровня экспрессии проводили полуколичественную ОТ-ПЦР. При действии стрессовых факторов было выявлено увеличение транскрипционной активности гена *TaDREB1*, которое сохранялось на высоком уровне в течение всего эксперимента. При засухе 7 суток наибольшая активность наблюдалась у образца Башкирская 28, а при засухе 12 суток у образцов Л 43466 и Тулайковская 108. Из всех изученных генов наиболее сильно на действие засухи реагировал ген *TabZIP1*. Наибольшая транскрипционная активность при засухе 7 суток наблюдалась у сортообразца Л 43466, а при 12 суточной засухе у Экада 113. При действии гипотермии наблюдалась высокая транскрипционная активность гена *TabZIP60*. Образец Л43466 показывал самые высокие проценты по активности, и сохранял её на высоком уровне в течение всего эксперимента. В исследовании транскрипционной активности гена *TaNAC69* на себя обращает внимание линия Л43466, уже на 7 сутки транскрипционная активность при стрессе возрастала и сохранялась на высоком уровне в течение всего опыта. На 12 сутки наибольшая транскрипционная активность наблюдалась в опытных образцах: Омская 36, Экада 113, Башкирская 28, Омская 35. По результатам наших исследований гены *TaNAC69* и *TaDREB1* потенциально могут служить в качестве ДНК-маркеров засухоустойчивости и холодоустойчивости. Гены *TabZIP1* и *TabZIP60* могут являться ДНК-маркерами засухоустойчивости для сортов и линий мягкой пшеницы. Наиболее перспективными из исследованных нами сортообразцов мягкой пшеницы по характеру изменений профиля экспрессии всех исследованных ТФ являются: Л43466 и Башкирская 28.

### The components selection for the bioinspired microalgae-cyanobacterial communities

Zaitsev P.A., Ustimenko A.A., Kublanovskaya A.A., Vasilieva S.G., Baulina O.I., Solovchenko A.E.

M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia

E-mail: zaitsev@mail.bio.msu.ru

**Key message.** A range of microalgal cultures was tested to perform phosphorus luxury uptake and form the artificial microbial communities – the bioflocules of phosphorus accumulators.

**Keywords:** microalgae, cyanobacteria, phosphorus, luxury uptake, microbial communities

Phosphorus is a key biogenic element for the maintenance of biochemical processes, information handling and energy storage, and its availability usually is a limiting factor for the growth of agricultural crops. The efficient alternative to the traditional chemical fertilizers is the one based on the biomass of the microphototrophic organisms that are capable of phosphorus uptake from wastewaters.

The aim of this research is to estimate the potential of the microalgae cultures, obtained from phosphorus-polluted habitats, for the purpose of making the artificial microbial communities – phosphorus accumulators. The eukaryotic algal monocultures of *Micractinium*, *Chlorococum* and *Scenedesmus* genera, as well as cyanobacterial genus *Synechococcus* were used in this work. The ability of cultures for phosphorus luxury uptake was tested in the presence of different concentrations of inorganic phosphate in the medium. To characterize the uptake, the residual amount of phosphate was measured by spectrophotometry and chromatography methods. To check the possibility of microalgae and cyanobacteria to grow together their photosynthetic activity was measured by PAM fluorimetry. The obtained joint cultures were analyzed using optical fluorescent and scanning electron microscopy.

The results showed that cultures of *Micractinium* and *Chlorococum* are tolerant to the high amount of phosphorus in the medium. In addition, they were observed to perform the luxury uptake of phosphorus with the formation of intracellular polyphosphate granules. It was shown that microalgae-cyanobacterial couple of *Micractinium-Synechococcus* was sustainable for joint culturing, as the photosynthetic activity of both species was preserved, and both cultures formed bioflocules as the result of growing together.

Financial support of Russian Ministry of Science and Higher Education (project RFMEFI61620X0125/05.616.21.0125) is greatly appreciated.

### Селекция компонентов биовдохновленных водорослево-цианобактериальных сообществ

Зайцев П.А., Устименко А.А., Кублановская А.А., Васильева С.Г., Баулина О.И., Соловченко А.Е.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

**Аннотация:** Получена оценка потенциала ряда культур микроводорослей в отношении избыточного поглощению фосфора и создания искусственных микробных сообществ – аккумуляторов фосфора, генерирующих биофлуккулы.

**Ключевые слова:** микроводоросли, цианобактерии, фосфор, избыточное поглощение, сообщества

Фосфор — один из ключевых биогенных элементов для осуществления биохимических реакций, хранения информации и запасаания энергии, а его доступность часто лимитирует продуктивность культурных растений. Удобрения на основе биомассы фототрофных микроорганизмов, способных поглощать фосфор из сточных вод, — перспективная альтернатива традиционных химических удобрений для обеспечения сельскохозяйственных культур биодоступным фосфором.

Целью работы явилась оценка потенциала культур микроводорослей, выделенных из местообитаний, эвтрофицированных по фосфору, для создания искусственных микробных сообществ – аккумуляторов фосфора. В работе использовались альгологические монокультуры представителей родов *Micractinium*, *Chlorococum* и *Scenedesmus*, а также представители цианобактерий из рода *Synechococcus*. Способность культур к избыточному поглощению фосфора проверяли путем культивирования в присутствии различных концентраций неорганического фосфата в среде. Поглощение фосфатов оценивали по их остаточному содержанию в среде спектрофотометрическим и хроматографическим методами. Возможность совместного культивирования микроводорослей и цианобактерий оценивали по отсутствию угнетения фотосинтетической активности методом РАМ-флуориметрии. Полученные сокультуры изучали методами оптической флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии.

Показано, что для культур микроводорослей *Micractinium* и *Chlorococum* характерна толерантность к высокому содержанию неорганического фосфата в среде. Кроме того, для них был показан эффект избыточного поглощения фосфора с образованием полифосфатных гранул внутри клетки. Для пары «микроводоросль-цианобактерия» *Micractinium-Synechococcus* была показана устойчивость к совместному культивированию, что определялось в сохранении фотосинтетической активности обоих компонентов. Благоприятность также в образовании устойчивых структур – биофлуккул.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (проект RFMEFI61620X0125/05.616.21.0125).

**Use of the dialle analysis method in the study of the combination ability of insukht-lines of corn**

Zaytsev S.A.

Russian Research Institute for Sorghum and Maize "Rossorgo", Saratov, Russia

E-mail: zea\_mays@mail.ru

**Key message.** The results of the application of the diallelic analysis parameter are presented. The effects of GCA and dispersion of SCA were revealed. The components of genetic dispersion and the relative contribution of genes to the inheritance are reflected in the sign "grain yield"

**Keywords:** corn, yield, combining ability, genetic dispersion, effect

Evaluation of combinational ability allows you to select the source material and determine the possibility of using lines and hybrids. Goal. Detection of GCA and SCA of self-pollinated maize lines, as well as components of genetic dispersion, using the diallelic analysis method.

In the experiment, lines and simple hybrids (120 pcs.), Obtained by the diallelic scheme (method 2), were studied. The data were processed by analysis of variance, GCA and SCA – Griffing analysis, the components of the genetic dispersion were determined according to Hayman B.J.

The ranking by grain yield revealed a certain stability during the years of research of the CL 7, RSK3, Ch46, KS25 lines, and by the average group indicators showed relative stability in hybrids including the MK 11, RSK 7, RSK 3 lines in the pedigree maize, conducted by the diallelic scheme, indicate a low value of the effects of GCA on the basis of "grain yield" in the lines CL-7 (-0,13 ..- 0,61), Ch46 (-0,14 ..- 0,19). A high effect of GCA was noted in the following crosses: RSK 7 (0,12-0,27), MK11 (0,18-0,57), RSK 3 (0,28-0,49). High dispersion of SCA in different years was noted for lines RSK 3 (0,54-1,14), Bg 1266 (0,43-1,60), PH26 (0,39-0,72), MK11 (0,24-0,70). Positive effects of SCA during the years of research were noted in the combinations MK 11/RSK 7 (0,41-0,98), MK 11/Yuv 19 (0,48-0,83), UK12D2/RSK 25 (0,36-0,75), UK12D2 / KS 25 (0,16-1,24), Ch46/KS 25 (0,25-1,87), CL-7 / RSK 3 (0,24-2,09), Yuv 19/Bg1266 (0,22-1,60), LV32/Od 28 (0,26-0,84).

In the experiment, there is a negative correlation between the value of the trait and the dominance of the parental lines: -0,601...-0,919. Dominance is directed towards parental forms with a greater severity of the trait.

Significantly significant indicators of the components of dominance ( $H_1$ ,  $H_2$ ), in absolute value, exceed the values of component D, which characterizes the additive effect of genes. The ratio  $\sqrt{H_1}/D$  indicates the positive effect of overdomination (3,16-7,12). The values of the  $H_2/4H_1$  ratio indicate a relatively uniform distribution of alleles with positive and negative effects. Depending on the growing conditions, the manifestation of grain yield is affected by 2-7 genes or groups of genes.

**Использование метода диаллельного анализа при изучении комбинационной способности инсукхт-линий кукурузы**

Зайцев С.А.

ФГБНУ Российский научно-исследовательский и проектно-технологический институт сорго и кукурузы «Россорго», Саратов, Россия

**Аннотация.** Представлены результаты применения метода диаллельного анализа. Выявлены эффекты ОКС и дисперсия СКС. Отражены компоненты генетической дисперсии и относительный вклад генов в наследование признака «урожайность зерна».

**Ключевые слова:** кукуруза, урожайность, комбинационная способность, генетическая дисперсия, эффект

Оценка комбинационной способности позволяет подобрать исходный материал и определить возможность использования линий и гибридов. Цель. Выявление ОКС и СКС самоопыленных линий кукурузы, а также компонентов генетической дисперсии, используя метод диаллельного анализа.

В опыте изучены линии и простые гибриды (120 шт.), полученные по диаллельной схеме (метод 2). Данные обработаны дисперсионным анализом, ОКС и СКС - анализом по Гриффингу, компоненты генетической дисперсии определяли по согласно Науман В.Д.

Ранжирование по урожайности зерна выявило определенную стабильность в годы исследования линий CL 7, РСК3, Х46, КС25, а по среднегрупповым показателям выявило относительную стабильность у гибридов, включающих в родословную линии Мк 11, РСК 7, РСК 3. Результаты анализа ОКС и СКС самоопыленных линий кукурузы, проведенного по диаллельной схеме, указывают на низкое значение эффектов ОКС по признаку «урожайность зерна» у линий CL-7 (-0,13...-0,61), Х46 (-0,14...-0,19). Высокий эффект ОКС отмечен у следующих компонентов скрещиваний: РСК 7 (0,12-0,27), Мк11 (0,18-0,57), РСК 3 (0,28-0,49). Высокая дисперсия СКС в разные годы отмечена у линий РСК 3 (0,54-1,14), Бг1266 (0,43-1,60), РН26 (0,39-0,72), Мк11 (0,24-0,70). Положительные эффекты СКС в годы исследования отмечены в комбинациях Мк 11/РСК 7 (0,41-0,98), Мк 11/ЮВ 19 (0,48-0,83), Ук12Д2/РСК 25 (0,36-0,75), Ук12Д2/КС 25 (0,16-1,24), Х46/КС 25 (0,25-1,87), CL-7/РСК 3 (0,24-2,09), ЮВ 19/Бг1266 (0,22-1,60), ЛВ32 /Од 28 (0,26-0,84).

В опыте отмечается отрицательная корреляция между значением признака и доминированием у родительских линий: -0,601...-0,919. Доминирование направлено в сторону родительских форм с большей выраженностью признака.

Существенно значимые показатели компонентов доминирования ( $H_1$ ,  $H_2$ ), по абсолютной величине превышают значения компонента D, характеризующего аддитивное действие генов. Отношение  $\sqrt{H_1}/D$  свидетельствует о положительном влиянии сверхдоминирования (3,16-7,12). Значения отношения  $H_2/4H_1$  указывают на относительно равномерное распределение аллелей с положительными и отрицательными эффектами. В зависимости от условий выращивания, на проявление урожайности зерна влияют 2-7 генов или групп генов.

**Analysis of *Pseudomonas fluorescens* inoculation effect on the work of mycorrhiza formed on black medic by arbuscular fungi differing in symbiotic activity**

Zheleznyakov S.V., Lebedeva V.K., Kalinina T.V., Kozhemyakov A.P., Jacobi L.M.

ARRIAM, Saint Petersburg, Russia

krosh15\_02@mail.ru

**Key message.** The influence of rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens*, as well as four species of fungi from the Glomeromycota phylum on the productivity of black medic in mono- and double (fungus + bacteria) inoculation was studied. A high dependence of the results on the symbiotic activity of mycosymbiont was established.

**Keywords:** arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), *Pseudomonas fluorescens*, mono- and double inoculations, black medic (*Medicago lupulina* L. subsp. *vulgaris* Koch.)

Creating the conditions for the effective operation of arbuscular mycorrhiza (AM) is the key to improving the phosphorus nutrition of agricultural plants and increasing their productivity. It is known that the efficiency of AM depends on the species of mycosymbiont. In addition, it is known about the positive effect of bacterial preparations of fertilizer action on plant productivity. The conditions for the stable synergistic effect from the interaction of selected rhizobacteria with AMF on plant productivity have not been studied enough. The solution to this problem is an important stage both for understanding the mechanisms involved in the regulation of AM efficacy and for realization of practical tasks related to increasing the productivity of agricultural plants by mobilizing natural resources.

The effect of inoculation by *P. fluorescens* strain PG7 on the productivity of black medic during the formation of AM with four species of AMF, such as *Funneliformis mosseae* (AMF-1), *G. sp.* (AMF-2), *Rhizophagus irregularis* (AMF-3) and *R. diaphanus* (AMF-4) differing in symbiotic activity was studied in the conditions of vegetation experiment. Plants were grown on the sterilized soil - sand substrate with the content of available for plant nutrient phosphorus (P) 7.2 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> per 100 g. To bring the soil conditions closer to natural ones, an aqueous suspension of microorganisms, without propagules of AMF, obtained from the unsterilized soil by filtration through a thin mill sieve was added to the substrate. Plant seedlings were inoculated with microorganisms when planting in the soil by introducing the mycorrhizal roots of *Plectranthus australis* and the aqueous suspension of bacteria.

The results of the analysis carried out on the 54th day from the planting of seedlings showed that in the absence of AM, inoculation by *P. fluorescens* did not affect the plant growth. Whereas, the effect of AM on plant growth in the absence of inoculation by *P. fluorescens* largely depended on the AMF species. For example, inoculation with inactive AMP-1 had a significant negative effect on root growth (33% weight loss) and did not affect the yield of straw and the content of total P in it. Under conditions of inoculation with a medium-active AMF-2 strain, the yield of roots and straw was at the control level; and only a significant increase of the total P in straw (by 66.5%) indicated the symbiotic activity of AMF-2. The inoculation by an active AMF-3 and AMF-4 strains had a significant positive impact on the growth of the aerial parts (increase by 36% in both cases) and the content of total P in straw (an increase of 81.1% and 70.6%, respectively) and did not affect the growth of roots compared with the control (without AM).

The effect of double inoculation (fungus + bacteria) on plant growth depended on the mycosymbiont species. A significant increase in mycorrhizal formation was observed in the conditions of double inoculation of *P. fluorescens* and AMF-1 in comparison with monoinoculation by AMF-1. However, this did not have a significant effect on plant productivity compared to the control (AMF-1 monoinoculation). The double inoculation by AMF-2 and *P. fluorescens* revealed a synergistic effect on plant growth: significantly increased root weight (by 33.1%) and straw yield (by 35.3%) compared to the control (AMF-2 monoinoculation). The double inoculation by *P. fluorescens* and AMF-3 did not lead to significant changes in in plant productivity. The double inoculation by *P. fluorescens* and AMF-4 had a significant synergistic effect on plant growth: straw yield increased by 22.7%, root weight by 19.6% compared to the control (AMF-4 monoinoculation). In this case the highest yield of straw was obtained.

Thus, the effectiveness of inoculation of highly mycotrophic black medic by *P. fluorescens* PG7 largely depended on both the presence of AM and the species of AMF in the inoculum.

This work was supported by the RFBR grant №19-016-00197.



**Study of the garden pea (*Pisum sativum* L.) symbioses in post-genomic era**

Zhukov V.A.<sup>1</sup>, Afonin A.M.<sup>1</sup>, Akhtemova G.A.<sup>1</sup>, Bovin A.D.<sup>1</sup>, Dolgikh A.V.<sup>1</sup>, Gorshkov A.P.<sup>1</sup>, Gribchenko E.S.<sup>1</sup>, Ivanova K.A.<sup>1</sup>, Kirienko A.N.<sup>1</sup>, Kitaeva A.B.<sup>1</sup>, Kliukova M.S.<sup>1</sup>, Kulaeva O.A.<sup>1</sup>, Kusakin P.G.<sup>1</sup>, Leppyanen I.V.<sup>1</sup>, Pavlova O.A.<sup>1</sup>, Romanyuk D.A.<sup>1</sup>, Serova T.A.<sup>1</sup>, Shtark O.Y.<sup>1</sup>, Sulima A.S.<sup>1</sup>, Tsyganova A.V.<sup>1</sup>, Vasileva E.N.<sup>1</sup>, Zhernakov A.I.<sup>1</sup>, Dolgikh E.A.<sup>1</sup>, Tsyganov V.E.<sup>1</sup>, Tikhonovich I.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia  
E-mail: vzhukov@arriam.ru

**Key message.** Mutualistic symbioses formed by garden pea have been studied with use of 'omic' technologies in order to gain a new understanding of molecular mechanisms of beneficial effect that microsymbionts have on seed yield and quality.

**Keywords:** garden pea, transcriptomics, nitrogen fixation, arbuscular mycorrhiza, PGPB

The garden pea (*Pisum sativum* L.) forms mutualistic symbioses with different beneficial microorganisms, namely nodule bacteria, arbuscular-mycorrhizal fungi, and plant growth-promoting bacteria (PGPB). Completion of the pea genome sequencing made possible the successful use of the 'omics' technologies for investigation into the molecular mechanisms of these symbioses.

The aim of the study was to discover the molecular-genetic bases of beneficial effect that microorganisms have on garden pea plants, including the improvement of seed quality and yield.

The plants of cv. Frisson were grown in quartz sand and inoculated with nodule bacteria (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026), arbuscular-mycorrhizal fungi (*Rhizophagus irregularis* BEG144), and PGPB (a component of a microbiological preparation 'Myzorin') so that 8 variants of treatment were studied. After 2 and 4 weeks of growth, the total gene expression was assessed in plant roots and in shoots using a modified RNAseq technique named 3'-MACE (as described in Zhernakov et al. (2019) PeerJ 7, e6662). Also, pea *sym28* and *sym29* mutants with impaired autoregulation of nodulation and mycorrhization were used to study the effect of combined inoculation with nodule bacteria and PGPB.

The differential response of pea to several microsymbionts (as single inoculants and in combinations) was assessed by transcriptome sequencing, and transcriptomic markers of successful inoculation were determined. For arbuscular-mycorrhizal inoculation, the most stable up-regulated markers were PS\_0021302 (encoding Glutathione S-transferase) and well-known mycorrhiza-specific gene RAM2. For PGPB inoculation, the gene encoding putative LRR protein (PS\_0029785) was found as a stable down-regulated marker. The treatment with PGPB differently affected the gene expression in wild type cv. Frisson, *sym28* and *sym29* plants, pointing towards the possible involvement of components of autoregulation in regulation of interaction with multiple symbionts, including PGPB. Together these data form the basis for comprehensive description of the molecular-genetic processes occurring in pea plants under the use of complex inoculants.

The work was supported by the Russian Science Foundation grant # 17-76-30016.

**Исследование симбиозов гороха посевного (*Pisum sativum* L.) в постгеномную эру**

Жуков В.А.<sup>1</sup>, Афонин А.М.<sup>1</sup>, Ахтемова Г.А.<sup>1</sup>, Бовин А.Д.<sup>1</sup>, Васильева Е.Н.<sup>1</sup>, Долгих А.В.<sup>1</sup>, Горшков А.П.<sup>1</sup>, Грибченко Э.С.<sup>1</sup>, Жернаков А.И.<sup>1</sup>, Иванова К.А.<sup>1</sup>, Кириенко А.Н.<sup>1</sup>, Китаева А.Б.<sup>1</sup>, Ключкова М.С.<sup>1</sup>, Кулаева О.А.<sup>1</sup>, Кусакин П.Г.<sup>1</sup>, Леппянен И.В.<sup>1</sup>, Павлова О.А.<sup>1</sup>, Романюк Д.А.<sup>1</sup>, Серова Т.А.<sup>1</sup>, Сулима А.С.<sup>1</sup>, Цыганова А.В.<sup>1</sup>, Штark О.Ю.<sup>1</sup>, Долгих Е.А.<sup>1</sup>, Цыганов В.Е.<sup>1</sup>, Тихонович И.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Взаимовыгодные симбиозы гороха посевного изучены с использованием «омиксных» технологий с целью понимания молекулярных механизмов полезного воздействия, которое микросимбионты оказывают на урожай и качество семян.

**Ключевые слова:** горох посевной, транскриптомика, азотфиксация, арбускулярная микориза, PGPB

Горох посевной образует симбиозы с различными полезными микроорганизмами, в том числе клубеньковыми бактериями, грибами арбускулярной микоризы и рост-стимулирующими бактериями (PGPB). Завершение секвенирования генома гороха позволяет успешно применять «омиксные» технологии для исследования молекулярных механизмов, лежащих в основе данных симбиозов.

Цель исследования – изучение молекулярно-генетических основ положительного влияния микроорганизмов на растения гороха, в том числе на повышение урожайности и качества семян.

Растения сорта Frisson были выращены в песке при инокуляции клубеньковыми бактериями (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026), грибами арбускулярной микоризы (*Rhizophagus irregularis* BEG144) и PGPB (компонент препарата «Мизорин») в 8 вариантах обработки. После 2 и 4 недель выращивания, была оценена экспрессия генов в корнях и побегах с использованием RNAseq в модификации 3'-MACE (см. Zhernakov et al. (2019) PeerJ 7, e6662). На мутантах гороха по генам *sym28* и *sym29* с нарушениями авторегуляции клубенькообразования и микоризации был изучен эффект совместной инокуляции клубеньковыми бактериями и PGPB.

Влияние микросимбионтов (по отдельности и в комбинациях) было оценено при помощи анализа транскриптома, при этом были выявлены транскриптомные маркеры успешного развития симбиоза. При развитии арбускулярной микоризы повышали экспрессию гены PS\_0021302 (кодирует Glutathione S-transferase) и RAM2, специфичный для микоризного симбиоза. При инокуляции PGPB стабильное снижение экспрессии было выявлено для гена, кодирующего LRR-белок (PS\_0029785). Воздействие PGPB по-разному влияло на экспрессию генов у Frisson и мутантов *sym28* и *sym29*, что указывает на возможную роль компонентов авторегуляции при взаимодействии с несколькими симбионтами, в том числе PGPB. Полученные данные являются основой описания молекулярно-генетических процессов, имеющих место при комплексной инокуляции растений гороха полезными микроорганизмами. Работа поддержана грантом РФ (17-76-30016).

### Search for microorganisms capable of bioremediating cement concrete structures

Zhurishkina E.V.<sup>1,2</sup>, Golovkina D.A.<sup>1,2</sup>, Baranchikov A.Ye.<sup>3</sup>, Garmay Yu.P.<sup>1</sup>, Sokolov A.Ye.<sup>1</sup>, Tsvigun N.V.<sup>4</sup>,  
Kopitsa G.P.<sup>1</sup>, Kulminskaya A.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>NRC “Kurchatov Institute” – PNPI, Gatchina, Russia; <sup>2</sup>Kurchatov Genomic Center – PNPI, Gatchina, Russia; <sup>3</sup>Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; <sup>4</sup>Federal Scientific Research Centre “Crystallography and Photonics” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

E-mail: zhurishkina\_ev@pnpi.nrcki.ru

**Key message.** Screening of bacteria capable of repairing damages in concrete structures was carried out. Crystals formed by the most productive strains were studied.

**Keywords:** screening, urease activity, calcium carbonate, biomineralization

When explored, concrete structures are subjected to various damages leading to deterioration of their quality and reduction of the usage period. As an alternative to expensive repair technologies with non-ecological chemical additives, the development of microbiological systems capable of repairing cracks in cement concrete is promising.

The purpose of this work is to find new strains that can maintain viability and repair damage in cement concrete structures.

For screening purposes, specific strategy and bacterial strains from the laboratory of the MRBD PNPI were used in the work. Changes of the bacterial surface and precipitate formation were observed using atomic force microscopy (AFM) and scanning electronic microscopy (SEM). The resulting crystals were studied by powder X-ray diffraction analysis. The ability of the selected bacteria to heal microcracks on samples from the cement-sand mixture was evaluated visually.

Seventy-one bacterial strains were screened resulted in 2 the most effective microorganisms, *Bacillus licheniformis* 8782 and *B. cereus* 4b. The XRD analysis revealed that the obtained crystals were isomorphs of CaCO<sub>3</sub>: calcite and vaterite. Analysis by AFM showed the beginning of precipitation of solid on the bacterial cell walls after 30 hours of the microbe growth in the selective medium. Treatment of concrete samples by bacterial suspensions led to full healing of artificial cracks during two weeks.

The authors acknowledge financial support from the State program “New technologies and applied studies” (agreement No. AAAA-A19-119091190086-1) and the Genome Research Center development program “Kurchatov Genome Center – PNPI” (agreement No. 075-15-2019-1663).

### Поиск микроорганизмов для применения в процессах биовосстановления цементобетонных конструкций

Журишкина Е.В.<sup>1,2</sup>, Головкина Д.А.<sup>1,2</sup>, Баранчиков А.Е.<sup>3</sup>, Гармай Ю.П.<sup>1</sup>, Соколов А.Ю.<sup>1</sup>, Цвигун Н.В.<sup>4</sup>,  
Копица Г.П.<sup>1</sup>, Кульминская А.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия; <sup>2</sup>Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Гатчина, Россия;

<sup>3</sup>Институт общей и неорганической химии имени Н. С. Курнакова РАН, Москва, Россия; <sup>4</sup>ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия

**Аннотация.** Проведен скрининг бактерий, способных восстанавливать повреждения в бетонных конструкциях. Исследованы кристаллы, образованные наиболее продуктивными штаммами.

**Ключевые слова:** скрининг, уреазная активность, карбонат кальция, биоминерализация

Во время эксплуатации цементобетонные конструкции подвергаются различным повреждениям, что приводит к ухудшению их качества и сокращению срока службы. В качестве альтернативы дорогостоящим ремонтным технологиям с применением неэкологичных химических добавок перспективным направлением представляется разработка микробиологических систем, способных к заживлению трещин в цементобетоне.

Целью данной работы является поиск новых штаммов, способных сохранять жизнеспособность и восстанавливать повреждения в цементобетонных конструкциях.

Для скрининга были использованы бактериальные штаммы из лаборатории ОМРБ ПИЯФ и специально разработанная стратегия. Изменение бактериальной поверхности и образование осадков наблюдали с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) и растровой электронной микроскопии (РЭМ). Полученные кристаллы были проанализированы методом рентгенофазового анализа (РФА). Способность отобранных бактерий заполнять микротрещины на образцах из цементно-песчаной смеси оценивали визуально.

В результате скрининга из 71 бактериального штамма были отобраны 2 наиболее эффективных: *Bacillus licheniformis* 8782 и *B. cereus* 4b. Методами РФА и РЭМ было показано, что полученные кристаллы являются изоморфами CaCO<sub>3</sub>: кальцит и ватерит. Методом АСМ было обнаружено начало формирования твердых осадков на поверхности клеточных стенок бактерий после 30 часов их роста в селективной среде. Обработка образцов из цементно-песчаной смеси суспензиями выбранных бактерий привела к полному заполнению искусственных микротрещин в течение 2 недель.

Работа выполняется в рамках гос. задания по теме «Новые технологии и прикладные исследования» (рег. № AAAA-A19-119091190086-1) и при финансовой поддержке Курчатовского геномного центра — ПИЯФ (соглашение № 075-15-2019-1663).



## Regulation of development of arbuscular-mycorrhizal symbiosis by alternative splicing in garden pea (*Pisum sativum* L.)

Zorin E.A., Kulaeva O.A., Shtark O. Y., Zhukov V.A.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia

E-mail: kjokkjok8@gmail.com

**Key message.** 836 differentially expressed genes were detected in the roots of *P. sativum* in response to inoculation with AM fungus. 126 genes showing differential splicing were also detected.

**Keywords:** symbiosis, transcriptomics, alternative splicing, *P. sativum*

The process of establishing and maintaining the symbiotic relationships between the legume and the arbuscular mycorrhiza (AM) fungi or nodule bacteria involves hundreds of genes, the expression of which is regulated by various mechanisms. Among them are alternative splicing and suppression of gene expression by miRNAs. Currently, the role of these regulatory mechanisms of gene expression in symbiosis, especially those formed by pea and soil microorganisms, is studied insufficiently.

The aim of this work is to study the regulation of gene expression in the mycorrhized roots of *P. sativum* mediated by the events of alternative splicing.

In the framework of the work, transcriptomes of the roots of pea inoculated with arbuscular mycorrhiza fungus and control in three biological replicates were sequenced using Illumina technology. Then bioinformatic processing was performed.

Transcripts were reconstructed and quantified using the Cufflinks pipeline. All calculations were carried out in the R programming environment.

Statistical analysis of the quantification of reconstructed transcripts revealed 836 differentially expressed genes, among which 398 are regulated positively and 438 negatively in samples of inoculated roots compared to controls. Among them are genes having cation binding sites, hydrolase and peroxidase activity. 126 genes demonstrating differential splicing are associated with DNA metabolism and hydrolase activity. Among them, alternatively spliced transcripts with a retained intron predominate.

The reported study was funded by RFBR, project number 19-31-27001.

## Регуляция развития арбускулярно-микоризного симбиоза за счет альтернативного сплайсинга у гороха посевного (*Pisum sativum* L.)

Зорин Е.А., Кулаева О.А., Штарк О.Ю., Жуков В.А.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** В корнях *P. sativum* выявлено 836 дифференциально экспрессирующихся генов в ответ на инокуляцию грибом АМ. Так же выявлено 126 генов, демонстрирующих дифференциальный сплайсинг.

**Ключевые слова:** симбиоз, транскриптомика, альтернативный сплайсинг, *P. sativum*.

В процесс становления и поддержания симбиотических отношений между бобовым растением и грибами арбускулярной микоризы (АМ) или клубеньковыми бактериями вовлечены сотни генов, экспрессия которых регулируется при помощи различных механизмов. Такими механизмами являются, в частности, альтернативный сплайсинг и подавление экспрессии генов за счет регуляторных микроРНК. В настоящий момент роль указанных способов регуляции экспрессии генов в симбиозах, особенно формируемых горохом посевным и почвенными микроорганизмами, изучена крайне слабо.

Целью работы является исследование регуляции экспрессии генов в микоризованных корнях растений гороха посевного, опосредованной событиями альтернативного сплайсинга.

В рамках работы были секвенированы транскриптомы корней гороха посевного, инокулированных грибом арбускулярной микоризы, и контроля в трёх биологических повторностях по технологии Illumina с последующей биоинформатической обработкой. Реконструирование транскриптов и квантификация осуществлялась с помощью пайплайна Cufflinks. Все вычисления проводились в среде программирования R.

Статистический анализ квантификации реконструированных транскриптов позволил выявить 836 дифференциально экспрессирующихся генов, среди которых 398 регулируются положительно и 438 негативно в образцах инокулированных корней в сравнении с контрольными. Среди них представлены гены, имеющие сайты связывания катионов, гидролазной и пероксидазной активностью. 126 генов, демонстрирующих дифференциальный сплайсинг связаны с метаболизмом ДНК и гидролазной активностью. Среди них преобладают альтернативно сплайсируемые транскрипты с удержанным интроном.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-31-27001

**Effect of bacterization with *Pseudomonas extremorientalis* PhS1 on photosynthesis processes in wheat plants (*Triticum aestivum* L.) under phytopathogenic load**Zyubanova T.I.<sup>1,2</sup>, Minaeva O.M.<sup>1,2</sup>, Tereshchenko N.N.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Tomsk State University, Tomsk, Russia; <sup>2</sup>Siberian Research Institute of Agriculture and Peat, Tomsk, Russia

E-mail: zyubanovat.i@gmail.com

**Key message.** We found that bacterization of wheat with *Pseudomonas extremorientalis* increases the efficiency of open photosystem II reaction centers and reduces the photosynthesis losses dissipated as heat in the presence of a phytopathogen.

**Keywords:** bacterization, chlorophyll fluorescence, plant resistance

At all stages, photosynthesis is subject to the deforming effect of various stresses, including biotic ones, such as plant damage by phytopathogens. At present, it has been established that one of the most objective criteria for the activity of the photosynthetic apparatus of plants is chlorophyll fluorescence. Physiologically significant data are obtained on the basis of the analysis of such kinetic parameters as background and maximum fluorescence, maximum quantum yield of photosystem II, etc. These parameters both reflect the physiological state of plants and can be used to assess plant resistance, to conduct environmental monitoring and to predict crop yields.

The aim of this research was to identify the effect of *Pseudomonas extremorientalis* PhS1 bacteria on the activity of photosynthesis processes in wheat plants infected with *Bipolaris sorokiniana*.

The objects of the research were 12-day wheat plants (*Triticum aestivum* L., Iren cultivar) inoculated with a liquid 24-hour bacterial culture *P. extremorientalis* PhS1. A six-day culture of *Bipolaris sorokiniana* on a solid medium was used to infect plants. Plants were grown in a climate chamber (Growth Chamber GLK-300, Korea) in plastic containers with peat substrate. The light intensity was 200  $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2 \text{ s})$  of PAR with a 16-hour photoperiod at 20–22°C (day) and 15–16°C (night) and with 80% humidity. Chlorophyll *a* fluorescence was measured after 30 minutes of dark adaptation of plants using a fluorimeter (JUNIOR-PAM, Walz, Germany).

It was identified that neither bacterization nor the presence of the pathogen have a significant effect on the indicators of the maximum efficiency of photosystem II and photochemical fluorescence quenching coefficients. Bacterization contributed to an increase in the speed of electronic transport by 7% in the absence of the phytopathogen and in its presence by 6% ( $p < 0.05$ ) compared to nonbacterized plants under the same conditions, which may indicate a decrease in stress. In tests, a decrease in non-photochemical quenching during bacterization and in the presence of the phytopathogen was found to be 7–17% ( $p < 0.05$ ), which indicates a decrease in energy losses and heat dissipation.

**Влияние бактерий *Pseudomonas extremorientalis* PhS1 на процессы фотосинтеза растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в условиях фитопатогенной нагрузки**Зюбанова Т.И.<sup>1,2</sup>, Минаева О.М.<sup>1,2</sup>, Терещенко Н.Н.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия; <sup>2</sup>СибНИИСХиТ – филиал СФНЦА РАН, Томск, Россия

**Аннотация.** Показано, что бактеризация пшеницы *Pseudomonas extremorientalis* увеличивает эффективность открытых реакционных центров фотосистемы II и снижает потери фотосинтеза, рассеиваемые в виде тепла, в присутствии фитопатогена.

**Ключевые слова:** бактеризация, флуоресценция хлорофилла, резистентность растений

Фотосинтез на всех этапах подвержен деформирующему воздействию различных стрессов, включая биотические, такие как поражение растений фитопатогенами. В настоящее время установлено, что одним из наиболее объективных критериев активности фотосинтетического аппарата растений являются показатели флуоресценции хлорофилла. Физиологически значимые данные получают на основе анализа таких кинетических параметров, как фоновая и максимальная флуоресценции, максимальный квантовый выход фотосистемы II и др. Данные параметры отражают как физиологическое состояние растений, так и могут быть использованы для оценки устойчивости растений, экологического мониторинга и прогнозирования урожая.

Цель работы: изучить влияние фосфатмобилизирующих бактерий *Pseudomonas extremorientalis* PhS1 на активность процессов фотосинтеза растений пшеницы в моделируемых условиях повышенного инфекционного фона.

Объекты исследования: 12-ти дневные растения пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Ирень) инокулированные жидкой 24-часовой культурой бактерий *P. extremorientalis* PhS1. Для создания инфекционного фона использовали шестисуточную культуру *Bipolaris sorokiniana* на плотной среде. Фитопатоген вносили в виде агаровых блоков в ряды с семенами при посадке. Растения выращивали в климатикамере (Growth Chamber GLK-300, Корея) в пластиковых контейнерах с торфяным субстратом. Интенсивность освещения – 200  $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2 \text{ сек})$  ФАР с 16-часовым фотопериодом при 20–22°C (дневные температуры) и 15–16°C (ночные) и влажности 80%. Флуоресценцию хлорофилла *a* измеряли после 30 минутной темновой адаптации растений при помощи флуориметра (JUNIOR-PAM, Walz, Германия).

Установлено, что ни бактеризация, ни наличие инфекционного фона не оказывают значимого влияния на показатели максимальной эффективности фотосистемы II и коэффициенты фотохимического тушения флуоресценции. Бактеризация способствовала увеличению скорости электронного транспорта на 7% в отсутствие фитопатогена и на 6% ( $p < 0,05$ ) на инфекционном фоне относительно небактеризованных растений в тех же условиях, что может свидетельствовать об уменьшении стресса. Обнаружено уменьшение показателей нефотохимического тушения при бактеризации и наличия фитопатогена на 7–17% ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует об уменьшении потерь энергии и рассеивании в виде тепла.

**Biotechnology for the production of wheat-rye hybrids (primary triticale)**

Akinina V.N., Dyachuk T.I., Zhilin S.V., Kalashnikova E.V.

Agricultural Research Institute of South-East Region, Saratov, Russia

E-mail: akinina\_victoria@mail.ru

**Key message.** Durum wheat and rye hybrids were obtained using *in vitro* germ culture. The influence of the durum wheat genotype (♀) on the hybridization performance was revealed, which is due to the presence of genes that inhibit crossbreeding.

**Keywords:** triticale, breeding, wheat-rye hybrids, *in vitro* embryo culture

Triticale, as a new generation crop, plays a significant role in stabilizing grain production. Creation and study of the source material, selection and selection of new breeding-valuable genotypes is an integral part of the breeding process. The aim of the research is to create a source material for triticale breeding in the Volga region based on the production of wheat-rye hybrids (primary triticale). In connection with the manifestation of postgamous incompatibility in such crosses, the method of embryo culture *in vitro* (embryo rescue) was used. The embryos were isolated 18-20 days after pollination. The resulting amphiploid was colchicinebu for doubling the number of chromosomes and obtaining a fertile appdeploy. The resulting hybrids were propagated using the *in vitro* microclonal propagation method.

42 hybrid combinations were crossed. The setability of hybrid grains varied from 10.4 to 47.7%. Pollination of 2,223 durum wheat flowers produced 768 seeds, of which 604 had embryos with varying degrees of differentiation. The highest frequency of setting hybrid grains was found in crosses where the mother forms were varieties of durum wheat Amazon (47.7%), dione (37.5%) and Aksinit (37.6%). Intervarietal differences in the level of crosses wheat rye linked to patterns of distribution of genes compatibility. Presumably, these varieties have a recessive allele of the crossbreeding gene *kr1*. The Teya and Eirena varieties with 18.6% and 26.5% seed-binding rates are assumed to have a recessive allele of the *kr2* gene. The lowest frequency of hybrid grain binding was found in crosses with the winter durum wheat variety Agat Donskoy (10.4%), which indicates the presence of dominant alleles of the crossing genes Kr1 Kr2.

**Биотехнология получения пшенично-ржаных гибридов (первичных тритикале)**

Акинина В.Н., Дьячук Т.И., Жилин С.В., Калашникова Э.В.

ФГБНУ НИИСХ Юго-Востока, Саратов, Россия

**Аннотация.** С использованием культуры зародышей *in vitro* получены гибриды твердой пшеницы с рожью. Выявлено влияние генотипа твердой пшеницы (♀) на результативность гибридизации, что обусловлено наличием у них генов-ингибиторов скрещиваемости.

**Ключевые слова:** тритикале, селекция, пшенично-ржаные гибриды, культура зародышей *in vitro*

Тритикале, как культура нового поколения, играет существенную роль в стабилизации производства зерна. Создание и изучение исходного материала, выделение и отбор новых селекционно-ценных генотипов является неотъемлемой частью селекционного процесса. Цель исследования – создать исходный материал для селекции тритикале в условиях Поволжья на основе получения пшенично-ржаных гибридов (первичных тритикале). В связи с проявлением постгамной несовместимости в таких скрещиваниях применяли метод культуры зародышей *in vitro* (embryo rescue). Зародыши вычлняли на 18-20 день после опыления. Полученные амфигаплоиды были колхицинированы для удвоения числа хромосом и получения фертильных амфмдиплоидов. Для размножения полученных гибридов применяли метод микроклонального размножения *in vitro*.

Были проведены скрещивания по 42 гибридным комбинациям. Завязываемость гибридных зерновок варьировала от 10,4 до 47,7%. При опылении 2223 цветков твердой пшеницы завязалось 768 зерновок, из которых 604 имели зародыши с различной степенью дифференциации. Наибольшая частота завязывания гибридных зерновок обнаружена в скрещиваниях, где материнскими формами служили сорта твердой пшеницы Амазонка (47,7%), Диона (37,5%) и Аксинит (37,6%). Межсортные различия по уровню скрещиваемости пшеницы с рожью связаны с особенностями распределения генов совместимости. Предположительно эти сорта имеют в наличии рецессивный аллель гена скрещиваемости *kr1*. Сорта Тейя и Эйрена с завязываемостью зерновок 18,6% и 26,5% предположительно имеют рецессивный аллель гена *kr2*. Наименьшая частота завязывания гибридных зерен обнаружена в скрещиваниях с сортом озимой твердой пшеницы Агат донской (10,4%), что свидетельствует о наличии доминантных аллелей генов скрещиваемости Kr1 Kr2.

## Authors index

|                           |   |                            |                      |
|---------------------------|---|----------------------------|----------------------|
| <b>Abdurashytov S.F.</b>  | 5, 6  | <b>Avalbaev A.M.</b>       | 22                   |
| <b>Abdurashytova E.R.</b> | 5, 6  | <b>Avdeeva G.S.</b>        | 227                  |
| <b>Abdykadyrova A.Zh.</b> | 8   | <b>Ayrapetyan O.N.</b>     | 29                   |
| <b>Afonin A.M.</b>        | 7, 9, 93, 99, 138, 227, 238,<br>265, 284, 289 | <b>Azarova T.S.</b>        | 39                   |
| <b>Ageeva M.</b>          | 92  |                            |                      |
| <b>Aipova P.</b>          | 8   | <b>Babak O.G.</b>          | 225                  |
| <b>Akashkina Yu.V.</b>    | 193   | <b>Babynin E.V.</b>        | 172                  |
| <b>Akhtemova G.A.</b>     | 7, 9, 265, 289                                | <b>Bagavova A.R.</b>       | 266                  |
| <b>Akhtyamova G.A.</b>    | 10, 53  | <b>Baganova M. E.</b>      | 51                   |
| <b>Akhtyamova Z.A.</b>    | 11  | <b>Baigonusova Zh.A.</b>   | 30, 164              |
| <b>Akinina V.N.</b>       | 293   | <b>Baimukhametova E.A.</b> | 31, 168              |
| <b>Akimova E.E.</b>       | 171   | <b>Bakaeva M.D.</b>        | 32, 33               |
| <b>Akimova E.S.</b>       | 12, 38, 271                                   | <b>Bakulina A.V.</b>       | 180, 251             |
| <b>Akosah Y.A.</b>        | 13, 272                                       | <b>Balakina S.V.</b>       | 51                   |
| <b>Aksenova T.S.</b>      | 14, 119, 187                                  | <b>Balkin A.S.</b>         | 133                  |
| <b>Alatortseva T.A.</b>   | 15  | <b>Baranchikov A.Ye.</b>   | 290                  |
| <b>Aldosari M.D.</b>      | 16  | <b>Baranskaya M.I.</b>     | 34                   |
| <b>Alekseenko O.P.</b>    | 60  | <b>Barchukova A.Ya.</b>    | 35                   |
| <b>Alekseev V.Yu.</b>     | 17, 18, 52, 268                               | <b>Bareika H.A.</b>        | 229                  |
| <b>Alen'kina S.A.</b>     | 19  | <b>Basov V.I.</b>          | 58                   |
| <b>Aleschenkova Z.M.</b>  | 20, 24, 213                                   | <b>Baubekova D.G.</b>      | 36                   |
| <b>Ali Basharat</b>       | 21  | <b>Baulina O.I.</b>        | 286                  |
| <b>Allagulova Ch.R.</b>   | 22  | <b>Baymiev Al.Kh.</b>      | 37, 38, 54, 271      |
| <b>Allakhverdyan V.V.</b> | 103   | <b>Baymiev An.Kh.</b>      | 12, 37, 38, 104, 271 |
| <b>Al-Nakib E.A.</b>      | 152   | <b>Bebyakina I.V.</b>      | 58                   |
| <b>Alsowaidi A.K.M.</b>   | 23, 96, 97, 114                               | <b>Begun S.A.</b>          | 279                  |
| <b>Ananyeva I.N.</b>      | 24, 213                                       | <b>Belimov A.A.</b>        | 39, 99, 119, 242     |
| <b>Andronov E.E.</b>      | 5, 14, 99, 109, 112, 119,<br>167, 187, 200    | <b>Belova E.A.</b>         | 283                  |
| <b>Antohina S.P.</b>      | 20  | <b>Belovezhets L.A.</b>    | 40, 163              |
| <b>Antsiferov D.V.</b>    | 25, 76, 86, 155                               | <b>Berestetskiy A.O.</b>   | 214                  |
| <b>Apanasova N.V.</b>     | 26  | <b>Berezhnaya V.V.</b>     | 41                   |
| <b>Arashkova A.A.</b>     | 252   | <b>Besarab N.V.</b>        | 42                   |
| <b>Arkhipova T.N.</b>     | 27, 33, 137                                   | <b>Bezler N.V.</b>         | 43, 71               |
| <b>Asaturova A.M.</b>     | 47, 103, 129, 230, 259                        | <b>Beznosov S.N.</b>       | 203                  |
| <b>Astapchuk I.L.</b>     | 280   | <b>Bhushan Indu</b>        | 44                   |
| <b>Atakishiyeva Y.Y.</b>  | 28  | <b>Blagova D.K.</b>        | 17                   |
| <b>Avakimyan A.O.</b>     | 152   | <b>Blinova A.L.</b>        | 180                  |
| <b>Avakova A.A.</b>       | 157   | <b>Bobrikova L.P.</b>      | 173                  |

|                          |                                     |                                  |                        |
|--------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| <b>Bogatyreva N.V.</b>   | 45                                  | <b>Danilova E.D.</b>             | 56, 155                |
| <b>Bogdanov A.V.</b>     | 46                                  | <b>Danilova N.</b>               | 111                    |
| <b>Boldakov D.M.</b>     | 57, 58                              | <b>Davoyan E.R.</b>              | 57, 58                 |
| <b>Bondarchuk E.Yu.</b>  | 47                                  | <b>Davoyan R.O.</b>              | 57, 58                 |
| <b>Borisova G.G.</b>     | 277                                 | <b>Deineko I.V.</b>              | 89, 107                |
| <b>Borodina E.V.</b>     | 219, 220                            | <b>Demchenko K.N.</b>            | 59, 106, 121           |
| <b>Borodina I.A.</b>     | 23, 96, 97                          | <b>Denisova A.Yu.</b>            | 67                     |
| <b>Borodina M.A.</b>     | 97                                  | <b>Didovich S.V.</b>             | 60                     |
| <b>Bovin A.D.</b>        | 48, 289                             | <b>Diubo Yu.</b>                 | 61                     |
| <b>Boyko E.V.</b>        | 49                                  | <b>Dobryakova K.S.</b>           | 284                    |
| <b>Brewin N.J.</b>       | 258                                 | <b>Dolgikh A.V.</b>              | 62, 289                |
| <b>Bukharina I.L.</b>    | 50                                  | <b>Dolgikh E.A.</b>              | 48, 62, 120, 208, 289  |
| <b>Bukharov S.V.</b>     | 46                                  | <b>Dolgikh V.V.</b>              | 126, 247               |
| <b>Bukhtiyarova P.A.</b> | 85                                  | <b>Doludin Yu.V.</b>             | 225                    |
| <b>Burkhanova G.F.</b>   | 17, 186, 209, 222, 256, 268,<br>269 | <b>Domracheva L.I.</b>           | 74, 231                |
| <b>Burkin A.A.</b>       | 78                                  | <b>Dyachenko O.V.</b>            | 77                     |
| <b>Buryanov Ya.I.</b>    | 77                                  | <b>Dyachuk T.I.</b>              | 293                    |
| <b>Burygin G.L.</b>      | 67, 94, 133, 221, 266               | <b>Dykman L.A.</b>               | 232                    |
| <b>Bykovskaya A.N.</b>   | 41                                  | <b>Dymo A.M.</b>                 | 165                    |
| <b>Chaikovskaya L.A.</b> | 34                                  | <b>Dzhavakhiya V.G.</b>          | 65, 234                |
| <b>Chebotar V.K.</b>     | 51                                  | <b>Dzyubenko E.A.</b>            | 187                    |
| <b>Chekanov K.A.</b>     | 136                                 | <b>Dzyubenko N.I.</b>            | 187                    |
| <b>Chemeris A.V.</b>     | 98, 140, 141                        | <b>Efimova M.V.</b>              | 56, 155, 175           |
| <b>Chepurina A.A.</b>    | 157                                 | <b>Efremova L.N.</b>             | 125                    |
| <b>Cheremnykh A.M.</b>   | 163                                 | <b>Egovtseva A.Yu.</b>           | 5, 63, 167             |
| <b>Cherepanova E.A.</b>  | 52, 216, 268                        | <b>Elkonin L.A.</b>              | 64                     |
| <b>Cherepanova O.E.</b>  | 117                                 | <b>Emelianov D.A.</b>            | 233                    |
| <b>Chernysheva N.V.</b>  | 35                                  | <b>Erokhin D.V.</b>              | 65                     |
| <b>Chervyakova N.S.</b>  | 147                                 | <b>Evdokimova O.V.</b>           | 66                     |
| <b>Chetverikov S.P.</b>  | 32, 33, 73, 246                     | <b>Evenkova-Chernetsova K.I.</b> | 213                    |
| <b>Chetverikova D.V.</b> | 32                                  | <b>Evseeva N.V.</b>              | 67, 94                 |
| <b>Chikov V.I.</b>       | 10, 53                              | <b>Evtushenkov A.N.</b>          | 42, 194                |
| <b>Chindareva M.A.</b>   | 24                                  | <b>Fadeev V.V.</b>               | 55, 68, 100, 101, 174  |
| <b>Chirak E.R.</b>       | 5, 99, 200                          | <b>Farkhudinov R.G.</b>          | 69                     |
| <b>Chizevskaya E.P.</b>  | 112                                 | <b>Fedonenko Yu.P.</b>           | 70, 127, 215, 266, 282 |
| <b>Chubukova O.V.</b>    | 37, 54                              | <b>Fedorenko T. A.</b>           | 136                    |
| <b>Chugunova Y.A.</b>    | 131                                 | <b>Fedorova E.E.</b>             | 71, 253                |
| <b>Chumakov M.I.</b>     | 55, 68, 100, 101, 174, 276          | <b>Fedorova O.A.</b>             | 72                     |
| <b>Churikova D.A.</b>    | 157                                 |                                  |                        |

|                                |                                  |                          |                            |
|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>Feoktistova A.V.</b>        | 73, 246                          | <b>Golomidova A.K.</b>   | 42                         |
| <b>Filip'echeva Y.A.</b>       | 115                              | <b>Golovatskaya I.F.</b> | 49, 90, 181                |
| <b>Fokina A.I.</b>             | 74                               | <b>Golovkina D.A.</b>    | 290                        |
| <b>Fokina N.A.</b>             | 75, 263                          | <b>Golovko T.K.</b>      | 243                        |
| <b>Frank Y.A.</b>              | 76, 88                           | <b>Gorbunova A.O.</b>    | 134, 284                   |
| <b>Fridman V.A.</b>            | 261                              | <b>Gordon M.L.</b>       | 138                        |
| <b>Frolov A.</b>               | 7                                | <b>Gorshkov A.P.</b>     | 91, 289                    |
| <b>Frolova G.M.</b>            | 233                              | <b>Gorshkov V.Y.</b>     | 92, 192, 195, 254, 270     |
| <b>Furs O.V.</b>               | 77                               | <b>Gorelnikova E.A.</b>  | 147                        |
|                                |                                  | <b>Goyanov M.A.</b>      | 157                        |
| <b>Gagkaeva T.Yu.</b>          | 78                               | <b>Gribchenko E.S.</b>   | 289                        |
| <b>Gainullina K.P.</b>         | 79                               | <b>Grigoriadi A.S.</b>   | 69                         |
| <b>Galdina T.E.</b>            | 80                               | <b>Grigoryan M.A.</b>    | 94                         |
| <b>Galieva G.Sh.</b>           | 81                               | <b>Grigoryeva N.Yu.</b>  | 95                         |
| <b>Galitskaya A.A.</b>         | 232                              | <b>Gritchkin M.V.</b>    | 109, 281                   |
| <b>Galitskaya P.Yu.</b>        | 81, 111, 145                     | <b>Gubina E.D.</b>       | 157                        |
| <b>Galimova A.A.</b>           | 82, 285                          | <b>Guliy O.I.</b>        | 23, 96, 97, 114            |
| <b>Galin I.R.</b>              | 217                              | <b>Gumerova G.R.</b>     | 98, 141                    |
| <b>Gall N.R.</b>               | 139                              | <b>Guro P.</b>           | 39, 99                     |
| <b>Galushko A.S.</b>           | 139                              | <b>Gurevich Yu.L.</b>    | 236                        |
| <b>Ganotskaya T.</b>           | 167                              | <b>Gusenkov E.A.</b>     | 233                        |
| <b>Garabadzhiu A.V.</b>        | 191                              | <b>Gusev Yu.S.</b>       | 55, 68, 100, 101, 174, 276 |
| <b>Garagozov T.H.</b>          | 211                              | <b>Guseva E.D.</b>       | 59, 106, 121               |
| <b>Garipova S.R.</b>           | 83, 162                          | <b>Gutorova O.V.</b>     | 55, 102, 276               |
| <b>Garifullina D.V.</b>        | 83                               | <b>Gyrnets A.A.</b>      | 103                        |
| <b>Garmay Yu.P.</b>            | 290                              |                          |                            |
| <b>Garshina D.</b>             | 84, 149                          | <b>Ibragimov A.</b>      | 84, 104                    |
| <b>Gavrilova O.P.</b>          | 78                               | <b>Ibragimova S.A.</b>   | 105                        |
| <b>Gerasimchuk A.L.</b>        | 85                               | <b>Ibrahim I.M.</b>      | 70, 127, 215               |
| <b>Gil'fanova A.R.</b>         | 46                               | <b>Ilina E.L.</b>        | 59, 106, 121               |
| <b>Gilvanova E.A.</b>          | 86                               | <b>Il'nitskaya E.T.</b>  | 158, 159                   |
| <b>Girilovich N.I.</b>         | 188                              | <b>Isaeva I.G.</b>       | 165                        |
| <b>Gladkov E.A.</b>            | 87                               | <b>Islamov B.</b>        | 92                         |
| <b>Gladkov G.V.</b>            | 39, 119                          | <b>Islamova N.A.</b>     | 50                         |
| <b>Gladkova O.N.</b>           | 87                               | <b>Ivakhnyuk G.K.</b>    | 191                        |
| <b>Glukhova L.B.</b>           | 76, 88                           | <b>Ivanova K.A.</b>      | 289                        |
| <b>Gogolev Yu.V.</b>           | 92, 133, 146, 192, 242, 254, 270 | <b>Ivasenko Dan.A.</b>   | 76, 88                     |
| <b>Gogoleva N.E.</b>           | 92, 133, 146, 192, 254, 270      | <b>Ivasenko Den.A.</b>   | 25, 76, 85, 88, 155        |
| <b>Goldenkova-Pavlova I.V.</b> | 89, 107, 193, 212, 261           | <b>Ivshina I.B.</b>      | 248                        |



|                               |                                      |                             |               |
|-------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|---------------|
| <b>Jacobi L.M.</b>            | 288                                  | <b>Kimeklis A.K.</b>        | 119, 187, 200 |
| <b>Kabardaeva K.V.</b>        | 107, 261                             | <b>Kirienko A.N.</b>        | 120, 289      |
| <b>Kalamiyets E.I.</b>        | 108, 143, 161, 188, 197,<br>224, 229 | <b>Kirpichnikova A.A.</b>   | 227           |
| <b>Kalashnikova E.V.</b>      | 293                                  | <b>Kiryushkin A.S.</b>      | 59, 106, 121  |
| <b>Kalinina T.V.</b>          | 288                                  | <b>Kislushko P.M.</b>       | 161           |
| <b>Kameneva I.</b>            | 109, 281                             | <b>Kitaeva A.B.</b>         | 289           |
| <b>Kamnev A.A.</b>            | 110, 260, 272                        | <b>Klimenko O.P.</b>        | 122           |
| <b>Kamputin I.V.</b>          | 191                                  | <b>Kliukova M.S.</b>        | 227, 289      |
| <b>Kantor G.Ya.</b>           | 231                                  | <b>Klykov A.G.</b>          | 41            |
| <b>Kapustkina A.</b>          | 126                                  | <b>Klykov V.N.</b>          | 225           |
| <b>Kaposhko D.K.</b>          | 88                                   | <b>Kochkin D.V.</b>         | 250           |
| <b>Karamova K.</b>            | 111                                  | <b>Koida E.S.</b>           | 123           |
| <b>Karasev E.P.</b>           | 112                                  | <b>Konarev Alexander V.</b> | 126, 247      |
| <b>Karasev S.G.</b>           | 113                                  | <b>Konarev Alexey V.</b>    | 126           |
| <b>Karaseva E.V.</b>          | 113, 173                             | <b>Konnova S.A.</b>         | 70, 127, 215  |
| <b>Karavaeva O.A.</b>         | 23, 96, 97, 114                      | <b>Konstantinov A.V.</b>    | 128           |
| <b>Karimova L.R.</b>          | 267                                  | <b>Kopitsa G.P.</b>         | 290           |
| <b>Karpunina L.V.</b>         | 75, 263                              | <b>Kolesova A.Yu.</b>       | 55, 151       |
| <b>Kartyzhova L.E.</b>        | 20                                   | <b>Koretskaya I.I.</b>      | 179           |
| <b>Kasatkin M.Yu.</b>         | 130                                  | <b>Korolyova M.I.</b>       | 253           |
| <b>Kashin A.S.</b>            | 130                                  | <b>Kolomeichuk L.V.</b>     | 155           |
| <b>Kasimova A.R.</b>          | 17, 268                              | <b>Kolubako A.V.</b>        | 124, 226      |
| <b>Katsy E.I.</b>             | 115                                  | <b>Komakhin R.A.</b>        | 125           |
| <b>Kendzhieva A.A.</b>        | 32                                   | <b>Korshunova T.Y.</b>      | 33            |
| <b>Kenzhegulov O.A.</b>       | 64                                   | <b>Koryakov I.S.</b>        | 12, 38        |
| <b>Khafizova G.V.</b>         | 116, 165                             | <b>Korzhenevskij O.Ch.</b>  | 224           |
| <b>Khairullin R.M.</b>        | 83, 160                              | <b>Kouchoro F.</b>          | 261           |
| <b>Khakimova L.R.</b>         | 267                                  | <b>Kovaleva O.N.</b>        | 219, 220      |
| <b>Khaliluev M.R.</b>         | 225                                  | <b>Kovaleva V.A.</b>        | 201           |
| <b>Khamidullina L.A.</b>      | 53                                   | <b>Kovina A.L.</b>          | 74            |
| <b>Khamidullina Liliya A.</b> | 117, 249                             | <b>Kovtun I.S.</b>          | 175           |
| <b>Khandy M.T.</b>            | 250                                  | <b>Kozhemyakov A.P.</b>     | 191, 288      |
| <b>Khapilina O.N.</b>         | 204                                  | <b>Kozitsyn A.E.</b>        | 129           |
| <b>Khizhnyak E.I.</b>         | 118                                  | <b>Kritskaya T.A.</b>       | 130           |
| <b>Khudokormov A.A.</b>       | 118, 131, 173                        | <b>Kruglova M.N.</b>        | 131           |
| <b>Khusaynov Kh.A.</b>        | 78                                   | <b>Kruglova N.N.</b>        | 132, 217      |
| <b>Khomyak A.I.</b>           | 230                                  | <b>Kryuchkova Ye.V.</b>     | 133           |
| <b>Khomyakova A.A.</b>        | 23, 114                              | <b>Kryukov A.A.</b>         | 134, 284      |
| <b>Kilchevsky A.V.</b>        | 225                                  | <b>Kryzhko A.V.</b>         | 135           |
|                               |                                      | <b>Ksenofontova O.Yu.</b>   | 16, 23, 114   |

|                            |   |                                  |                                   |
|----------------------------|---|----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Kublanovskaya A.A.</b>  | 136, 286  | <b>Loskutov S.I.</b>             | 191, 201                          |
| <b>Kudoyarova G.R.</b>     | 33, 137, 217  | <b>Lovegrove A.</b>              | 126                               |
| <b>Kukulyanskaya T.A.</b>  | 199   | <b>Lugovtsova S.Yu.</b>          | 153                               |
| <b>Kulaeva O.A.</b>        | 7, 93, 122, 138, 289, 291                             | <b>Lukasheva E.</b>              | 7                                 |
| <b>Kulagin D.V.</b>        | 128   | <b>Lukatkin A.A.</b>             | 154                               |
| <b>Kuleshova T.E.</b>      | 139   | <b>Lukatkin A.S.</b>             | 154                               |
| <b>Kulminskaya A.A.</b>    | 29, 290   | <b>Lukjanova E.A.</b>            | 25, 155                           |
| <b>Kuluev A.R.</b>         | 140   | <b>Lutfullin M.T.</b>            | 156                               |
| <b>Kuluev B.R.</b>         | 31, 82, 98, 140, 141, 168,<br>190, 228, 237, 244, 285 | <b>Lutsky E.O.</b>               | 239, 240                          |
| <b>Kumar A.</b>            | 277   | <b>Lyakhovchenko N.S.</b>        | 157                               |
| <b>Kupryashina M.A.</b>    | 142   |                                  |                                   |
| <b>Kuptsov V.N.</b>        | 143, 224  | <b>Makarkina M.V.</b>            | 158, 159                          |
| <b>Kuragina N.S.</b>       | 144   | <b>Maksimov I.V.</b>             | 17, 18, 52, 160, 216,<br>222, 268 |
| <b>Kurbanniyazov Sh.K.</b> | 134   | <b>Malafeeva K.A.</b>            | 105                               |
| <b>Kurchak O.N.</b>        | 14, 119, 187, 200                                     | <b>Maleva M.G.</b>               | 277                               |
| <b>Kuryntseva P.A.</b>     | 81, 145   | <b>Mamchenkova P.V.</b>          | 260                               |
| <b>Kusakin P.G.</b>        | 146, 289  | <b>Mamontova T.</b>              | 7                                 |
| <b>Kuvshinova N.M.</b>     | 241   | <b>Mandrik-Litvinkovich M.N.</b> | 143, 161, 188, 224                |
| <b>Kuzina E.V.</b>         | 33, 205   | <b>Mardanova A.M.</b>            | 13, 156                           |
| <b>Kuznetsov M.A.</b>      | 147   | <b>Markova O.V.</b>              | 83, 162                           |
| <b>Kuznetsova I.G.</b>     | 99, 119   | <b>Markova Yu.A.</b>             | 40, 163                           |
| <b>Kuznetsova V.A.</b>     | 148   | <b>Maslikova T.I.</b>            | 238                               |
|                            |   | <b>Maslova N.B.</b>              | 155                               |
| <b>Lagonenko A.L.</b>      | 42, 123, 194  | <b>Matniyazov R.T.</b>           | 37                                |
| <b>Lapina I.M.</b>         | 29  | <b>Martynenko E.V.</b>           | 27                                |
| <b>Lapteva E.M.</b>        | 201   | <b>Martynenko V.V.</b>           | 164                               |
| <b>Larionova O.S.</b>      | 97  | <b>Matveeva T.V.</b>             | 116, 165, 281                     |
| <b>Lastochkina O.V.</b>    | 22, 83, 84, 104, 149                                  | <b>Mazilov S.I.</b>              | 55, 68, 174                       |
| <b>Lazukin A.A.</b>        | 118   | <b>Mazurek B.G.</b>              | 166                               |
| <b>Leppyanen I.V.</b>      | 48, 289   | <b>Melnichuk T.N.</b>            | 5, 63, 109, 167, 281              |
| <b>Letarov A.V.</b>        | 42  | <b>Mikhaylova E.V.</b>           | 168, 169, 190, 237                |
| <b>Levchuk A.A.</b>        | 163   | <b>Mikhaylova Yu.V.</b>          | 134, 284                          |
| <b>Liss A.A.</b>           | 95  | <b>Mikhailouskaya N.A.</b>       | 170                               |
| <b>Litvinenko L.V.</b>     | 248   | <b>Mikhnyuk A.V.</b>             | 275                               |
| <b>Lobakova E. S.</b>      | 136   | <b>Mikityuk O.D.</b>             | 65, 234                           |
| <b>Lobanov A.N.</b>        | 150   | <b>Mikov D.S.</b>                | 57, 58                            |
| <b>Lobanova L.P.</b>       | 151   | <b>Mikshina P.</b>               | 92                                |
| <b>Lobodina E.V.</b>       | 152   | <b>Milman P.Yu.</b>              | 86                                |
| <b>Loginov O.N.</b>        | 33  | <b>Minaeva O.M.</b>              | 171, 274, 292                     |
| <b>Loshkareva T.V.</b>     | 90  | <b>Mindubaev A.Z.</b>            | 172                               |

|                            |                        |                         |                        |
|----------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| <b>Minnebaev L.F.</b>      | 218                    | <b>Panin V.M.</b>       | 64                     |
| <b>Mishko A.E.</b>         | 240                    | <b>Panova G.G.</b>      | 139                    |
| <b>Moiseeva E.V.</b>       | 113, 173               | <b>Parfirova O.I.</b>   | 92, 192, 195           |
| <b>Moiseeva E.M.</b>       | 54, 101, 174, 276      | <b>Pas' A.N.</b>        | 60                     |
| <b>Moiseeva O.E.</b>       | 156                    | <b>Paturemski D.S.</b>  | 229                    |
| <b>Mokeev D.I.</b>         | 115                    | <b>Pavlenko O.S.</b>    | 193                    |
| <b>Mukhamatdinova E.A.</b> | 175                    | <b>Pavlova A.G.</b>     | 255                    |
| <b>Mukminov D.R.</b>       | 218                    | <b>Pavlova M.D.</b>     | 259                    |
| <b>Muntyan A.N.</b>        | 176                    | <b>Pavlova O.A.</b>     | 48, 289                |
| <b>Muntyan V.S.</b>        | 176, 273               | <b>Perfileva A.I.</b>   | 255                    |
| <b>Muratova A.A.</b>       | 177, 264               | <b>Perminova E.M.</b>   | 201                    |
| <b>Muratova A.Yu.</b>      | 70, 133, 178, 189      | <b>Pesotskaya K.Yu.</b> | 194                    |
| <b>Musin Kh.G.</b>         | 31, 141, 168, 190      | <b>Pestov A.V.</b>      | 117, 249               |
| <b>Mustafaev O.N.</b>      | 107, 212               | <b>Petrova L.P.</b>     | 115                    |
| <b>Mustafina A.N.</b>      | 169                    | <b>Petrova O.E.</b>     | 92, 192, 195           |
| <b>Myagkov D.A.</b>        | 157                    | <b>Petrukhina D.I.</b>  | 196                    |
|                            |                        | <b>Petyurenko M.Yu.</b> | 43                     |
| <b>Nazarenko N.N.</b>      | 179                    | <b>Pilipchuk T.A.</b>   | 188, 197               |
| <b>Nazarova T.A.</b>       | 234                    | <b>Pinaev A.G.</b>      | 119                    |
| <b>Nazarova Ya.I.</b>      | 180, 223               | <b>Pivovarova N.S.</b>  | 198                    |
| <b>Nechaeva M.V.</b>       | 282                    | <b>Podboronova A.G.</b> | 198                    |
| <b>Neshumaeva N.A.</b>     | 153, 182               | <b>Polukhin N.I.</b>    | 51                     |
| <b>Nikitina V.E.</b>       | 19, 142, 270           | <b>Polyudova T.V.</b>   | 150                    |
| <b>Nikolaichik Y.A.</b>    | 61, 124, 183, 226, 278 | <b>Popov F.A.</b>       | 252                    |
| <b>Nikonorov Yu.M.</b>     | 168                    | <b>Popova E.V.</b>      | 184                    |
| <b>Nizhnikov A.A.</b>      | 184                    | <b>Povydysh M.N.</b>    | 7                      |
| <b>Novikova I.I.</b>       | 185                    | <b>Pozdnyakova N.N.</b> | 67                     |
| <b>Nurzanova A.A.</b>      | 178                    | <b>Pribylov D.A.</b>    | 157                    |
| <b>Nuzhnaya T.V.</b>       | 186, 209, 269          | <b>Prikhodko A.</b>     | 109                    |
|                            |                        | <b>Pristipa K.V.</b>    | 199                    |
| <b>Obluchinskaya E.D.</b>  | 29                     | <b>Provorov N. A.</b>   | 14, 112, 119, 187, 200 |
| <b>Ol'hovsky E.V.</b>      | 191                    | <b>Pudova D.S.</b>      | 13, 156                |
| <b>Onishchuk O.P.</b>      | 14, 119, 187, 200      | <b>Puhalsky Y.V.</b>    | 191, 201               |
| <b>Orina A.S.</b>          | 78                     | <b>Pusenkova L.I.</b>   | 83, 149                |
| <b>Orlovskaya P.I.</b>     | 161, 188               | <b>Puzanova E.V.</b>    | 202                    |
| <b>Ostrikova M.Ya.</b>     | 128                    | <b>Puzanskiy R.K.</b>   | 227                    |
|                            |                        | <b>Puzyrev I.S.</b>     | 249                    |
| <b>Panchenko L.V.</b>      | 189                    | <b>Pyatibratov M.G.</b> | 203, 221               |
| <b>Panfilova M.A.</b>      | 190                    | <b>Pylaev T.E.</b>      | 142                    |
| <b>Panfyorova T.V.</b>     | 191                    |                         |                        |

|                             |                        |                            |                                   |
|-----------------------------|------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| <b>Radchenko A.</b>         | 167                    | <b>Sergeeva J.P.</b>       | 195                               |
| <b>Radchenko L.</b>         | 167                    | <b>Serova T.A.</b>         | 146, 289                          |
| <b>Rafikova G.F.</b>        | 33, 205                | <b>Shagimardanova E.I.</b> | 133                               |
| <b>Raizer O.B.</b>          | 204                    | <b>Shakhnazarova V.Yu.</b> | 219, 220, 242                     |
| <b>Rameev T.V.</b>          | 73, 246                | <b>Shaposhnikov A.I.</b>   | 39, 219, 220, 242                 |
| <b>Rebrov A.N.</b>          | 240                    | <b>Shavarda A.L.</b>       | 227, 233                          |
| <b>Rodionov A.V.</b>        | 134, 284               | <b>Shavela Yu.V.</b>       | 264                               |
| <b>Rogozin E.</b>           | 206                    | <b>Shavishvili I.Z.</b>    | 23, 96                            |
| <b>Romanovskova A.D.</b>    | 144                    | <b>Shcherbakova L.A.</b>   | 65, 234                           |
| <b>Romanyuk D.A.</b>        | 7, 138, 289            | <b>Shchevchuk T.V.</b>     | 77                                |
| <b>Roumiantseva M.L.</b>    | 176, 273               | <b>Shchyogolev S.Yu.</b>   | 203, 221                          |
| <b>Rubtsov N.B.</b>         | 207                    | <b>Shebitchenko T.S.</b>   | 198                               |
| <b>Rudaya E.S.</b>          | 208                    | <b>Shein M.Yu.</b>         | 160, 168, 222                     |
| <b>Rumyantsev S.D.</b>      | 17, 186, 209, 268, 269 | <b>Shematorova E.K.</b>    | 225                               |
| <b>Rupasova Zh.A.</b>       | 20                     | <b>Shirma A.V.</b>         | 135                               |
| <b>Rybaltovskaya P.V.</b>   | 24                     | <b>Shirokikh I.G.</b>      | 180, 223                          |
| <b>Rybina E.A.</b>          | 117                    | <b>Shishova M.F.</b>       | 134, 227, 284                     |
| <b>Rysbek A.B.</b>          | 30, 164                | <b>Shmyga E.Yu.</b>        | 224                               |
|                             |                        | <b>Shpakovski D.G.</b>     | 225                               |
|                             |                        | <b>Shpakovski G.V.</b>     | 225                               |
| <b>Sabutova A.B.</b>        | 210                    | <b>Shrub K.V.</b>          | 226                               |
| <b>Sadigova E.E.,</b>       | 211                    | <b>Shtark O.Y.</b>         | 7, 93, 122, 138, 227,<br>289, 291 |
| <b>Sadovskaya N.S.</b>      | 193, 212               | <b>Shvets D.Yu.</b>        | 228                               |
| <b>Safronava H.V.</b>       | 213                    | <b>Sidarenka A.V.</b>      | 224, 229                          |
| <b>Safronova V.I.</b>       | 39, 70, 99, 119        | <b>Sidorenko M.L.</b>      | 41                                |
| <b>Saksaganskaya A.S.</b>   | 273                    | <b>Sidorova T.M.</b>       | 129, 230                          |
| <b>Salimova D.R.</b>        | 214                    | <b>Sigida E.N.</b>         | 70, 127, 266                      |
| <b>Samkov A.A.</b>          | 118, 131, 173          | <b>Simakov V.V.</b>        | 114                               |
| <b>Samsonova E.A.</b>       | 215                    | <b>Simarov B.V.</b>        | 176, 273                          |
| <b>Sarsenova S.Kh.</b>      | 64                     | <b>Sinz A.</b>             | 7                                 |
| <b>Sarvarova E.R.</b>       | 17, 18, 216            | <b>Sirotin A.A.</b>        | 157                               |
| <b>Sazanova A.L.</b>        | 39, 99, 119            | <b>Skugoreva S.G.</b>      | 74, 231                           |
| <b>Scherbakov A.A.</b>      | 147                    | <b>Slovokhotov I.Yu.</b>   | 225                               |
| <b>Sekste E.A.</b>          | 39                     | <b>Smirnov A.V.</b>        | 97, 114                           |
| <b>Seldimirova O.A.</b>     | 132, 217               | <b>Smolobochkin A.V.</b>   | 192                               |
| <b>Selivanovskaya S.Yu.</b> | 81, 145                | <b>Soboleva A.</b>         | 7                                 |
| <b>Seliverstova E.V.</b>    | 258                    | <b>Sokolov A.O.</b>        | 232                               |
| <b>Semenchukova E.A.</b>    | 66                     | <b>Sokolov A.Ye.</b>       | 290                               |
| <b>Senderskiy I.</b>        | 126                    | <b>Sokolov O.I.</b>        | 232                               |
| <b>Senchenkov V.Yu.</b>     | 157                    | <b>Sokornova S.V.</b>      | 165, 233                          |

|                           |                                   |                                   |                                |
|---------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| <b>Solovchenko A.E.</b>   | 136, 286                          | <b>Tomilova S.V.</b>              | 250                            |
| <b>Solyanikova I.P.</b>   | 157                               | <b>Tosunov Ya.K.</b>              | 35                             |
| <b>Sorokan A.V.</b>       | 256                               | <b>Tovstik E.V.</b>               | 251                            |
| <b>Sorokina A.I.</b>      | 279                               | <b>Tretyakova M.S.</b>            | 40, 163                        |
| <b>Sotnikova Yu.M.</b>    | 69                                | <b>Trigubovich A.M.</b>           | 252                            |
| <b>Spivak S.G.</b>        | 225                               | <b>Trifonova N.A.</b>             | 71, 253                        |
| <b>Starchikov A.A.</b>    | 94                                | <b>Tripti</b>                     | 277                            |
| <b>Statsyuk N.V.</b>      | 234                               | <b>Tropynina T.S.</b>             | 235                            |
| <b>Strelnikova S.R.</b>   | 125                               | <b>Tsarev A.A.</b>                | 126, 247                       |
| <b>Strunnikova O.K.</b>   | 219, 220                          | <b>Tsers I.</b>                   | 92, 254                        |
| <b>Stupak E.E.</b>        | 235                               | <b>Tsivileva O.M.</b>             | 46, 255                        |
| <b>Stupko V.Yu.</b>       | 153, 236                          | <b>Tsvetkov V.O.</b>              | 256                            |
| <b>Shelud'ko AV.</b>      | 115, 282                          | <b>Tsvigun N.V.</b>               | 290                            |
| <b>Suhorukova A.V.</b>    | 107, 261                          | <b>Tsyganov V.E.</b>              | 91, 146, 257, 258, 289         |
| <b>Sukhareva A.S.</b>     | 237                               | <b>Tsyganova A.V.</b>             | 91, 258, 289                   |
| <b>Sulima A.S.</b>        | 7, 238, 289                       | <b>Tsygichko A.A.</b>             | 259                            |
| <b>Sultangazin Z.R.</b>   | 246                               | <b>Tugarova A.V.</b>              | 110, 260, 272                  |
| <b>Sundyreva M.A.</b>     | 239, 240                          | <b>Turin E.E.</b>                 | 6                              |
| <b>Sviridov A.V.</b>      | 224                               | <b>Turkovskaya O.V.</b>           | 133, 178, 189                  |
| <b>Svistova I.D.</b>      | 179, 241                          | <b>Tyurin A.A.</b>                | 89, 212, 261                   |
| <b>Syrova D.S.</b>        | 39, 219, 220, 242                 |                                   |                                |
| <b>Syutkin A.S.</b>       | 203                               | <b>Ulyanov A.V.</b>               | 68                             |
|                           |                                   | <b>Umarov B.R.</b>                | 262                            |
| <b>Tabalenkova G.N.</b>   | 243                               | <b>Uryadova G. T.</b>             | 75, 263                        |
| <b>Taipova R.M.</b>       | 244                               | <b>Ustimenko A.A.</b>             | 286                            |
| <b>Tarasova N.B.</b>      | 192                               |                                   |                                |
| <b>Tchebotarev L.</b>     | 245                               | <b>Valentovich L.N.</b>           | 66, 177, 197, 22, 245, 264     |
| <b>Telesheva E.M.</b>     | 115                               | <b>Vafina G.Kh.</b>               | 235                            |
| <b>Tereshchenko N.N.</b>  | 171, 292                          | <b>Vasileva E.N.</b>              | 9, 265, 289                    |
| <b>Tereshonkova T.A.,</b> | 225                               | <b>Vasilieva S.G.</b>             | 136, 286                       |
| <b>Tikhonovich I.A.</b>   | 7, 9, 99, 122, 138, 227, 265, 289 | <b>Velichko N.S.</b>              | 266                            |
| <b>Timergalin M.D.</b>    | 73, 246                           | <b>Vershinina Z.R.</b>            | 37, 54, 267                    |
| <b>Timina M.A.</b>        | 182                               | <b>Veselov D.S.</b>               | 27, 33, 137, 217               |
| <b>Timofeev S.A.</b>      | 126, 247                          | <b>Veselova S.V.</b>              | 17, 18, 52, 186, 209, 268, 269 |
| <b>Tishchenko A.V.</b>    | 248                               | <b>Vetchinkina E.P.</b>           | 270                            |
| <b>Titok M.A.</b>         | 229                               | <b>Vinogradova S.V.</b>           | 113                            |
| <b>Tkachenko O.V.</b>     | 67, 94                            | <b>Vinogradova Yu.A.</b>          | 201                            |
| <b>Tobysheva P.D.</b>     | 117, 249                          | <b>Vishnevskaya N.A.</b>          | 219, 220                       |
| <b>Tokmakov S.V.</b>      | 158, 159                          | <b>Vladimirova A.A. (Saratov)</b> | 272                            |

|                               |                        |                          |  |
|-------------------------------|------------------------|--------------------------|--|
| <b>Vladimirova A.A. (Ufa)</b> | 38, 271                | <b>Zaikina E.A.</b>      | 82, 140, 285                                   |
| <b>Vladimirova M.E.</b>       | 273                    | <b>Zaitsev B.D.</b>      | 23, 96, 97                                     |
| <b>Vlasova A.I.</b>           | 274                    | <b>Zakharchenko N.S.</b> | 77   |
| <b>Voitka D.V.</b>            | 170, 275               | <b>Zaplatkin A. N.</b>   | 51   |
| <b>Volchenko N.N.</b>         | 118, 131, 173          | <b>Zaripova D.L.</b>     | 156  |
| <b>Volchkevich I.G.</b>       | 252                    | <b>Zaytsev P.A.</b>      | 136, 286                                       |
| <b>Volkov D.P.</b>            | 101                    | <b>Zaytsev S.A.</b>      | 101, 287                                       |
| <b>Vologin S.G.</b>           | 13                     | <b>Zelenskaya A.A.</b>   | 58   |
| <b>Volokhanovich A.A.</b>     | 143                    | <b>Zhebrak I.S.</b>      | 166  |
| <b>Volokhina I.V.</b>         | 55, 100, 101, 174, 276 | <b>Zheleznyakov S.V.</b> | 288  |
| <b>Voloshina A.D.</b>         | 46                     | <b>Zhernakov A.I.</b>    | 122, 289                                       |
| <b>Vorob'ev V.</b>            | 92                     | <b>Zhilin S.V.</b>       | 293  |
| <b>Vorobyov N.I.</b>          | 191                    | <b>Zhukov V.A.</b>       | 7, 9, 93, 122, 138, 227,<br>238, 265, 289, 291 |
| <b>Voropaeva O.V.</b>         | 277                    | <b>Zhuravlev V.S.</b>    | 126, 247                                       |
| <b>Vychyk P.V.</b>            | 278                    | <b>Zhurbenko P.M.</b>    | 134  |
| <b>Vysotskaya L.B.</b>        | 33, 137                | <b>Zhurishkina E.V.</b>  | 29, 290  |
|                               |                        | <b>Zinchenko A.S.</b>    | 58   |
| <b>Yakimenko M.V.</b>         | 279                    | <b>Zobova N.V.</b>       | 153, 236                                       |
| <b>Yakovlev A.P.</b>          | 20                     | <b>Zorin E.A.</b>        | 93, 138, 291                                   |
| <b>Yakuba G.V.</b>            | 280                    | <b>Zubanova Yu.S.</b>    | 57, 58   |
| <b>Yakubov V.</b>             | 99                     | <b>Zuk E.A.</b>          | 101  |
| <b>Yakubovskaya A.I.</b>      | 109, 191, 281          | <b>Zyubanova T.I.</b>    | 171, 292                                       |
| <b>Yarullina L.G.</b>         | 256                    |                          |  |
| <b>Yemelyanov V.V.</b>        | 227                    |                          |  |
| <b>Yevstigneyeva S.S.</b>     | 115, 282               |                          |  |
| <b>Yukhnevich G.G.</b>        | 283                    |                          |  |
| <b>Yurchenko E.G.</b>         | 113                    |                          |  |
| <b>Yurkov A.P.</b>            | 134, 284               |                          |  |
| <b>Yuzefovich E.K.</b>        | 275                    |                          |  |
| <b>Yuzikhin O.S.</b>          | 39                     |                          |  |

## Content

|   |    |
|---|----|
| <b>Abdurashytov S.F., Melnichuk T.N., Chirak E.R., Egovtseva A.Y., Abdurashytova E.R., Andronov E.E.</b> Associative growth-stimulating strains of bacteria and their whole genome sequencing.....  | 5  |
| <b>Abdurashytova E.R., Abdurashytov S. F., Turin E. E.</b> Influence of biopreparations on the content of proline and chlorophyll <i>Sorghum bicolor</i> L. in Steppe conditions.....   | 6  |
| <b>Afonin A.M., Mamontova T., Soboleva A., Lukasheva E., Sulima A.S., Shtark O.Y., Kulaeva O., Gribchenko E., Romanyuk D., Akhtemova G.A., Povydysh M.N., Sinz A., Frolov A., Zhukov V.A., Tikhonovich I.A.</b> The seed proteome of pea ( <i>Pisum sativum</i> L.) lines different in their response to beneficial microorganisms highlights the different strategies for seed production in plants..... | 7  |
| <b>Aipova P., Abdykadyrova A.Zh., Kurmanbayev A.A.</b> Evaluation of the effectiveness of integrated biofertilizer in the cultivation of spring wheat in Northern Kazakhstan.....   | 8  |
| <b>Akhtemova G.A., Vasileva E.N., Afonin A.M., Zhukov V.A., Tikhonovich I.A.</b> Culturable endophytic bacteria from garden pea ( <i>Pisum sativum</i> L.).....   | 9  |
| <b>Akhtyamova G.A., Chikov V.I.</b> The number of microbes–symbionts directly depends on the development power of the root system of the plant.....   | 10 |
| <b>Akhtyamova Z.A.</b> Comparison of the reaction of barley plants to treatment with microorganisms producing auxins and cytokinins....   | 11 |
| <b>Akimova E.S., Koryakov I. S., Baymiev An.Kh.</b> The strategy for choosing nodule bacteria by perennial leguminous plants, depending on the stage of their vegetation.....   | 12 |
| <b>Akosah Y.A., Pudova D.S., Vologin S.G., Mardanova A.M.</b> The influence of growth stage on the structure and formation of fungal microbiota in potato root.....   | 13 |
| <b>Aksenova T.S., Onishchuk O.P., Kurchak O.N., Andronov E.E., Provorov N.A.</b> Study of the genetic organization of the strain <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> forming a symbiosis with clover <i>Trifolium ambiguum</i> .....   | 14 |
| <b>Alatortseva T. A.</b> <i>Petchoa</i> <i>in vitro</i> culture.....  | 15 |
| <b>Aldosari M.D., Ksenofontova O.Y.</b> Characteristics of epiphytic microorganisms of wheat plants antagonists of phytopathogenic fungi.....   | 16 |
| <b>Alekseev V.Yu., Veselova S.V., Blagova D.K., Sarvarova E.R., Burkhanova G.F., Rumyantsev S.D., Kasimova A.R., Maksimov I.V.</b> Recombinant <i>Bacillus subtilis</i> strain deficient in production of surfactin loses ability to induce resistance of wheat plants against aphid <i>Schizaphis graminum</i> (Rond.).....  | 17 |
| <b>Alekseev V.Yu., Veselova S.V., Sarvarova E.R., Maksimov I.V.</b> Growth-promoting activity of endophytic bacteria of the genus <i>Bacillus</i> .....   | 18 |
| <b>Alen'kina S.A., Nikitina V.E.</b> Influence of <i>Azospirillum</i> lectins on a stress-dependent change in the content of low-molecular antioxidants in plants.....  | 19 |
| <b>Aleschenkova Z.M., Rupasova Zh.A., Yakovlev A.P., Kartyzhova L.E., Antohina S.P.</b> Application of microbial preparations and plants of genus <i>Vaccinium</i> for peat-hag recovery.....   | 20 |
| <b>Ali B.</b> Auxin production and agronomic significance of halotolerant bacterial communities associated with <i>Suaeda fruticosa</i> (L.).....   | 21 |
| <b>Allagulova Ch.R., Avalbaev A.M., Lastochkina O.V.</b> Pathways of wheat drought stress tolerance improvement under the influence of endophytic bacteria <i>Bacillus subtilis</i> .....   | 22 |
| <b>Alsowaidi A.K.M., Guliy O.I., Zaitsev B.D., Karavaeva O.A., Khomyakova A.A., Shavishvili I.Z., Ksenofontova O.Yu., Borodina I.A.</b> Detection of bacteria in water by an acoustic slot-mode sensor.....   | 23 |
| <b>Ananyeva I.N., Aleschenkova Z.M., Rybaltovskaya P.V., Chindareva M.A.</b> Study of the population dynamics of endophytic bacteria introduced into winter wheat.....  | 24 |
| <b>Antsiferov D.V., Lukjanova E.A., Ivashenko D.A.</b> Blue honeysuckle introduction to <i>in vitro</i> culture.....  | 25 |
| <b>Apanasova N.V.</b> Selection of genetically marked maize lines for the ability to parthenogenesis.....   | 26 |
| <b>Arhipova T.N., Martynenko E.V., Kuzmina L.Yu., Veselov D.S.</b> Comparison of the influence bacteria producing either auxin or cytokinin on growth and water relation of wheat plants under salinity.....  | 27 |
| <b>Atakishiyeva Y.Y.</b> Fungi of <i>Aspergillus</i> genus in oil contaminated soils of Azerbaijan.....   | 28 |
| <b>Ayrapetyan O.N., Zhurishkina E.V., Obluchinskaya E.D., Kulminskaya A.A., Lapina I.M.</b> Study of the antibacterial properties of sulfated polysaccharides from brown algae <i>Fucus vesiculosus</i> .....   | 29 |
| <b>Baigonusova J.A., Rysbek A.B., Kurmanbaev A.A.</b> Creation of a collection of microorganisms – destructors of organic substances that are promising for bioremediation of technogenic disturbed lands in Kazakhstan.....  | 30 |
| <b>Baimukhametova E.A., Musin K.G., Kuluev B.R.</b> Induction of somatic embryogenesis in different cotton cultivars and lines.....   | 31 |
| <b>Bakaeva M.D., Chetverikov S.P., Chetverikova D.V., Kendzhieva A.A.</b> Promising microorganisms for coping herbicide stress in plants.....   | 32 |
| <b>Bakaeva M.D., Vysotskaya L.B., Arhipova T.N., Kuzina E.V., Chetverikov S.P., Rafikova G.F., Korshunova T.Y., Loginov O.N., Veselov D.S., Kudoyarova G.R.</b> The influence of plant growth stimulating bacteria on phytoremediation of oil-contaminated soils.....   | 33 |
| <b>Baranskaya M.I., Chaikovskaya L.A.</b> Bacteria <i>Lelliottia nimipressuralis</i> CCM 32-3 – the producer of organic acids.....  | 34 |
| <b>Barchukova A.Ya., Chernysheva N.V., Tosunov Ya.K.</b> Influence of the microbiological preparation Atuva + Premax on the formation of soy nodule bacteria.....   | 35 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Baubekova D.G.</b> The effect of the biological product on the productivity of plants of the <i>Solanaceae</i> .....  | 36 |
| <b>Baymiev Al.Kh., Vershinina Z.R., Chubukova O.V., Matniyazov R.T., Baymiev An.Kh.</b> Artificial symbioses of plants and microorganisms.....   | 37 |
| <b>Baymiev An.Kh., Vladimirova A.A., Akimova E.S., Koryakov I.S., Baymiev Al.Kh.</b> High activity of horizontal gene transfer in nodule bacteria as a strategy for interaction with legumes.....  | 38 |
| <b>Belimov A.A., Shaposhnikov A.I., Syrova D.S., Guro P.V., Yuzikhin O.S., Azarova T.S., Sazanova A.L., Gladkov G.V., Sekste E.A., Safronova V.I.</b> Response of plants and nitrogen-fixing symbiosis to the toxicity of cadmium and mercury using the pea mutant SGECDt..... | 39 |
| <b>Belovezovets L.A., Tretyakova M.S., Markova Yu.A.</b> An integrated approach to design of new biotechnological products to reduce man-induced load on environment.....  | 40 |
| <b>Berezhnaya V.V., Klykov A.G, Sidorenko M.L., Bykovskaya A.N.</b> The effectiveness of the use of strains of soil microorganisms in the cultivation of spring wheat in the Primorsky Krai.....   | 41 |
| <b>Besarab N.V., Golomidova A.K., Kulikov E.E., Letarov A.V., Lagonenko A.L., Evtushenkov A.N.</b> Characterization of <i>Erwinia amylovora</i> bacteriophages isolated in Belarus.....  | 42 |
| <b>Bezler N.V., Petyurenko M.Yu.</b> Bacteria of <i>Pseudomonas</i> genus in sugar beet agroecosis.....  | 43 |
| <b>Bhushan Indu</b> Efficient media for high production of microbial lipase from <i>Bacillus subtilis</i> (BSK-L) using response surface methodology for enantiopure synthesis of drug molecules.....  | 44 |
| <b>Bogatyeva N.V.</b> Genetically transformed plants growing in Russia: bans and punishments.....  | 45 |
| <b>Bogdanov A.V., Tsivileva O.M., Gil'fanova A.R., Voloshina A.D., Bukharov S.V.</b> Synthesis and anti-phytopathogenic activity of some water-soluble isatin hydrazones.....  | 46 |
| <b>Bondarchuk E.Yu., Asaturova A.M.</b> Screening of promising bacterial strains against pests of <i>Lepidoptera</i> .....   | 47 |
| <b>Bovin A.D., Pavlova O.A., Kustova D.V., Leppyanen I.V., Dolgikh E.A.</b> The role of heterotrimeric G proteins in the control of the development of symbiosis of leguminous plants with nodule bacteria.....  | 48 |
| <b>Boyko E.V., Golovatskaya I.F.</b> The effect of melatonin and IAA on the growth of <i>Arabidopsis thaliana</i> cotyledons seedlings in different spectral composition of the light.....   | 49 |
| <b>Bukharina I.L., Islamova N.A.</b> Effect of inoculation of the plant root system by the endophyte <i>Cylindrocarpon magnusianum</i> on plant performance when exposed to heavy metal salts.....   | 50 |
| <b>Chebotar V. K., Zaplatkin A. N., Komarova O. V., Baganova M. E, Polukhin N. I., Balakina S. V.</b> Microbial preparations on the basis of endophytic bacteria for nutrition and protection of potatoes from diseases.....   | 51 |
| <b>Cherepanova E.A., Veselova S.V., Alekseev V.U., Maksimov I.V.</b> Detection of strains of endophytic bacteria of the genus <i>Bacillus</i> with the most pronounced growth-stimulating and protective properties.....   | 52 |
| <b>Chikov V.I., Akhtyamova A.G., Khamidullina L.A.</b> Activation of the symbiosis of free nitrogen-fixing bacteria with plants by an additional influx of photosynthesis products to the roots.....   | 53 |
| <b>Chubukova O.V, Vershinina Z.R, Matniyazov R.T., Baymiev Al. Kh.</b> Using nod genes control system to create rhizospheric microorganisms with regulated gene expression.....  | 54 |
| <b>Chumakov M. I., Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Mazilov S.I., Fadeev V.V., Gutorova O.V., Kolesova A.Yu., Moiseeva E.M.</b> Studying of fertilization-independent embryo- and endospermogenesis in maize embryo sacs.....  | 55 |
| <b>Danilova E.D., Kolomeychuk L.V., Efimova M.V.</b> Influence of chloride salinity on primary photosynthetic processes in potato leaves.....  | 56 |
| <b>Davoyan E.R., Davoyan R.O., Zubanova Y.S., Mikov D.S., Boldakov D.M.</b> Study of common wheat lines with genetic material <i>Aegilops speltoides</i> for leaf rust resistance.....   | 57 |
| <b>Davoyan R.O., Zinchenko A.S., Davoyan E.R., Bebyakina I.V., Mikov D.S., Zubanova Yu.S., Boldakov D.M., Basov V.I., Zelenskaya A.A.</b> Use of haploid technologies in breeding of common wheat of national center of grain named after P.P. Lukyanenko.....                 | 58 |
| <b>Demchenko K.N., Kiryushkin A.S., Ilna E.L., Guseva E.D.</b> Developmental programs for lateral root and symbiotic nodule organogenesis: evolution of similarities and differences.....  | 59 |
| <b>Didovich S.V., Pas' A.N., Alekseenko O.P.</b> Search of phyto-toxicity microorganisms for weeds.....  | 60 |
| <b>Diubo Yu., Nikolaichik Ye.</b> <i>Pectobacterium atrosepticum</i> plasmid pPA21A is an important determinant of plant-bacterium pathosystem development.....  | 61 |
| <b>Dolgikh A.V., Dolgikh E.A.</b> The role of homedomain-containing transcription factors in the control of organogenesis of nitrogen fixing nodules.....  | 62 |
| <b>Egovtseva A.Yu., Melnichuk T.N., Abdurashitov S.F.</b> The influence of farming systems and microbial preparations on the structure of the microbocenosis of the rhizosphere of <i>Triticum aestivum</i> L.....   | 63 |
| <b>Elkonin L.A., Panin V.M., Kenzhegulov O.A., Sarsenova S.Kh.</b> RNAi-mutants of <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench with improved digestibility of kafirins.....   | 64 |
| <b>Erokhin D.V., Mikityuk O.D., Shcherbakova L.A., Dzhavakhiya V.G.</b> Inhibition of the biosynthesis of polyketide mycotoxins by microbial metabolites.....  | 65 |
| <b>Evdokimova O.V., Semenchukova E.A., Valentovich L.N.</b> Genomic analysis of <i>Bacillus pumilus</i> phytopathogenic strain 11-1-1....  | 66 |



|   |    |
|---|----|
| <b>Evseeva N.V., Denisova A.Yu., Burygin G.L., Pozdnyakova N.N., Tkachenko O.V.</b> Coinoculation effect of potato microclones by rhizosphere bacteria under osmotic stress <i>in vitro</i> .....   | 67 |
| <b>Fadeev V.V., Mazilov S.I., Ulyanov A.V., Gusev Yu.S., Chumakov M.I.</b> Agrobacterial transformation of maize by <i>in planta</i> and <i>in vitro</i> methods: problems and decisions.....   | 68 |
| <b>Farkhudinov R.G., Grigoriadi A.S., Sotnikova Yu.M.</b> The effect of oil pollution on the activity of physiological and biochemical processes in <i>Triticum aestivum</i> L. and the number of rhizospheric microbiota.....  | 69 |
| <b>Fedonenko Y.P., Ibrahim I.M., Sigida E.N., Safronova V.I., Kokoulin M.S., Muratova A.Y., Konnova S.A.</b> Bioremediation potential of a halophilic bacterium <i>Chromohalobacter salexigens</i> EG1QL3: exopolysaccharide production, crude oil degradation, and heavy metal tolerance.....  | 70 |
| <b>Fedorova E.E., Trifonova N.A.</b> Ion transporters in the root nodule of <i>Medicago truncatula</i> : potassium transporters.....  | 71 |
| <b>Fedorova O.A., Bezler N.V.</b> Influence of bacteria of the genus <i>Azospirillum</i> on sugar beet productivity.....  | 72 |
| <b>Feoktistova A.V., Timergalin M.D., Rameev T.V., Chetverikov S.P.</b> The role of auxin-producing bacteria in the formation of a growth response in wheat plants under herbicidal stress.....   | 73 |
| <b>Fokina A.I., Domracheva L.I., Kovina A.L., Skugoreva S.G.</b> The development of cyanobacteria and fungi of the genus <i>Fusarium</i> in mono- and polycultures.....   | 74 |
| <b>Fokina N. A., Uryadova G. T., Karpunina L. V.</b> Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: applied aspects.....   | 75 |
| <b>Frank Y.A., Antsiferov D.V., Glukhova L.B., Ivashenko D.A., Ivashenko D.A.</b> Industrial cultivation of entomopathogenic fungus <i>Beauveria bassiana</i> strain Dar.....   | 76 |
| <b>Furs O.V., Zakharchenko N.S., Dyachenko O.V., Buryanov Ya.I., Shchevchuk T.V.</b> Physiological properties of extracts from plants subjected to cold stress.....   | 77 |
| <b>Gagkaeva T.Yu., Gavrilova O.P., Orina A.S., Burkin A.A., Khusaynov Kh.A.</b> Microbiological quality of grain cultivated in the North Caucasus region.....   | 78 |
| <b>Gainullina K.P.</b> SSR analysis of pea ( <i>Pisum sativum</i> L.) cultivars and lines.....  | 79 |
| <b>Galdina T.E.</b> Application of biotechnology methods for mass propagation of garden plants.....   | 80 |
| <b>Galieva G.Sh., Galitskaya P. Yu., Selivanovskaya S.Yu., Kuryntseva, P.A.</b> Influence of chicken manure derived biochar on soil quality and wheat and barley growth.....  | 81 |
| <b>Galimova A.A., Zaikina E.A., Kuluev B.R.</b> SNP analysis of common wheat baking qualities.....  | 82 |
| <b>Garipova S.R., Markova O.V., Irgalina R.Sh., Garifullina D.V., Khairullin R.M., Lastochkina O.V., Pusenkova L.I.</b> The formation of productivity and stress resistance of leguminous plants in association with endophytic bacteria, which complemented the deficient properties of plant-host genotype.....   | 83 |
| <b>Garshina D., Ibragimov A., Lastochkina O.</b> Application of endophytic bacteria <i>Bacillus subtilis</i> in compositions with salicylic acid to improve wheat stress tolerance.....   | 84 |
| <b>Gerasimchuk A.L., Bukhtiyarova P.A., Antsiferov D.V., Ivashenko D.A.</b> Diversity and activity of cultivated lipophilic bacteria from fat-containing industrial wastes.....   | 85 |
| <b>Gilvanova E.A., Milman P.Yu.</b> Auxin and carotene biosynthesis by the bacterium <i>Pantoea agglomerans</i> .....   | 86 |
| <b>Gladkov E.A., Gladkova O.N.</b> The effect of copper on cadmium-tolerant lawn grass.....   | 87 |
| <b>Glukhova L.B., Kaposhko D.K., Frank Yu.A., Ivashenko D.A., Ivashenko D.A.</b> Optimization of <i>Trichoderma</i> spp. industrial cultivation.....  | 88 |
| <b>Goldenkova-Pavlova I.V., Mustafayev O., Deineko I.V., Tyurin A.A.</b> Fine translational control of mRNA: a complex web of mechanisms and its relevance for functional genomics and plant biotechnology.....   | 89 |
| <b>Golovatskaya I.F., Loshkareva T.V.</b> Cryptochrome-dependent <i>in vitro</i> seedling growth of <i>Melilotus albus</i> .....  | 90 |
| <b>Gorshkov A.P., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E.</b> Influence of the fungicide TMTD as a stress factor on the ultrastructure of pea ( <i>Pisum sativum</i> L.) symbiotic nodules.....   | 91 |
| <b>Gorshkov V., Parfirova O., Tsers I., Petrova O., Gogoleva N., Ageeva M., Islamov B., Vorob'ev V., Mikshina P., Gogolev Yu.</b> Novel determinants of plant-pectobacteria interaction: identification and characteristics.....  | 92 |
| <b>Gribchenko E.S., Afonin A.M., Kulaeva O.A., Zorin E.A., Stark O.Yu., Zhukov V.A.</b> The study of transcriptomes of symbiotic tissue of pea using the third-generation sequencing technology Oxford Nanopore.....  | 93 |
| <b>Grigorian M.A., Starchikov A.A., Tkachenko O.V., Burygin G.L., Evseeva N.V.</b> Varietal features of potato responses to <i>Azospirillum</i> and exogenous indole-3-acetic acid.....   | 94 |
| <b>Grigoryeva N.Yu., Liss A.A.</b> Prospects of fluorescence methods application for monitoring of cyanobacterial cultures in biotechnology.....  | 95 |
| <b>Guliy O.I., Zaitsev B.D., Karavaeva O.A., Alsowaidi A.K.M., Shavishvili I.Z., Borodina I.A.</b> Detection of bacteria in water by a slot-mode sensor in an acoustic delay line.....  | 96 |
| <b>Guliy O.I., Zaitsev B.D., Smirnov A.V., Karavaeva O.A., Alsowaidi A.K.M., Larionova O.S., Borodina M.A., Borodina I.A.</b> Analysis of the antibacterial activity of ampicillin by biological sensor based on a microwave resonator.....   | 97 |
| <b>Gumerova G., Chemeris A., Kuluev B.</b> Biolistic transformation of plants using CRISPR/Cas9 technology.....   | 98 |
| <b>Guro P., Safronova V., Sazanova A., Kuznetsova I., Belimov A., Yakubov V., Chirak E., Afonin A., Andronov E., Tikhonovich I.</b> Rhizobial microsymbionts of the narrowly endemic <i>Oxytropis</i> species growing in Kamchatka possess a set of genes that are associated with T3SS and T6SS secretion systems and can affect the development of symbiosis..... | 99 |

|  |     |
|--|-----|
| Gusev Yu.S., Volokhina I.V., Fadeev V.V., Chumakov M.I. Study of the agrobacterial protein VirE2 – ssDNA interaction under various conditions for delivery technology development.....   | 100 |
| Gusev Yu.S., Fadeev V.V., Volokhina I.V., Zaytsev S.A., Volkov D.P., Zuk E.A., Moiseeva. E.M., Chumakov M.I. The effect of the buffer zone on the maize pollen flow in mixed crops.....  | 101 |
| Gutorova O.V. Selection of maize with high haploinducing ability.....  | 102 |
| Gyrnets A.A., Asaturova A.M., Allakhverdyan V.V. Studying the effect of mineral nutrition on the antifungal activity of a strain of <i>Bacillus subtilis</i> , the producer of an experimental sample of a biological product.....   | 103 |
| Ibragimov A., Baymiev An., Lastochkina O. Development of fluorescent protein-marked strains of <i>Bacillus subtilis</i> .....  | 104 |
| Ibragimova S. A., Malafeeva K. A. Symbiosis of soil and rhizosphere bacteria.....  | 105 |
| Ilina E.L., Kiryushkin A.S., Guseva E.D., Demchenko K.N. Methodological approaches to agrobacterium-mediated transformation of buckwheat ( <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench).....  | 106 |
| Kabardaeva K.V., Mustafaev O.N., Dejneko I.V., Suhorukova A.V., Goldenkova-Pavlova I.V. Finding of regulatory codes in 5'-UTR of <i>A. thaliana</i> mRNAs by polysome profiling method.....  | 107 |
| Kalamiyets E.I. Plant biological control agents as the basis for remediation and stabilization of agrobiocenoses.....  | 108 |
| Kameneva I., Melnichuk T., Abdurashitov S., Andronov E., Yakubovskaya A., Gritchin M., Prikhodko A. The taxonomic composition of the microbial community of the southern chernozem when introducing plant substrates and their destructors.....  | 109 |
| Kamnev A.A., Tugarova A.V. Intracellular transformations in bacteria as a response to external factors: molecular spectroscopic characterization.....  | 110 |
| Karamova K., Danilova N., Galitskaya P. Biochar influence on antibiotic resistance genes abundance in the manure derived composts.....   | 111 |
| Karasev E.P., Andronov E.E., Chizevskaya E.P., Provorov N.A. Comparative analysis of nucleotide polymorphism of chromosomal and symbiotic genes in symbionts of eastern and medical goat's rue from a population of the North Caucasus.....  | 112 |
| Karasev S.G., Yurchenko E.G., Moiseeva E.V., Vinogradova S.V., Karaseva E.V. To the study of the diversity of endophytic microbiota of vines in the Western Ciscaucasia.....   | 113 |
| Karavaeva O.A., Guliy O.I., Simakov V.V., Alsowaidi A.K.M., Khomyakova A.A., Ksenofontova O.Yu., Smirnov A.V. Prospects the use of polystyrene films for the immobilization of bacteria.....   | 114 |
| Katsy E.I., Shelud'ko AV., Petrova L.P., Filip'echeva Y.A., Yevstigneyeva S.S., Telesheva E.M., Mokeev D.I. On the role of flagella in the adaptation of the PGPR <i>Azospirillum brasilense</i> to life on surfaces.....  | 115 |
| Khafizova G.V., Matveeva T.V. Design of an inducible rolC expression vector.....   | 116 |
| Khamidullina L.A., Tobysheva P.D., Rybina E.A., Cherepanova O.E., Pestov A.V. Plant growth biostimulants based on synthetic polyaminosaccharides.....  | 117 |
| Khizhnyak E.I., Volchenko N.N., Samkov A.A., Khudokormov A.A., Lazukin A.A. Functioning of benthic type of microbial fuel cell with the possibility of utilization of toxic compounds.....   | 118 |
| Kimeklis A.K., Aksenova T.S., Gladkov G.V., Kuznetsova I.G., Sazanova A.L., Safronova V.I., Belimov A.A., Onishchuk O.P., Kurchak O.N., Pinaev A.G., Andronov E.E., Provorov N.A. <i>Vavilovia formosa</i> rhizobia symbionts belong to <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> species, but form a separate group within it..... | 119 |
| Kirienko A.N., Dolgikh E.A. Regulation of the development of defense reactions on the part of plants with the participation of rhizobia signaling molecules as the basis for the development of legume-rhizobial symbiosis.....  | 120 |
| Kiryushkin A.S., Guseva E.D., Ilina E.L., Demchenko K.N. Study of the DEEPER ROOTING 1 (DRO1) expression features in the cucumber ( <i>Cucumis sativus</i> ) root system architecture formation.....   | 121 |
| Klimenko O.P., Kulaeva O.A., Shtark O.Y., Zhernakov A.I., Tikhonovich I.A., Zhukov V.A. Genetic characterization of pea ( <i>Pisum sativum</i> L.) mutants P59 and P60, defective in nitrogen fixation.....  | 122 |
| Koida E.S., Lagonenko A.L. Construction and characterization of the deletion mutant of <i>slyA</i> gene in phytopathogenic bacteria <i>Erwinia amylovora</i> .....   | 123 |
| Kolubako A.V., Nikolaichik Y.A. Molecular aspects of <i>Pectobacterium carotovorum</i> – <i>Solanum tuberosum</i> interaction.....   | 124 |
| Komakhin R.A., Efremova L.N., Strelnikova S.R. Molecular mechanisms for the plant promoter efficiency correction.....  | 125 |
| Konarev Alexander V., Senderskiy I., Tsarev A., Timofeev S., Zhuravlev V., Kapustkina A., Konarev Alexey V., Lovegrove A., Dolgikh V. Gluten hydrolysing proteases of Sunn pest <i>Eurygaster integriceps</i> Put. and related wheat bugs.....   | 126 |
| Konnova S.A., Ibrahim I.M., Fedonenko Y.P., Sigida E.N. Characteristics of the polysaccharide-producing culture <i>Haloterrigena saccharovitans</i> EG3QL57 isolated from the saltworks at lake Karun (Egypt).....   | 127 |
| Konstantinov A.V., Ostrikova M.Ya., Kulagin D.V. Development of a scheme for acclimatization of woody plants regenerants using microbial biopesticides.....  | 128 |
| Kozitsyn A.E., Sidorova T.M., Asaturova A.M. Scaling of the promising producer strains cultivation process of fungicidal metabolites.....  | 129 |
| Kritskaya T.A., Kashin A.S., Kasatkin M.Yu. The prospect of using clonal micropropagation to conserve the gene pool of natural <i>Tulipa suaveolens</i> (Liliaceae) populations.....   | 130 |
| Kruglova M.N., Chugunova Y.A., Samkov A.A., Volchenko N.N., Khudokormov A.A. Correlation between the diversity of xenobiotic catabolism genes in <i>Rhodococcus</i> and phytotoxicity of imidazolinone and organophosphate herbicide biotransformation products.....   | 131 |

|   |     |
|---|-----|
| Kruglova N.N., Seldimirova O.A. The “embryo in planta – callus <i>in vitro</i> ” system: cytophysiological aspects (by wheat example).....  | 132 |
| Kryuchkova Ye.V., Burygin G.L., Gogoleva N.E., Gogolev Y.V., Shagimardanova E.I., Balkin A.S., Muratova A.Y., Turkovskaya O.V. A genomic analysis of the catabolism of aromatic compounds in <i>Azospirillum brasilense</i> SR80.....   | 133 |
| Kryukov A.A., Gorbunova A.O., Kurbanniyazov Sh.K., Mikhaylova Yu.V., Rodionov A.V., Shishova M.F., Zhurbenko P.M., Yurkov A.P. Molecular-genetic identification of arbuscular mycorrhiza fungi from Teberda natural reserve.....  | 134 |
| Kryzhko A.V., Shirma A.V. Features of <i>Origanum vulgare</i> L. basal metabolism substances in the plants treated with entomopathogenic bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> .....   | 135 |
| Kublanovskaya A.A., Zaytsev P.A., Chekanov K.A., Fedorenko T.A., Vasilieva S.G., Solovchenko A.E., Lobakova E.S. Comparative analysis of microbial communities from phosphorus-polluted sites from Northern (Russia) and Southern (Israel) latitudes  | 136 |
| Kudoyarova G.R., Arkhipova T.N., Veselov D.S., Vysotskaya L.B. Hormonal balance of plants and its relationship with changes in plant growth and productivity under the influence of rhizospheric bacteria.....  | 137 |
| Kulaeva O.A., Zorin E.A., Romanyuk D.A., Gordon M.L., Gribchenko E.S., Shtark O.Y., Afonin A.M., Tikhonovich I.A., Zhukov V.A. Characterization of pea ( <i>Pisum sativum</i> L.) microRNAs.....  | 138 |
| Kuleshova T.E., Galushko A.S., Gall N.R., Panova G.G. Plant-microbial fuel cell with using the lettuce during cultivation by panoponic.....   | 139 |
| Kuluev A.R., Zaikina E.A., Kuluev B.R., Chemeris A.V. Chemically induced mutagenesis of diploid wheat <i>Triticum sinskajae</i> A. Filat. et Kurk.....  | 140 |
| Kuluev B.R., Musin H.G., Gumerova G.R., Chemeris A.V. Growth of tobacco hairy roots with constitutive expression of the NtEXPA5 expansin gene.....  | 141 |
| Kupryashina M.A., Pylaev T.E., Nikitina V.E. The influence of malachite green on the level of transcriptional expression of the laccase and DyP-peroxidase genes of the <i>Azospirillum brasilense</i> .....  | 142 |
| Kuptsov V.N., Mandrik-Litvinkovich M.N., Volokhanovich A.A., Kalamiyets E.I. Selection and characterization of bacteria – the basis of microbial preparation improving quality of lawns.....  | 143 |
| Kuragina N.S., Romanovskova A.D. Production of paper from mushroom raw materials.....   | 144 |
| Kuryntseva P.A., Galitskaya P.Yu., Selivanovskaya S.Yu. Biochar with immobilized free-living N-fixers provides higher N content in soils as compared with mineral fertilizer.....   | 145 |
| Kusakin P.G., Serova T.A., Gogoleva N.E., Gogolev V.U., Tsyganov V.E. Transcriptome analysis of pea ( <i>Pisum sativum</i> L.) symbiotic nodules using laser capture microdissection.....   | 146 |
| Kuznetsov M.A., Scherbakov A.A., Ivashchenko S.V., Gorelnikova E.A., Chervyakova N.S. Identification black rot pathogen <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> with biochemical tests.....   | 147 |
| Kuznetsova V.A. The joint use of strains of microorganisms and natural growth regulators to increase soy resistance to diseases.....  | 148 |
| Lastochkina O., Garshina D., Pusenkova L. Effect of endophytic <i>Bacillus subtilis</i> on drought stress tolerance of <i>Triticum aestivum</i> L. plants of Steppe Volga and Forest-Steppe West Siberian agroecological groups.....  | 149 |
| Lobanov A.N., Polyudova T.V. Cultivation of <i>Rhizobium leguminosarum</i> to produce exopolysaccharide.....  | 150 |
| Lobanova L. P., Kolesova A. Yu. Variability of female gametophyte of tobacco <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> under the influence of extreme temperatures and its possible consequences.....  | 151 |
| Lobodina E.V., Al-Nakib E.A., Avakimyan A.O. Morphotypic assessment of autochthonous strains of <i>Saccharomyces</i> and non- <i>Saccharomyces</i> yeast on grape varieties Dostoinny Anapo-Taman zone of viticulture.....  | 152 |
| Lugovtsova S.Yu., Neshumaeva N.A., Stupko V.Yu., Zobova N.V. Root rot toxins as a factor in the selection of resistant forms of oats <i>in vitro</i> .....  | 153 |
| Lukatkin A.A., Lukatkin A.S. Determination of growth-promoting effectiveness of a biopreparation created on <i>Pseudomonas</i> sp. base on wheat plants.....  | 154 |
| Lukjanova E.A., Antsiferov D.V., Maslova N.B., Ivashenko D.A., Danilova E., Kolomeichuk L.V., Efimova M.V. Adaptation of blue honeysuckle microclones to <i>ex vitro</i> conditions.....  | 155 |
| Lutfullin M.T., Pudova D.S., Moiseeva O.E., Zaripova D.L., Mardanov A.M. Genetic determinants responsible for growth-promoting properties of the rhizospheric bacterium <i>Brevibacterium</i> sp. MG-1.....   | 156 |
| Lyakhovchenko N.S., Senchenkov V.Yu., Myagkov D.A., Pribylov D.A., Chepurina A.A., Nikishin I.A., Avakova A.A., Goyanov M.A., Gubina E.D., Taptun V.A., Churikova D.A., Sirotin A.A., Solyanikova I.P. Determination of the taxonomic affiliation of the native isolate of the pigment-forming bacterium, separated from the Vezelka river of the city of Belgorod..... | 157 |
| Makarkina M.V., Ilitskaya E.T., Tokmakov S.V. Search for Rpv3 and Rpv12 genes in genotypes of table and seedless grape varieties using DNA-markers.....   | 158 |
| Makarkina M.V., Tokmakov S.V., Ilitskaya E.T. A study of the genetic polymorphism of <i>Plasmopara viticola</i> in the vineyards of the Krasnodar Territory.....  | 159 |
| Maksimov I.V., Shein M.Yu., Khairullin R.M. Endophytic bacteria and plant immunity.....   | 160 |
| Mandrik-Litvinkovich M.N., Orlovskaya P.I., Kislushko P.M., Kalamiyets E.I. Microbial preparation for soil bioremediation and crop yield increase.....  | 161 |
| Markova O.V., Garipova S.R. The influence of associations of endophytic bacteria and meteorological conditions on the productivity of beans depending on cultivars characteristics.....   | 162 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Markova Yu.A., Belovezets L.A., Tretyakova M.S., Cheremnykh A.M., Levchuk A.A.</b> The nature of the carbon source as a modulator of the response of bacteria to biologically active compounds (for example, colchicine and protatranes).....  | 163 |
| <b>Martynenko V.V., Rysbek A.B., Kurmanbayev A.A., Baigonusova Zh.A.</b> Research of the effect of a biological preparation based on the association of nitrogen-fixing bacteria on a legume culture.....   | 164 |
| <b>Matveeva T.V., Sokornova S.V., Khafizova G.V., Dymo A.M., Isaeva I.G.</b> The role of genes of agrobacterial origin in the evolution of plants.....  | 165 |
| <b>Mazurek B.G., Zhebrak I.S.</b> Features of mycorrhiza <i>Trifolium pratense</i> L. in various phytocenoses.....  | 166 |
| <b>Melnichuk T., Egovtseva A., Abdurashitov S., Andronov E., Abdurashitova E., Radchenko A., Ganotskaya T., Radchenko L.</b> Changes in the taxonomic structure of the microbiome of chernozem southern of the rhizosphere <i>Triticum aestivum</i> L. under the influence of associative bacteria strains.....   | 167 |
| <b>Mikhaylova E.V., Shein M.Yu., Alexeev V. Yu., Baimukhametova E.A. Musin Kh.G., Nikonorov Yu.M., Kuluev B.R.</b> Transformation of plants with target gene encoding glutathione S-transferase to induce stress resistance.....  | 168 |
| <b>Mikhaylova E.V., Mustafina A.N.</b> Genetic and phenotypic diversity of rare species of genus <i>Iris</i> L in the Southern Urals.....   | 169 |
| <b>Mikhailouskaya N.A., Voitka D.V., Yuzefovitch E.K.</b> Microbial composition with the properties of plant growth promoter, biofertilizer and biological fungicide.....   | 170 |
| <b>Minaeva O.M., Akimova E.E., Zyubanova T.I., Tereshchenko N.N.</b> Effect of wheat seed bacterization on the peroxidase activity under high temperature.....  | 171 |
| <b>Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Badeeva E.K., Akosah Y.A.</b> Strain <i>Aspergillus niger</i> AM1 - a living organism resistant to white phosphorus.....   | 172 |
| <b>Moiseeva E.V., Bobrikova L.P., Karaseva E.V., Khudokormov A.A., Samkov A.A., Volchenko N.N.</b> Taxonomic diversity of lipolytic bacteria isolated at oil refineries in Krasnodar that is promising for bio-preparation.....   | 173 |
| <b>Moiseeva Ye.M., Gusev Yu.S., Volokhina I.V., Fadeev V.V., Mazilov S.I., Chumakov M.I.</b> Editing of genes coding protein involved in maize gamete membrane interaction and fusion.....  | 174 |
| <b>Mukhamatdinova E.A., Kovtun I.S., Efimova M.V.</b> The regulation of growth parameters of potato microclones by jasmonic acid....  | 175 |
| <b>Muntyan V.S., Muntyan A.N., Simarov B.V., Roumiantseva M.L.</b> Phylogenetic analysis of vertically and horizontally acquired genes responsible for salt tolerance in nitrogen-fixing alphaproteobacteria.....   | 176 |
| <b>Muratova A.A., Valentovich L.N.</b> Inactivation of genes <i>lysR</i> and <i>mtfA</i> increases antagonistic activity of bacteria <i>Pseudomonas brassicacearum</i> S-1.....   | 177 |
| <b>Muratova A.Yu., Nurzanova A.A., Turkovskaya O.V.</b> Effect of heavy metals and hydrocarbons on rhizosphere microbial communities of <i>Miscanthus × giganteus</i> .....   | 178 |
| <b>Nazarenko N.N., Koretskaya I.I., Svistova I.D.</b> Accumulation of toxigenic species of micromycetes as A factor of high phytotoxicity of urban soils.....   | 179 |
| <b>Nazarova Ya.I., Bakulina A.V., Shirokikh I. G., Blinova A.L.</b> Studying the properties of rhizosphere strain <i>Streptomyces</i> sp. 8A13 for phytopathogens biocontrol.....   | 180 |
| <b>Nechaeva M.V., Golovatskaya I.F.</b> The effect of sodium selenite on the secondary metabolism of cell culture <i>Lychnis chalconica</i> <i>in vitro</i> .....   | 181 |
| <b>Neshumaeva N.A., Timina M.A.</b> Mycoflora of ergot ( <i>Claviceps purpurea</i> ) sclerotia as a source of potential biocontrol agents of phytopathogens.....  | 182 |
| <b>Nikolaichik Y.A.</b> Bacterial transcription factor binding site inference as the basis for the study of plant-microbial interactions.....   | 183 |
| <b>Nizhnikov A.A.</b> Amyloid proteins of plants and microorganisms: biological functions and participation in the formation of supra-organismal systems.....   | 184 |
| <b>Novikova I.I., Popova E.V., Kolesnikov L.E., Kolesnikova Yu.R.</b> Influence of biologicals on photosynthetic pigments in wheat leaves.....  | 185 |
| <b>Nuzhnaya T.V., Veselova S.V., Burkhanova G.F., Rummyantsev S.D.</b> Role of pathogen effectors SnTox in development of compatibility reaction in the pathosystem wheat – <i>Stagonospora nodorum</i> .....   | 186 |
| <b>Onishchuk O.P., Kurchak O.N., Andronov E.E., Kimeklis A.K., Aksenova T.S., Dzyubenko N.I., Dzyubenko E.A., Provorov N.A.</b> Phylogenetic diversity of fast-growing nodule bacteria ( <i>Rhizobiaceae</i> ) of the North Caucasus region.....  | 187 |
| <b>Orlovskaya P.I., Pilipchuk T.A., Girilovich N.I., Mandrik-Litvinkovich M.N., Kalamiyets E.I</b> Investigation of genetic heterogeneity of phages from phytopathogenic bacteria <i>Xanthomonas phaseoli</i> .....   | 188 |
| <b>Panchenko L.V., Muratova A.Yu., Turkovskaya O.V.</b> Monitoring of vegetation on oil-contaminated soils and remediation potential of indigenous plant species.....   | 189 |
| <b>Panfilova M.A., Mikhaylova E.V., Musin Kh.G., Kuluev B.R.</b> <i>In vitro</i> cultivation, aquaculture and methods of transformation of water caltrop <i>Trapa</i> L. ....   | 190 |
| <b>Panfyorova T.V., Puhalsky Y.V., Vorobyov N.I., Kozhemyakov A.P., Ol'hovsky E.V., Kamputin I.V., Loskutov S.I., Yakubovskaya A.I., Garabadzhiu A.V., Ivakhnyuk G.K.</b> Changing the balance of nutrients and the content of total chlorophyll in the leaves-feathers of onions ( <i>Allium cepa</i> L), grown hydroponically on water various of physical structures with the use of the biopreparation «Agrofil»..... | 191 |
| <b>Parfirova O.I., Gorshkov V.Y., Tarasova N.B., Gogoleva N.E., Smolobochkin A.V., Petrova O.E., Gogolev Y.V.</b> Identification of extracellular low-molecular-weight phosphonates of <i>Pectobacterium atrosepticum</i> .....   | 192 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Pavlenko O.S., Sadovskaya N.S., Mustafayev O.N., Akashkina Yu.V., Goldenkova-Pavlova I.V.</b> Transcriptome analysis of <i>Euonymus europaeus</i> fruits at different stages of development.....  | 193 |
| <b>Pesotskaya K.Yu., Lagonenko A.L., Evtushenkov A.N.</b> Investigation of molecular mechanisms involved in <i>Erwinia amylovora</i> biofilm formation.....  | 194 |
| <b>Petrova O.E., Parfirova O.I., Sergeeva J.P., Gorshkov V.Y.</b> Stringent response is key player in plant-microbe interaction.....   | 195 |
| <b>Petrukhina D.I.</b> Cyanoprokaryota cultivation with the lighting unit under different light regimes.....   | 196 |
| <b>Pilipchuk T.A., Valentovich L.N., Kalamiyets E.I.</b> Genome characterization of <i>Pseudomonas</i> phages BIM BV-45 and BIM BV-46 – the components of biopesticide Multiphage to control bacterial diseases of vegetable crops.....  | 197 |
| <b>Pivovarova N.S., Shebitchenko T.S., Podboronova A.G.</b> Obtaining tissue culture of <i>Scutellaria baicalensis</i> .....   | 198 |
| <b>Pristipa K.V., Kukulyanskaya T.A. Khrantsova E.A.</b> The content of low molecular weight antioxidants in transgenic plants <i>Nicotiana tabacum</i> under heavy metal salts conditions.....  | 199 |
| <b>Provorov N.A., Kimeklis A.K., Chirak E.R., Onishchuk O.P., Kurchak O.N., Andronov E.E.</b> Microsymbionts of plants as the models of evolutionary genetics.....   | 200 |
| <b>Puhalsky Y.V., Loskutov S.I., Lapteva E.M., Vinogradova Yu.A., Kovaleva V.A., Perminova E.M.</b> The effect of organic fertilizers on the taxonomic composition of microbial communities in agro-soddy-podzolic soils of the middle taiga.....  | 201 |
| <b>Puzanova E.V.</b> Prospects for the use of unmodified antisense oligonucleotides in the regulation of the synthesis of secondary metabolites of essential oil plants.....   | 202 |
| <b>Pyatibratov M.G., Syutkin A.S., Beznosov S.N., Galeva A.V., Shchyogolev S.Yu.</b> Bioengineering of archaeal flagella.....  | 203 |
| <b>Raizer O.B., Khapilina O.N.</b> Culture in vitro of rare and endemic species of <i>Allium</i> ( <i>A. ledebourianum</i> , <i>A. altaicum</i> ).....   | 204 |
| <b>Rafikova G.F., Kuzina E.V.</b> New bacterial strains <i>Pseudomonas</i> , promising for agricultural biotechnology.....   | 205 |
| <b>Rogozin E.</b> Biotechnology for production of recombinant hybrid proteins from plants and microbes with antifungal activity.....   | 206 |
| <b>Rubtsov N.B.</b> Lessons of studies of karyotypic and genomic evolution in animals, application of developed technique in the studies of karyotype and genome organization in plants.....   | 207 |
| <b>Rudaya E.S., Dolgikh E.A.</b> Production and analysis of tomato <i>Solanum lycopersicum</i> composite plants carrying the genes of pea <i>Pisum sativum</i> receptors to rhizobial signaling molecules.....   | 208 |
| <b>Rumyantsev S.D., Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Burkhanova G.F.</b> Role of the <i>Stagonospora nodorum</i> effector SnTox3 in regulation of cytokinins synthesis and metabolism in infected wheat plants.....   | 209 |
| <b>Sabutova A.B.</b> Studying the kinetics of salicin hydrolysis in an acidic environment.....   | 210 |
| <b>Sadigova E.E., Garagozov T.H.</b> Selection of antibiotics suppressing bacterial and mycoplasma contamination of the original explants during <i>in vitro</i> microclonal propagation of grape.....   | 211 |
| <b>Sadovskaya N.S., Mustafaev O.N., Tyurin A.A., Goldenkova-Pavlova I.V.</b> JetGene – web database and toolkit for analysis of regulatory regions or nucleotide contexts at differently translated transcripts of plants.....   | 212 |
| <b>Safronava H.V., Aleschenkova Z.M., Ananyeva I.N., Evenkova-Chernetsova K.I.</b> Rape rhizospheric nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing biocenoses promoted by microbial preparations.....   | 213 |
| <b>Salimova D.R., Berestetskiy A.O.</b> Secondary metabolite profiles and biological activity of extracts from various isolates fungi <i>Alternaria sonchi</i> depending on the composition of the liquid nutrient medium.....   | 214 |
| <b>Samsonova E.A., Ibrahim I.M., Fedonenko Yu.P., Konnova S.A.</b> <i>In vitro</i> evaluation of some halophilic bacterial isolates as biofertilizers.....   | 215 |
| <b>Sarvarova E.R., Cherepanova E.A., Maksimov I.V.</b> Antifungal activity of lipopeptides from endophytic strains of the genus <i>Bacillus</i> sp. against the fungus <i>Stagonospora nodorum</i> (Berk.).....  | 216 |
| <b>Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Galin I.R., Veselov D.S., Kruglova N.N.</b> Morphogenesis in vitro and peroxidase activity in barley cv. Steptoe and its ABA-deficient mutant AZ34: effects of inhibitors of ABA synthesis and auxin transport.....  | 217 |
| <b>Sergeev V.S., Mukminov D.R., Minnebaev L.F.</b> Anti-stress sugar beet cultivation technology.....  | 218 |
| <b>Shaposhnikov A.I., Vishnevskaya N.A., Shakhnazarova V.Yu., Syrova D.S., Borodina E.V., Kovaleva O.N., Strunnikova O.K.</b> Features of the initial stages of the relationship between barley, phytopathogenic fungus <i>Fusarium culmorum</i> and rhizobacteria <i>Pseudomonas fluorescens</i> 2137.....  | 219 |
| <b>Shaposhnikov A.I., Vishnevskaya N.A., Shakhnazarova V.Yu., Syrova D.S., Borodina E.V., Kovaleva O.N., Strunnikova O.K.</b> The effect of <i>Fusarium culmorum</i> and <i>Pseudomonas fluorescens</i> 2137 on the content of abscisic acid in the roots and shoots of barley seedlings.....  | 220 |
| <b>Shchyogolev S.Yu., Burygin G.L., Pyatibratov M.G.</b> Prokaryotic cell surface biopolymers: bioinformatic analysis.....   | 221 |
| <b>Shein M.Yu., Burkhanova G.F., Maksimov I.V.</b> The effect of bacterial strains on the transcriptional activity of genes of the RNA interference system in wheat ( <i>Triticum</i> ) infected with <i>Septoria</i> .....  | 222 |
| <b>Shirokikh I.G., Nazarova Ya.I.</b> Variability of actinomycete complexes in the rhizosphere of transgenic and intact tobacco lines.....   | 223 |
| <b>Shmyga E.Yu., Sidorenko A.V., Sviridov A.V., Korzhenevskij O.Ch., Mandrik-Litvinkovich M. N., Kuptsov V. N., Kalamiyets E. I.</b> Biological efficiency of a complex microbial preparation against root rots of cereals in model and field experiments.....   | 224 |
| <b>Shpakovski D.G., Shematorova E.K., Babak O.G., Slovokhotov I.Yu., Spivak S.G., Khaliluev M.R., Doludin Yu.V., Klykov V.N., Baranova E.N., Tereshonkova T.A., Kilchevsky A.V., Shpakovski G.V.</b> Specific cytochromes P450 and adrenodoxin-like mitochondrial ferredoxins as components of the progesterone hormone system of higher plants involved in comprehensive protection from biotic and abiotic stresses..... | 225 |

|   |     |
|---|-----|
| Shrub K.V., Kolubako A.V., Nikolaichik Y.A. The receptor-like kinase RLK4 from <i>Solanaceae</i> family plants contributes to immune response.....  | 226 |
| Shtark O.Y., Puzanskiy R.K., Avdeeva G.S., Yemelyanov V.V., Kliukova M.S., Shavarda A.L., Kirpichnikova A.A., Afonin A.M., Tikhonovich I.A., Zhukov V.A., Shishova M.F. Metabolic alterations in pea leaves and roots during arbuscular mycorrhiza development..... | 227 |
| Shvets D.Yu., Kuluev B.R. <i>In vivo</i> callus formation on the surface of tubers of Manchu tubergourd ( <i>Thladiantha dubia</i> , <i>Cucurbitaceae</i> ).....  | 228 |
| Sidarenka A.V., Bareika H.A., Valentovich L.N., Paturemski D.S., Kuptsou V.N., Titok M.A., Kalamiyets E.I. Molecular diagnostics of bacterial and fungal plant diseases.....  | 229 |
| Sidorova T.M., Asaturova A.M., Khomyak A.I. The influence of cultivation conditions of promising <i>Bacillus subtilis</i> strains on their ability to produce antifungal metabolites.....   | 230 |
| Skugoreva S.G., Kantor G.Ya., Domracheva L.I. Study of the kinetics of sorption of heavy metal ions by dry biomass of cyanobacteria.....  | 231 |
| Sokolov A.O., Dykman L.A., Galitskaya A.A., Sokolov O.I. Detection and primary characterization of <i>Rothia amarae</i> in a suspension culture of <i>Arabidopsis thaliana</i> (Heynh.) cells.....  | 232 |
| Sokornova S.V., Shavarda A.L., Gusenkov E.A., Emelianov D.A., Frolova G.M. Biochemical features of phoma-like fungi.....  | 233 |
| Statsyuk N.V., Shcherbakova L.A., Mikityuk O.D., Nazarova T.A., Dzhavakhiya V.G. Mycotoxin degradation by microbial metabolites.....  | 234 |
| Stupak E.E., Vafina G.Kh., Tropynina T.S. Study of the influence of external factors on the inheritance of forms of dissociants <i>Pseudomonas mandelii</i> .....   | 235 |
| Stupko V.Yu., Zobova N.V., Gurevich Yu.L. The influence of ferrihydrite nanoparticles on induction and proliferation of <i>Triticum aestivum</i> mature embryo callus culture.....  | 236 |
| Sukhareva A.S., Mikhaylova E.V., Kuluev B.R. Stimulation of anthocyanin pigmentation in <i>Solanum lycopersicum</i> and <i>Nicotiana tabacum</i> using CRISPR/Cas9 technology.....  | 237 |
| Sulima A.S., Afonin A.M., Maslikova T.I., Zhukov V.A. The specificity of nodule symbiosis of legumes in the context of the “arms race” between macro- and microsymbionts.....   | 238 |
| Sundyreva M.A., Lutsky E.O., Mishko A.E. Stilbene biosynthesis in callus culture of grapes of different resistance to pathogens.....  | 239 |
| Sundyreva M.A., Rebrov A.N., Mishko A.E., Lutsky E.O. The effect of sucrose concentration in the culture medium on the formation of abscisic acid and the activity of the photosynthetic apparatus of grape plants <i>in vitro</i> .....                            | 240 |
| Svistova I.D., Kuvshinova N.M. Phytosanitary effect of the plants - producers of sweet glycosides.....  | 241 |
| Syrova D.S., Shakhnazarova V.Y., Shaposhnikov I.A., Belimov A.A., Gogolev Y.V. The intensity of root colonization by phytopathogenic fungus and rhizobacterium depends on the genotype of tomatoes and abscisic acid.....   | 242 |
| Tabalenkova G.N., Golovko T. K. Positive effect of application of "Rizoagrin" on the barley production process in the North.....  | 243 |
| Taipova R.M., Kuluev B.R. <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation of <i>Amaranthus cruentus</i> L. epicotyls by the ARGOS-LIKE transgene.....   | 244 |
| Tchebotarev L., Valentovich L. Engineering of vectors essential to derive chimeric proteins based on superfolder green fluorescent protein and harpins.....   | 245 |
| Timergalin M.D., Feoktistova A.V., Rameev T.V., Chetverikov S.P., Sultangazin Z.R. Wheat yields of herbicide treatment along with auxin-producing bacteria <i>Pseudomonas</i> sp. DA1.2.....  | 246 |
| Timofeev S.A., Tsarev A.A., Zhuravlev V.S., Konarev A.V., Dolgikh V.V. Construction of scFv-antibodies to the active center of the Sunn bug ( <i>Eurygaster integriceps</i> Put) gluten-hydrolyzing protease GHP3.....  | 247 |
| Tishchenko A.V., Litvinenko L.V., Ivshina I.B. Reduction of heavy metal phytotoxicity using <i>Rhodococcus</i> -biosurfactants.....   | 248 |
| Tobysheva P.D., Khamidullina L.A., Puzyrev I.S., Pestov A.V. Biological activity of complexes based on polycarbonyl ligands: assessment of the mode of action using molecular docking.....  | 249 |
| Tomilova S.V., Khandy M.T., Kochkin D.V., Nosov A.M. Initiation and characterization of plant cell culture of <i>Phlojodicarpus sibiricus</i> .....   | 250 |
| Tovstik E.V., Bakulina A.V. Search for streptomycetes with antagonistic activity to the aggressive <i>Fusarium</i> sp. strain AC.....   | 251 |
| Trigubovich A.M., Popov F.A., Arashkova A.A., Volchkevich I.G., Kolomiyets E.I. Biopreparation "Vegetatin" for protection of cabbage from fungal and bacterial diseases during grows and storage.....   | 252 |
| Trifonova N.A., Korolyova M.I., Fedorova E.E. Ionic transporters in the root nodule of <i>Medicago truncatula</i> : membrane antiporters Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> .....  | 253 |
| Tsers I., Gorshkov V., Gogoleva N., Gogolev Y. Revealing the potential “master regulators” of pathogenesis in plants based on RNA-Seq data.....   | 254 |
| Tsvileva O.M., Perfileva A.I., Pavlova A.G. Biopreparations for plants produced with basidiomycetes.....  | 255 |
| Tsvetkov V.O., Yarullina L.G., Burkhanova G.F., Sorokan A.V. Effect of <i>Bacillus</i> bacteria on activity of pathogen-induced proteins in potato plants and increasing their resistance to <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary.....                     | 256 |
| Tsyganov V.E. Symbiotic nodule development.....   | 257 |
| Tsyganova A.V., Seliverstova E.V., Brewin N.J., Tsyganov V.E. The formation of symbiotic interface in root nodules of <i>Pisum sativum</i> L. and <i>Medicago truncatula</i> Gaertn.....  | 258 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tsygichko A.A., Asaturova A.M., Pavlova M.D., Tomashevich N.S.</b> Insecticidal properties of strains of the granulosa virus of the codling moth from the Bioresource collection of FSBI VNIIBZR.....  | 259 |
| <b>Tugarova A.V., Mamchenkova P.V., Kamnev A.A.</b> Metabolic transformation of selenium (IV) by bacteria of the genus <i>Azospirillum</i> .....  | 260 |
| <b>Tyurin A.A., Kabardaeva K.V., Suhorukova A.V., Kouchoro F., Fridman V.A., Goldenkova-Pavlova I.V.</b> Bireporter vector for analysis of cis-regulatory elements in plants.....   | 261 |
| <b>Umarov B.R.</b> Association of nitrogen-fixing microorganisms in the surface of nodules in wild perennial leguminous plants <i>Onobrychis transcaucasica</i> and <i>Onobrychis chorassanica</i> .....  | 262 |
| <b>Uryadova G.T., Fokina N.A., Karpunina L.V.</b> Film coatings based on exopolysaccharides of lactic acid bacteria and their use.....  | 263 |
| <b>Valentovich L.N., Muratova A.A., Shavela Yu.V., Sikolenko M.A. Akhremchuk A.E.</b> Sequencing and analysis of genomes of bacteria used to protect plants and animals from diseases.....  | 264 |
| <b>Vasileva E.N., Afonin A.M., Akhtemova G.A., Zhukov V.A., Tikhonovich I.A.</b> Endophytic bacteria isolated from garden pea ( <i>Pisum sativum</i> L.).....   | 265 |
| <b>Velichko N.S., Bagavova A.R., Sigida E.N., Burygin G.L., Fedonenko Yu.P.</b> Structural peculiarities of biopolymers produced by diazotrophic endobiont <i>Herbaspirillum</i> spp.....   | 266 |
| <b>Vershinina Z.R., Khakimova L.R., Karimova L.R., Baimiev Al.Kh.</b> <i>Amaranthus retroflexus</i> transgenic plants for phytoremediation.....   | 267 |
| <b>Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Burkhanova G.F., Rumyantsev S.D.</b> Characteristics of dose-response dependence between zeatin and resistance of wheat plants to the pathogenic fungus <i>Stagonospora nodorum</i> .....  | 268 |
| <b>Veselova S.V., Alekseev V.Yu., Rumyantsev S.D., Burkhanova G.F., Cherepanova E.A., Kasimova A.R., Maksimov I.V.</b> Lipopeptide producing endophytic bacteria of the genus <i>Bacillus</i> regulate wheat resistance to cereal aphids.....   | 269 |
| <b>Vetchinkina E.P., Gorshkov V.Yu., Gogoleva N.E., Gogolev Yu.V., Nikitina V.E.</b> Comparative analysis of transcriptomes of different morphological structures of the basidiomycete <i>Lentinus edodes</i> .....   | 270 |
| <b>Vladimirova A.A., Akimova E.S., Baymiev An.K., Baymiev Al.K.</b> Functional specificity of NifA protein among nodule bacteria....  | 271 |
| <b>Vladimirova A.A., Kamnev A.A., Tugarova A.V.</b> Raman spectroscopic characterization of selenite reduction by the bacterium <i>Azospirillum thiophilum</i> in the presence of an increased concentration of sulphate.....   | 272 |
| <b>Vladimirova M.E., Muntyan V.S., Saksaganskaya A.S., Simarov B.V., Roumiantseva M.L.</b> Phylogenetic analysis of genomic islands in closely-related species belonging to <i>Sinorhizobium</i> sp.....  | 273 |
| <b>Vlasova A.I., Minaeva O.M.</b> Efficiency of <i>Pseudomonas aureofaciens</i> colonization in wheat rhizosphere under model condition.....  | 274 |
| <b>Voitka D.V., Yuzefovich E.K., Mikhnyuk A.V.</b> Features of relationship of <i>Trichoderma saprotrophic</i> fungi-antagonists with the phytopathogenic micromycetes.....   | 275 |
| <b>Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Moiseeva Ye.M., Gutorova O.V., Chumakov M.I.</b> Analysis of the expression of maize genes encoding chromatin-modifying proteins.....   | 276 |
| <b>Voropaeva O.V., Tripti, Kumar A., Panikovskaya K.A., Maleva M.G., Borisova G.G.</b> Screening of metal tolerant plant growth-promoting endophytic (PGPE) bacteria for the preparation of bioformulation.....   | 277 |
| <b>Vychyk P.V., Nikolaichik Y.A.</b> Identification of bacterial virulence factors based on an integration of experimental and <i>in silico</i> transcription factor target discovery.....  | 278 |
| <b>Yakimenko M.V., Begun S.A., Sorokina A.I.</b> Species diversity of natural rhizobia populations of the Russian Far East.....   | 279 |
| <b>Yakuba G.V., Astapchuk I.L.</b> Evaluation of the effectiveness of <i>in vitro</i> fungicides against the pathogen of rot of the core of apple fruit <i>Alternaria alternata</i> (Fries: Fries) Keissler.....  | 280 |
| <b>Yakubovskaya A.I., Kameneva I.A., Melnichuk T.N., Matveeva T.V., Gritchin M.V., Abdyrashitov S.F.</b> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> – associative microsymbionts of grain crop.....   | 281 |
| <b>Yevstigneyeva S.S., Fedonenko Yu.P., Shelud'ko A.V.</b> Biofilms of <i>Azospirillum brasilense</i> and <i>Azospirillum lipoferum</i> and their resistance to abiotic stresses.....   | 282 |
| <b>Yukhnevich G.G., Belova E.A.</b> Sewage and natural water treatment with higher plants.....  | 283 |
| <b>Yurkov A.P., Kryukov A.A., Gorbunova A.O., Mikhaylova Yu.V., Dobryakova K.S., Afonin A.M., Kurbaniyazov Sh.K., Rodionov A.V., Shishova M.F.</b> Effective arbuscular mycorrhiza development between <i>Medicago lupulina</i> and <i>Rhizophagus irregularis</i> under conditions of different phosphorus levels in the substrate.....  | 284 |
| <b>Zaikina E.A., Galimova A.A., Kuluev B.R.</b> The role of transcription factor genes in the tolerance of common wheat to abiotic stress.....  | 285 |
| <b>Zaytsev P.A., Ustimenko A.A., Kublanovskaya A.A., Vasilieva S.G., Baulina O.I., Solovchenko A.E.</b> The components selection for the bioinspired microalgae-cyanobacterial communities.....   | 286 |
| <b>Zaytsev S.A.</b> Use of the dialle analysis method in the study of the combination ability of insukht-lines of corn.....   | 287 |
| <b>Zheleznyakov S.V., Lebedeva V.K., Kalinina T.V., Kozhemyakov A.P., Jacobi L.M.</b> Analysis of <i>Pseudomonas fluorescens</i> inoculation effect on the work of mycorrhiza formed on black medic by arbuscular fungi differing in symbiotic activity.....  | 288 |
| <b>Zhukov V.A., Afonin A.M., Akhtemova G.A., Bovin A.D., Dolgikh A.V., Gorshkov A.P., Gribchenko E.S., Ivanova K.A., Kirienko A.N., Kitaeva A.B., Kliukova M.S., Kulaeva O.A., Kusakin P.G., Leppyanen I.V., Pavlova O.A., Romanyuk D.A., Serova T.A., Shtark O.Y., Sulima A.S., Tsyganova A.V., Vasileva E.N., Zhernakov A.I., Dolgikh E.A., Tsyganov V.E., Tikhonovich I.A.</b> Study of the garden pea ( <i>Pisum sativum</i> L.) symbioses in post-genomic era..... | 289 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Zhurishkina E.V., Golovkina D.A., Baranchikov A.Ye., Garmay Yu.P., Sokolov A.Ye., Tsvigun N.V., Kopitsa G.P., Kulminskaya A.A.</b> Search for microorganisms capable of bioremediating cement concrete structures.....              | 290 |
| <b>Zorin E.A., Kulaeva O.A., Shtark O. Y., Zhukov V.A.</b> Regulation of development of arbuscular-mycorrhizal symbiosis by alternative splicing in garden pea ( <i>Pisum sativum</i> L.).....   | 291 |
| <b>Zybanova T.I., Minaeva O.M., Tereshchenko N.N.</b> Effect of bacterization with <i>Pseudomonas extremorientalis</i> PhS1 on photosynthesis processes in wheat plants ( <i>Triticum aestivum</i> L.) under phytopathogenic load..... | 292 |
| <b>Akinina V.N., Dyachuk T.I., Zhilin S.V., Kalashnikova E.V.</b> Biotechnology for the production of wheat-rye hybrids (primary triticale) .....  | 293 |
| <b>Authors index</b> .....   | 294 |