

ABSTRACT BOOK

International Scientific Conference PLAMIC2018

«Plants and microbes: the future of biotechnology»

Russia, Ufa, 13-17 June 2018



СБОРНИК ТЕЗИСОВ

Международная научная конференция PLAMIC2018

«Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего»

Уфа, 13-17 июня 2018 г.

УДК 573.4
ББК 28.07

Организаторы:

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН
Институт биологии УФИЦ РАН
ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии
ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук
ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН
ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»
Академия наук Республики Башкортостан

АНО «Центр поддержки академических инициатив»

Под редакцией:

Тихонович И.А., Кулуев Б.Р., Михайлова Е.В., Проворов Н.А., Щеголев С.Ю., Хлесткина Е.К., Андронов Е.Е., Баймиев А.Х., Белимов А.А., Веселов Д.С., Гоголев Ю.В., Голденкова-Павлова И.В., Дейнеко Е.В., Демченко К.Н., Жуков В.А., Комахин Р.А., Кудоярова Г.Р., Кузнецов В.И., Лутова Л.А., Максимов И.В., Маркова Ю.А., Мартыненко В.Б., Матвеева Т.В., Степанова А.Ю., Халилуев М.Р., Хуснутдинова Э.К., Цыганов В.Е., Цыганова А.В., Чемерис А.В., Чумаков М.И., Шакирова Ф.М.

Оргкомитет:

Председатель - Вершинина З.Р.
Заместители председателя - Кулуев Б.Р. и Михайлова Е.В.

Авальбаев А.М., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ан.Х., Бережнева З.А., Бурханова Г.Ф., Веселов Д.С., Веселова С.В., Владимирова А.А., Гумерова Г.Р., Гуменко Р.С., Зайцев Д.Ю., Каримов А.Г., Каримова Л.Р., Коршунова Т.Ю., Кулуев А.Р., Лубянова А.Р., Масленникова Д.Р., Матниязов Р.Т., Румянцев С.Д., Хакимова Л.Р., Юлдашев Р.А.
plamic2018@mail.ru

При поддержке гранта РФФИ_г № 18-016-20006

При поддержке Академии наук Республики Башкортостан

Материалы международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», 13-17 июня 2018 г., Уфа / отв. ред. И.А. Тихонович - 2018. - 275 с. - ISBN 978-5-6041302-1-6

В сборнике представлены материалы международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего». Авторы несут ответственность за содержание представленных ими материалов.

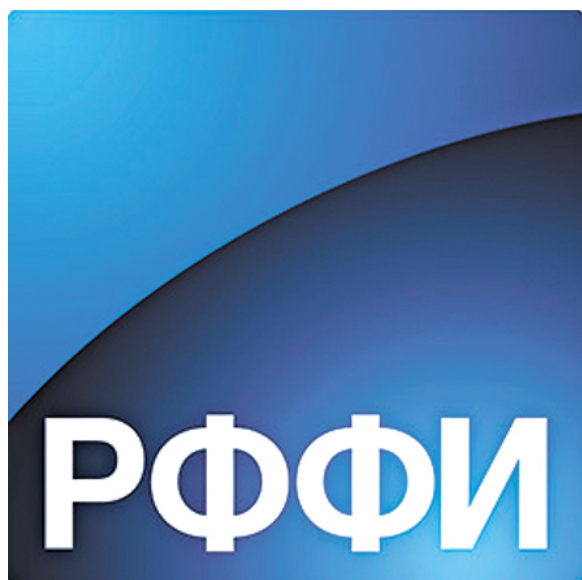
© АНО Центр поддержки академических инициатив, 2018

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

ISBN 978-5-6041302-1-6



INTERACTIVE CORPORATION



The revealing of arbuscular mycorrhizal fungi in Crimean Steppe

Abdurashytov S., Abdurashytova E.

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

E-mail: asuleyman@rambler.ru

Arbuscular mycorrhizal fungi (AM) are ecologically obligate symbionts of 80% terrestrial plant species. The use of AM fungi in agricultural practice promote to increase the uptake of nutrients from the soil into plants, which leads to rise the photosynthetic and nitrogen-fixing activity. Earlier, researchers of our Institute evaluated the mycorrhization degree of cultivated and wild plants in the Crimea and the South of Ukraine. Assess of their populations diversity in the Crimean Steppe is necessary because some agricultural managers changed the systems of plant growing, the source of irrigation or its complete abandonment in some regions of the peninsula (rice paddy fields). This data will be used in ecologically balanced agriculture. Therefore, the purpose of the research was to determine the distribution of AM fungi and the level of their colonization of plants under different methods of agricultural production.

An expedition was conducted to the Crimean Steppe in 2016. Samples of soil and plant roots are selected by sites where irrigation was previously carried out from the North-Crimean Canal and now revised to river or underground resources, abandoned watering with the crop rotation exchange to drought tolerant plant (the rice-growing region), and switched to a different farming system (No-till for 9-10 years). Plant material are choosing according to the principle of the greatest affinity for mycorrhiza formation. Control was virgin soil of southern chernozem with wild plants from the families Asteraceae, Linaceae, Poaceae.

The Crimea conditions were quite wet in 2015 and 2016, so the plants developed well and formed a symbiosis with AM fungi in the drylands conditions. In 2016, the roots in the control site had a frequency of occurrence of AM fungi from various families 73.2% with the intensity 22.2%. All the investigated objects possessed a high occurrence rate of mycorrhizal colonization of 58.6-96.2%, the intensity amount 7.8-27.3%. There are no strict dependence on the difference between irrigated and non-irrigated fields. Wheat, sainfoin and maize grown by No-till farming system had a more developed mycorrhizal colonization by 8.0-10.9% compared to cereal plants of virgin land and by 32.0-33.9% in comparison with sorghum grains, grown with full agrotechnics. Sunflower increased the frequency of occurrence by 29.9% this year compared to last; presumably, the previous culture was a plant that intensively forms mycorrhiza. The average and low occurrence of mycorrhizal colonization is caused both the plants species (apple tree) and the phase of their development (coriander and dill immediately after harvest) under irrigation condition. The impact of diseases decreased frequency of occurrence AM fungi by 4.0 or more times compared to healthy sweet cherry trees (chlorosis). The highest colonization rate and intensity of mycorrhiza were found in onions 96.2% and 74.6%, respectively. Onion is used as a storage plant for AM fungi both in laboratory experiments and in the production of biopreparations based on them.

Thus, it was revealed that the change in the source of irrigation does not affect at the AM fungi population. AM fungi intensively colonized healthy plants' roots when there is watering. The No-till system promoted an increase in the colonization of plants by mycorrhizal fungi compared to virgin and arable land.

This work funded by RFBR grant № 16-34-00548 mol_a.

Antagonistic activity of fluorescent *Pseudomonas* strains to phytopathogenes of genus *Fusarium*

Abdurashytova E.R., Abdurashytov S.F., Yakubovskaya A.I.

Federal State Budget Scientific Institution "Research Institute of Agriculture of Crimea", Simferopol, Russia

E-mail: elvi-jadore@mail.ru

The search for new strains of phytopathogens biological control and determination of the chemical nature of the compounds produced by them is a current task. *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis* and *P. syringa*) produce a fluorescent pigment of pyoverdine. Certain strains of fluorescent *Pseudomonas* spp. are capable of producing a number of antibiotic active compounds of various nature, HCN, phytohormones, and biosurfactants.

The purpose of our research was to investigate the antagonistic activity of new strains of bacteria of the genus *Pseudomonas* when interacting with phytopathogenic fungi.

The modified synthetic nutrient medium King BS (Sivolodsky E.P. Patent No. 1296577) was used to detect fluorescent pigment of collection *P. fluorescens* P-10 strain and new 13-A, MM-19 strains. The daily cultures of 13-A and MM-19 grown on King BS without Ba²⁺ produce yellow-green fluorescent pigment in the ultraviolet part of the spectrum. This luminescence gives one of the reasons to assume that they belong to the genus *Pseudomonas*. *P. fluorescens* P-10 strain – endophyte of cabbage; 13 A is isolated as growth stimulator of rice; MM-19 – is able to use oil products as a one source of carbon.

The antagonistic activity of fluorescent bacteria was assessed for the phytopathogenes *Fusarium solani* and *F. oxysporum* under laboratory conditions. Collection strains of antagonists-phytopathogenes *P. fluorescens* 2-79, *P. fluorescens* IC7, *P. chlororaphis* OV17(pOV17) were taken as a control, which were provided by the Laboratory of Plasmid Biology of Scriabin G.K. Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS. They produce antibiotic agents of the phenazine series, which suppress expansion of pathogenic fungi and bacteria and have a growth stimulating effect.

The potato-glucose agar was used to determine the antifungal properties of prospective strains of bacteria and their metabolites. Two layers of medium were poured into Petri dish separated by a sterile filter paper disc to obtain metabolites. The bacteria cultures were plated on the top layer of the nutrient medium. They were removed together with the paper after three-day incubation. One block of the seven-day test culture of fungi *F. solani* or *F. oxysporum* was inserted into dishes with test strains or their metabolites to evaluate antagonistic properties. The fungi growth zones were measured after seven-day cultivation. The inhibitory activity of strains and their bacterial metabolites was calculated by the Abbott formula.

The maximum antifungal activity was shown by the metabolites of 13-A strain. The inhibition of *F. solani* and *F. oxysporum* in this case amounted 100% that high on 10.3% in comparison with 13-A bacterial culture.

Significant suppression of phytopathogenic organisms was detected in the culture of *P. chlororaphis* OV17 (pOV17) by 57.4% and 61.6% for *F. solani* and *F. oxysporum*, respectively, among the control strains which produce antibiotics of the phenazine series.

MM-19 and *P. fluorescens* 2-79 strains exhibited similar antagonistic activity. The growth of *F. oxysporum* was suppressed by 42.5% and 38.4%, respectively, and for *F. solani* it was 1.4 and 1.7 times less than for the first fungus.

The inhibition of *F. solani* growth by metabolites was reduced in the following order: *P. chlororaphis* OV17(pOV17) > *P. fluorescens* IC7 > MM-19 > *P. fluorescens* P-10 > *P. fluorescens* 2-79, which was 26.5-11.8%.

The results of inhibition of *F. oxysporum* expansion by metabolites decreased from 39.7 to 26.0% in the following series: *P. fluorescens* P-10, *P. fluorescens* IC7 > *P. fluorescens* 2-79 > MM-19 > *P. chlororaphis* OV17(pOV17).

Thus, growth inhibition of *F. solani* and *F. oxysporum* was amounted 100 % after seven days of cultivation by the metabolites of 13-A strain. Antagonistic activity of live culture of 13-A strain reduced on 10.3% in comparison with its working agents by interaction with fungi.

Immunobiotechnological approaches in the study of abscisic acid effects on auxin content and lateral root development in ABA deficient mutant of barley

¹Akhiyarova G.R., ¹Ivanov R.S., ¹Veselov D.S., ²Veselov S.Yu., ¹Kudoyarova G.R.

¹Ufa Institute of Biology, Ufa Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

²Bashkir State University, Ufa, Russia

E-mail: ivanovirs@mail.ru

Plant hormonal system plays an important role in the perception of external factors and the regulation of growth and development of plants. The involvement of auxins in the regulation of roots branching is well known. The role of ABA increases under stress conditions, which are characterized by the accumulation of this hormone. It is assumed that increasing the level of this hormone during drought leads to suppression of formation of lateral roots, thus promoting the accelerated elongation of the primary root. However, the mechanism of action of this hormone on the formation of lateral roots is not well understood. Changing the branching of the roots under the influence of ABA may be due to the action of this hormone on auxins. It is shown that ABA activates the conjugation of auxins with amino acids, which should help to reduce their concentration in plants. However, recent studies have shown the ability exogenous ABA to increase the expression of the genes controlling the synthesis of auxin. Due to the fact that the content of the hormone is determined by the balance between its synthesis and inactivation, it was important to assess the effect of ABA on the level of auxins. To solve this problem in this work we used the ABA-deficient mutant barley plants AZ34 and its parental variety Steptoe. In order to confirm a causal relationship between changes in the level of ABA and IAA, an exogenous ABA was added to the nutrient medium of the ABA deficient mutant plant. In our work it was shown that incubation in solution with exogenous ABA increased the content of ABA in the roots and at the same time led to a decrease in the level of immunoassayed auxins and the number of lateral roots in them. The number of primordia, on the contrary, increased under the influence of treatment with exogenous hormone, which indicates the suppression of the elongation of the root primordia and the normal development of the lateral roots. Thus, the change in the level of hormones and branching when introducing exogenous ABA into mutant plants indicates the important role of accumulation of ABA in the roots in suppression of their branching and the relationship of this reaction with a decrease in the level of auxins in the roots under the influence of ABA.

The work was partially supported by the RFBR grant No. 17-04-01477.

Immunobiotechnological approach for differential localization of free cytokinin bases and their ribosylated forms in wheat roots

¹Akhiyarova G.R., ¹Korobova A.V., ¹Kudoyarova G.R., ²Veselov S.Yu.

¹Ufa Institute of biology UFRC RAS, Ufa, Russia

²Bashkir State University, Ufa, Russia

E-mail: akhiyarova@rambler.ru

We have shown previously that the level of cytokinin accumulation was higher in wheat plants treated with zeatin as compared to zeatin riboside treatment. Inhibition of secondary active trans-membrane transport with the help of protonophore (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP)) sharply decreased root cytokinin accumulation in the zeatin-treated wheat plants, while the inhibitory effect of CCCP on accumulation of exogenously applied zeatin riboside was less expressed. It was of interest to study the effect of the protonophore treatment on the endogenous cytokinins (separately zeatin and its riboside) content in plant cells that became the aim of the present work.

Experiments were performed on seedlings of durum spring wheat (*Triticum durum* Desf., cv. Bezenchukskaya 139). When plants were 7-day-old, they were treated with protonophore cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) by its addition to the nutrient solution to yield 10⁻⁵ M concentration. Root tips (5 mm length) were fixed for cytokinin immunolocalization 1 h after plant treatment with CCCP. Differential detection of free cytokinin bases and their ribosylated forms was based on different methods of their conjugation to proteins prior to tissue dehydration. Ribosylated forms of cytokinins were conjugated with the help of sodium meta-periodate that activates sugar hydroxyl groups by their oxidation enabling binding to proteins. A mixture of aldehydes was used for conjugation of free cytokinin bases. Since after conjugation of ribosylated cytokinins with the help of periodate, tissues were post-fixed with the mixture of aldehydes, this procedure may result in binding not only ribosides, but also free cytokinin bases. Conjugation of free bases to proteins was prevented by an increase in pH of solution during the treatment of the leaf tissues with the mixture of aldehydes.

We detected intensive immunostaining for zeatin and its riboside in root tip cells. Immunolabeling of the cytokinins (both zeatin and zeatin riboside) decreased with the distance from the root tips and cells enlargement the effect being best noticeable in root cortex tissues. Immunolocalization of zeatin riboside revealed intensively labeled cell rows inside the central cylinder. Their localization along the central cylinder coincided with the location of developing vessels that was in accordance with assumed transport function of ribosylated form of zeatin. Incubation of the wheat plants in solution of protonophore CCCP sharply decreased immunostaining for zeatin of root cells. Thus maintenance of zeatin location inside the cells depended on generation of proton gradient that was likely to keep zeatin inside the cells. Inhibition of secondary active trans-membrane transport by protonophore slightly decreased immunostaining for zeatin riboside although the extent of the effect was less than in the case of immunostaining for zeatin. The decline in zeatin riboside immunostaining under protonophore treatment was better noticeable in the root cortex and root cap but its intensity was not lower than in the control (without CCCP) in the tissues of root central cylinder. This phenomenon can be explained by fact that the central cylinder is the site of cytokinins synthesis in the form of hydrophilic riboside containing compounds characterized by lower diffusion capacity through membrane thereby keeping them inside the root cells under CCCP treatment.

Resistance of different potato cultivars against latent infection of *Fusarium* spp.

¹Akosah Y.A., ¹Malova A.V., ¹Hadieva G.F., ¹Lutfullin M.T., ²Vologin S.G., ¹Mardanov A.M.

¹Institute of fundamental medicine and biology of Kazan Federal University, Kazan, Russia

²Tatar Research Institute of Agriculture, Kazan, Russia

E-mail: akosah2005@gmail.com

Dry rot, a common disease of potatoes caused by *Fusarium* sp. can reduce potato yield by about 60%. Post harvest losses in potatoes due to latent infections of *Fusarium* can approach 40%, with 5-10% losses common in even the most modern and well-managed storage facilities.

We studied the fungal microbiome of potato rhizosphere and conducted a comparative analysis of the abilities of different cultivars of potato (*Solanum tuberosum*) to withstand latent infection of *Fusarium*. As objects of study, we used tubers of the potato cultivars: Vega, Wendy, Gala, Zhuravinka, Zhukovskiy, Sharpo-Mira, Zekura and Red Scarlett. The cultivars had been cultivated for about 70 days, harvested in early August and kept in a storage facility at 4°C for 100 days. Tubers taken from visually healthy potato plants were assigned to the control group, whereas experimental samples consisted of tubers from plants with physical features of *Fusarium* wilt. The high prevalence of the genus *Fusarium* in the soil and rhizosphere stipulates the possibility of tuber infection during vegetation. Hence, DNA was isolated for the analysis of fungal microbiome from 6 potato rhizosphere samples of the cultivar Zhukovskiy. The ITS regions of 5.8S rRNA gene in fungal DNA was amplified using the polymerase chain reaction technique and sequenced by the Illumina MiSeq platform. The sequence data were further analyzed using the bioinformatics pipeline QIIME, version 1.9.1. Taxonomy was assigned for a single representative sequence from each clustered OTU using uclust and UNITE database for fungal gene fragments. After the analysis of the metagenome, fungal communities were classified into 6 phyla, 31 classes, 91 orders, 191 families, and 329 genera. Ascomycota, Basidiomycota and Zygomycota were the 3 phyla dominant in the potato rhizosphere, accounting for 98-99% of the all fungal taxa. Sordariomycetes, Dothideomycetes and Eurotiomycetes were dominant in the class Ascomycota with respective prevalence of 43.84%, 15.04% and 12.73% in the rhizosphere. Agaricomycetes and Tremellomycetes were dominant in the class Basidiomycota with frequencies 1.9% and 6.32%. Mortierellomycotina and Mucoromycotina dominated the class Zygomycota with occurrence of 3.58% and 3.66%. *Fusarium* population in samples of the rhizosphere varied, but averagely, they comprised 10.3%. Investigating latent infection involved the isolation of fungi from 10 tubers per cultivar by conventional microbiological methods. No isolates were obtained from the control samples. Among the experimental cultivars, Sharpo-Mira, Zekura and Gala showed resistance to latent infection in tubers. A latent strain of *Alternaria* sp. was obtained from Wendy and a total of 8 strains (2 strains of *Fusarium* sp. per variant) were isolated from the remaining cultivars. Primary identification of isolates was carried out using morphological features on Czapek Dox Agar (color, growth pattern of the mycelium, the presence and form of micro- and macroconidia as well as the formation of exudate). The predominant appearance of a whitish cottony aerial mycelium with the presence of fusiform and sickle-shaped macroconidia as well as ovoid and curved microconidia indicated the possible affiliation of these micromycetes to the genus *Fusarium*. Growth rate of isolated strains was studied by measuring their colony diameter. After 7 days of incubation at 25 °C on Czapek Dox Agar, isolates did not show any signs of pigmentation, but those from Zhuravinka exhibited the fastest growth rate with a mean colony diameter of 3.30cm, whereas the lowest growth rate of 1.65cm was observed in isolates from Zhukovskiy. DNA isolation and analysis of the ITS regions of the 5.8S rRNA gene will be carried out for further molecular characterization of the isolates associated with latent infection.

This work is performed in accordance with the Russian Government Program of Competitive Growth of Kazan Federal University.

Amyloid-forming proteins of bacteria of the order Rhizobiales are involved in pathogenesis and plant-microbial interactions

^{1,2}Antonets K.S., ^{1,2}Kliver S.F., ^{1,2}Nizhnikov A.A.

¹All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia

²St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

E-mail: kirantonez@gmail.com

Rhizobiales represent one of the most significant for agriculture and biotechnology group of prokaryotes including various species of root nodule bacteria that fix atmospheric nitrogen and form symbiosis with leguminous plants as well as pathogenic for plants and animals species. Due to the importance of symbiosis to the life of root nodule bacteria, their proteomes contain many proteins responsible for plant-microbial interactions.

Recently, it was shown that some proteins of another group of bacteria, Enterobacteriaceae, are involved in biofilm formation and host-pathogen interaction form amyloids and are functional in this state.

Amyloids are highly physically and chemically stable protein fibrils with monomers bound together with intermolecular β -sheets. Amyloids are widely known as the lethal pathogens causing dozens of incurable diseases of humans and animals, but there are also a number of functional amyloids implicating various vital biological functions in a wide range of organisms, from archaea and bacteria to humans. Most of the amyloid-forming proteins harbor characteristic features in their sequence: short amyloidogenic hydrophobic regions or extended sequences enriched with amyloidogenic amino acids like asparagine and glutamine (QN-rich).

We used Waltz tool and SARP algorithm to find both types of amyloidogenic regions in the proteins of Rhizobiales bacteria. 86 proteomes of different species of Rhizobiales were analyzed. As a result, we found that from 11 to 22% proteins contained short amyloidogenic regions predicted with Waltz and up to 1.4% of proteins in the proteomes of Rhizobiales harbored QN-rich regions found with SARP. Regions predicted with Waltz were most prevalent in transmembrane proteins involved in transport and secretion, while QN-rich sequences were abundant in a broad range of pathogenesis-associated proteins, e.g. LptD-like and YadA-like proteins, hemolysin-like and flagellar proteins. Some of these proteins represent virulence factors which are important not only for pathogenesis but are also implicated in symbiosis. For example, proteins with LptD-like domains participate in the surface lipopolysaccharide production that is involved in virulence and symbiosis. Proteins with hemolysin-like domains include rhizobiocins, the calcium-dependent toxins that protect Rhizobiales from other bacterial species and affect the effectiveness of symbiosis. Thus, considering similarities in the molecular mechanisms of pathogenesis and symbiosis, we propose that formation of amyloids by these proteins might play functional role in the processes of host roots infection and invasion during formation of plant-microbial symbiosis.

This study was supported by the Russian Science Foundation (Grant No 17-16-01100).

Effect of bacteria titer on the results of biotesting their growth-regulating activity under conditions of heterotrophic plant nutrition¹Arkhipova T.N., ¹Kuz'mina L.Yu., ¹Kudoyarova G.R., ²Veselov S.Yu.¹Ufa Institute of Biology UFRC RAS, Ufa, Russia²Bashkir State University, Ufa, Russia*E-mail: TNArkhipova@mail.ru*

The promising nature of biotechnology based on increasing crop yield and plant resistance with the help of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) determines the urgency of the search for new and more effective strains. The ability of PGPR microorganisms to stimulate plant growth depends on their production of phytohormones. Although the evaluation of the ability of bacteria to accumulate phytohormones in their culture liquid can be used for the initial selection of promising strains, there was no direct correlation between the level of production of phytohormones *in vitro* and their growth stimulating effect on plants *in vivo*. These results indicate the necessity to test the growth stimulating action of bacteria directly on plants demanding application of simple primary biotests. The object of the study was a soil cytokinin-producing bacteria *Paenibacillus ehimensis* IB 739 from the collection of the UIB RAS. Biotesting the plant growth promoting activity was carried out by treating seeds of wheat (*Triticum aestivum*, cv Omskaya 35) with the initial bacterial suspension (titer 5.1×10^5 cfu/seed), its ten times diluted sample (titer 3.3×10^4 cfu/seed), culture liquid (titer 1.2×10^2 cfu/seed) and bacterial biomass diluted as described above (titer 5.7×10^4 cfu/seed). Wheat seeds were placed in Petri dishes and germinated in the dark at 23°C for 3 days on sterile tap water or 100 mM NaCl. The length and mass of roots and shoot of wheat seedlings were estimated. Treatment of seeds by the initial bacterial suspension with the highest titer had a negative effect on the plant growth, which was most clearly manifested in the absence of stress (the mass of roots and shoot was less in comparison with the control by 33 and 19% respectively), while root mass was by itself also inhibited under salinity. Ten-fold dilution of the initial bacterial suspension was accompanied by the manifestation of its ability to stimulate plant growth. This was clearly manifested in the increase in mass (1.7 - 1.8 times) and the length of the roots (2 times) in both variants of the experiment. Treatment of seeds with bacterial biomass without the culture liquid resulted in only a 1.5-fold elongation of the roots compared to the control in the absence of salinity. The growth stimulating effect of the purified bacterial biomass on the root length was not manifested in the presence NaCl. The same regularity was observed, when assessing the mass of roots. These results indicate growth-promoting activity of the components present in the culture liquid manifested in the root growth stimulation, to greater extent in the presence NaCl. Treatment of the seeds with a culture liquid without the cells also stimulated the growth of the roots of wheat plants as suggested by the increase in their length and mass. The stimulating effect was the same as in the case of treatment with microbe biomass but lower than in the case of the treatment of seeds with a diluted bacterial suspension in the absence of salinity. The promoting effect of the culture liquid on the root growth was observed not only in the absence of salinity, but also under stress conditions. This was different from the action of purified bacterial mass, whose stimulating action on the roots was detected only the absence of stress. These data indicate that both bacterial cells and cultured fluid affect the results of biotesting, and both of these components should be present during the testing of bacterial preparations. Thus our results show that the primary biotesting of the potential ability of bacterial preparations to stimulate plant growth under both optimal and stress conditions can be carried out on seedlings grown in the dark. The necessity of diluting initial bacterial preparation should be also emphasized. These conditions do the process of biotesting simpler.

This work was supported by RFBR Grant № 18-04-00577 A.

Aquaculture and introduction of water caltrop *Trapa sibirica* Fler. (Lythraceae) in the Republic of Bashkortostan¹Artyukhin A.E., ²Mikhaylova E.V., ^{1,2}Kuluev B.R.¹Bashkir State University, Ufa, Russia²Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, Ufa, Russia*E-mail: mikhele@list.ru*

Water caltrop *Trapa* L. is an annual aquatic plant, endangered in many regions of Russia. It is in the Red Book of The Republic of Bashkortostan, where it can be found only in two lakes - Upkankul and Bilgilyar. On the basis of the results of RAPD and ISSR analysis, we suggest that local population most probably belongs to the species *Trapa sibirica* Fler. We did not find any genetic polymorphism between the populations in these two lakes. The fruits of water caltrop are edible and have better nutrient composition than potato. They can even be used to replace real nuts due to the import substitution plan. However, in Russia this plant is not grown in culture anymore, and the growth environment is completely forgotten.

In order to find optimal conditions for the growth of *T. sibirica*, we studied the lakes Upkankul and Bilgilyar, as well as 15 nearby lakes. We found that pH in the two habitats was around 6,7-6,8, however in other reservoirs it varied mostly from 7,5 to 8,9. The temperature in them was also a little lower, than in Upkankul and Bilgilyar. In the lake Bilgilyar the mineral nutrition was rather poor, which could affect the size of the leaves and fruits of *T. sibirica* and the amount of the plants. We found only 28 plants there, however in Upkankul there were more than 5000 plants, and they were nearly twice bigger.

We planted the fruits in aquarium on the putrid mud with pH 6, and 90% of them successfully germinated and flowered. In aseptic conditions and on the sand fruits did not germinate, probably because of the lack of organic compound. We also introduced the fruits in the nearby lakes with most appropriate conditions in May 2018.

Mechanisms of adaptation of associative symbiosis of peas with rhizosphere microorganisms to toxic aluminum

¹Belimov A.A., ¹Shaposhnikov A.I., ¹Azarova T.S., ¹Makarova N.M., ¹Puhalsky J.V., ¹Loskutov S.I., ¹Sekste E.A., ¹Kichigina N.E., ¹Sazanova A.L., ¹Safronova V.I., ²Vishnyakova M.A., ²Semenova E.V., ²Kosareva I.A.

¹All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia

²N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources, Saint-Petersburg, Russia

E-mail: belimov@rambler.ru

In the circumstances of increasing anthropogenic pollution of agricultural landscapes and the presence of large areas with high soil acidity, especially important to search for environmentally friendly and energy-efficient approaches to produce consistently high yields and provide the population with quality food. Therefore, scientists around the world conduct intensive basic research aimed at the selection of resistant plant genotypes, the disclosure mechanisms of metal tolerance and accumulation, as well as the study of the processes involved in transformation of toxic elements in soil and rhizosphere. Of particular importance and urgency to address this complex problem are studies related to the interaction of plants with soil microorganisms, as microorganisms are a key element in the transformation of nutrients and toxic elements in soil and form different types of symbiosis, which play an important role in plant mineral nutrition and adaptation to the environment. This report is aimed at reviewing and understanding the mechanisms of eco-chemical interactions and integration of plant-microbe symbiotic partners in the presence of toxic aluminum, which are mediated by biotic factors of transformation the elements in the rhizosphere, root exudation of low molecular weight compounds (organic acids, sugars and amino acids), genotype dependent responses to stressful conditions and plant growth stimulation. The objects of the experimental research were specially selected components of plant-microbe systems, namely pea (*Pisum sativum* L.) genotypes contrasting in tolerance to aluminum. For this purpose a intraspecies variability of pea in tolerance to and accumulation of aluminum was studied in details using hydroponics. A new methodological approach for selection of PGPR based on their ability to increase the pH of the environment and immobilize toxic aluminum in the rhizosphere was implemented. The new strains were identified, characterized and deposited in the Russian Collection of Agricultural Microorganisms (RCAM, St.-Petersburg, Russia). The impact of PGPR on plant growth, uptake of aluminum and nutrients and symbiosis of plants with nodule bacteria or mycorrhizal fungi, as well as and the possibilities of using plant-microbe systems for sustainable agriculture under adverse soil conditions caused by high acidity and aluminum toxicity will be discussed. The work was supported by the Russian Science Foundation (grant 14-16-00137).

Methyl jasmonate and 20-hydroxyecdysone application for activation of potato plants defense systems¹Benkovskaya G.V., ²Mardanshin I.S., ¹Sorokan A.V., ³Savchenko R.G., ¹Nikonorov Yu.M.¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa, Russia²Bashkir Institute of Agricultural Science, Ufa, Russia³Institute of Petrochemistry and Catalysis, Ufa, Russia*E-mail: bengal2@yandex.ru*

Perceptions of tools for number control of phytophagous insect pests are closely related to environmental safety. Impetuous expanding of insecticides spectrum doesn't solve the problem of safety. Understanding of necessity to use natural defense mechanisms of plants is more evident today. Human role in plant protection - assistance in organizing conditions for full realization of the plants protective capacity. First of all, it regards to selection and breeding of new varieties resistant to attacks of pests and pathogenic microbes. Taking into account the importance of plant cultivars in ecosystem we need to evaluate possible consequences of intensification the inducible defense in plants which can change interactions between other members of ecosystem, microbionts as well as macrobionts. New varieties of potato, Baschkirsky and Burnovsky created in Bashkir Institute of Agricultural Science have been included into the State Register of Selection Achievements of the Russian Federation. These varieties differing by barrier mechanisms depending on rate of signal systems working display remarkable distinctions in effectiveness of insecticides application for potato yield protection. To continue our investigations we have compared potato varieties with different mechanisms of resistance by reactivity toward the exogenous inductor of plant defense response methyl jasmonate (MJ) and insect development steroid regulator 20-hydroxyecdysone (20E). Evaluation of their impact on survival and development rate of Colorado potato beetle larvae under the laboratory conditions showed not only the difference in cultivar's effects, but also contrary results of MJ and 20E application. Under the field conditions MJ reduced the number of egg batches on plants of varieties Nevsky, Udacha and Zhukovsky. Affect of MJ and 20E on the Colorado potato beetle instars structure depended on the varietal difference too. There were not any younger larvae on Lugovskoy plants 7 days after treatment, and 20E delayed larval development on this variety. Similar change of structure caused by application of MJ and 20E on Nevsky and Zhukovsky plants. Thus, in the most cases use of MJ and 20E enhanced the sensibility of I-III instars larvae to barrier properties of potato. MJ enhanced defense properties of potato plants, decreasing larvae number on all varieties beside most resistant Baschkirsky and Zhukovsky plants. The effect of pest number reducing after 20E application observed for plants Lugovskoy and Burnovsky, whereas 20E weakened defense properties of Udacha and Baschkirsky plants. Recently obtained results of analysis of microbial community in the Colorado potato beetle's gut showed very high sensitivity of insect's microbiom to the host plant features and its ability to display high plasticity level during the development. Usage of elicitors and regulators of defense reactions in plants and phytophagous insects will allow us to choose the most adequate approach to protect the concrete potato variety.

Investigations funded by RFBR – Bashkortostan Republic, № 17-44-020347-r_a.

Effect of the biofertilizer based on silicate solubilizing bacteria on the photosynthetic apparatus of *Brassica juncea* (L.) Czern.

Borisova G.G., Maleva M.G., Koshcheeva O.I., Sedyayeva O.V., Panikovskaya K.A.

Department of Experimental Biology and Biotechnology, Institute of Natural Sciences and Mathematics, Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia

E-mail: borisova59@mail.ru

Silicate solubilizing bacteria (SSB) can play a substantial role in solubilizing non available forms of silicates as well as phosphates and potassium, hence increasing soil fertility and plant productivity.

The aim of this study was to investigate the influence of SSB-enriched biofertilizer (SSB-EB) on the structural and functional photosynthetic parameters in wild and cultural forms of *Brassica juncea* (L.) Czern.

Photosynthesis is the key metabolic pathway, which determines growth and development of plants. Assimilation activity of leaves is closely related to their structure and the content of photosynthetic pigments.

The pure culture of SSB was isolated from the clay substrate, cultivated on Zak–Alexandrov medium and identified as *Bacillus* sp. To obtain the biofertilizer, SSB culture (0.6×10^8 cfu mL⁻¹) was mixed with sterilized peat (1:1, v/w) and dried at 35–40 °C. *B. juncea* plants (wild and cultured forms) were grown from seeds during two months in the pots with adding SSB-EB to the clay substrate (1:10 w/w). Mature leaves were used for the experiments. The clay substrate plus peat without SSB were used as a control.

The content of total phosphorus in *B. juncea* leaves was determined spectrophotometrically at a wavelength of 680 nm after wet digestion with the mixture of sulfuric and perchloric acids. The content of potassium was determined using the atomic absorption spectrometry (AAS Vario 6, “Analytik Jena”, Germany) after wet digestion with 70% HNO₃ (analytical grade). Leaf mesostructure parameters were determined in 20 replicates. Transverse slices of leaves were obtained using a freezing microtome MZ-2 (Russia). A computer-assisted protocol based on Simagus Mesoplant software (OOO “Siamz”, Russia) and light microscope (“Meiji Techno”, Japan) were used to determine the quantitative parameters of mesophyll cells and chloroplasts. Leaves were preliminary macerated with 5% chromic acid dissolved in 1 N HCl. The pigment content was determined in 96% ethanol according to Lichtenthaler (1987) using PD-303 UV spectrophotometer (“Apel”, Japan).

It was found that adding SSB-EB to clay substrate increased the content of total phosphorus and potassium by 20 and 25%, respectively. The number of mesophyll cells per unit leaf area in *B. juncea* leaves (in both forms) was significantly higher when the SSB-EB was added (by 20 % in average), than in the control plants. A similar trend was observed for chloroplasts, their number per unit area was increased by 10% in average, which led to growth of plastid material volume. When the SSB-EB was added, an increase in the surface index of cell and chloroplast membranes was also observed, that can provide an upsurge in the conduction of the mesophyll for carbon dioxide.

The content of photosynthetic pigments in both forms of *B. juncea* was significantly increased with the addition of SSB-EB. The amount of total chlorophyll in cultural form of *B. juncea* was increased higher (by 70% to control) than in wild form (by 30%), while initially its content in wild form leaves was higher (1.8 times) than in cultural. The ratio between photosynthetic pigments with the addition of SSB-EB did not change significantly.

Addition of SSB-EB enhanced the solubilization of clay silicates resulted in the increase in available phosphorus and potassium content in substrate, which further improved the growth of *B. juncea*.

The study concludes that adding SSB-EB to clay substrate can improve the photosynthetic function of plants via structural and functional changes of assimilation tissue of *B. juncea* both in wild and cultural forms.

Hence the SSB-EB can be used as fertilizer for reclamation of disturbed lands, as well as for increasing the productivity of agricultural crops.

The work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (agreement No 02.A03.21.0006).

Screening of endophytic bacteria *Bacillus* spp. produced antifungal lipopeptides

Burkhanova G.F., Cherepanova E.A., Blagova D.K., 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: guzel_mur@mail.ru*

Improving agricultural crops productivity in the modern world involves the use not only of chemical, but also biological agents of plant protection. Biocontrol involves the use of naturally occurring nonpathogenic microorganisms that are able to reduce the activity of plant pathogens and thereby suppress diseases. Of particular interest are endosymbiotic bacteria, for example the genus *Bacillus* spp. that live in internal plant tissues of apparently healthy host plants. Some endophytic bacteria are able to systemically prime the plant's immune system. The mechanism of biological agents' action is involved in disease suppression by endophytic bacteria, viz. production of metabolites with antibiotic properties. Lipopeptides produced by microorganisms are one of the five major classes of biosurfactants and they have received much attention from scientific communities.

A screening assay and selection of efficient endophytic bacterial antagonists of the genus *Bacillus* spp. which can produce lipopeptides. In this investigation, were used the strains *B. subtilis* 26D (collection ARRIAM St.-Pb. Pushkin, №128), *B. subtilis* 11VM (ARRIAM №519), *B. thuringiensis* 10 (Russian National Collection of Industrial Microorganisms, B-6066), and isolates bacteria *Bacillus* №1 and №8-2, isolated from wheat, zoned in the Republic of Bashkortostan. Previously, it was shown that all the strains studied had endophytic properties to wheat plants. In the experiments, strains *Fusarium culmorum*, *Helminthosporium sativum*, *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans* from the collection of the Plant Immunity Biochemistry Laboratory of IBG RAS were used. Our results identify the surfactin gene (NCBI EU882341) in *B. subtilis* 26D, *Bacillus* №1 and № 8-2. The iturin A biosynthesis gene (D21876) was present in *B. subtilis* 11BM. Whereas the fengicin synthetase gene (AJ011849) was detected in *B. thuringiensis* 10. From each strain lipopeptides were isolated and their antifungal activity was studied. It was shown fungicidal action to *H. sativum* had 4 strains: *B. subtilis* 11BM, *B. subtilis* 26D, *Bacillus* № 1 and № 8-2. In relation to *Ph. infestans* antagonistic activity was exhibited by strains of *B. subtilis* 11BM, *B. subtilis* 26D, *Bacillus* № 8-2 and *B. thuringiensis* 10. It is important to note of all the strains studied only *B. subtilis* 11BM showed antifungal activity to all four pathogens, but more to *F. culmorum* and *H. sativum*, to a lesser extent to the other two. The remaining bacterial strains displayed selectivity for pathogens. Thus, *Bacillus* № 8-2 most strongly inhibited the growth of *Ph. infestans*, and *B. subtilis* 26D - *H. sativum* and *Ph. infestans*, but didn't affect *F. culmorum* and *A. solani*. *B. thuringiensis* 10 slightly reduced the growth rate of *Ph. infestans*, but did not affect the rest of the pathogen. *Bacillus* № 1 also slightly inhibited the growth of only one fungus - *H. sativum*.

Thus, among the strains studied were detected bacteria with antifungal activity to a number of fungi. The greatest influence on pathogen growth was exerted by strains *B. subtilis* 11BM, to a lesser extent - *B. subtilis* 26D, *Bacillus* № 8-2 and *B. thuringiensis* 10. It has also been shown *B. subtilis* 11BM contains *ituA* gene, *B. subtilis* 26D and *Bacillus* № 8-2 is *srf* gene, *B. thuringiensis* 10 is *fen* gene. The endophytic microorganisms studied in this report require further study and may become basis for creation of biological agents for plant protection.

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).

The adaptive potential of winter wheat to the effects of heavy metals under application the complex of microbial preparations

Chaikovskaya L.A., Baranskaya M.I., Ovsienko O.L., Klimenko N.N.

Federal State Budget Scientific Institution "Research Institute of Agriculture of Crimea", Russia

E-mail: baranskaya@rambler.ru

One of the widespread pollutants for environment are heavy metals (HM): they cause significant harm for its different components, in particular to the soil. By joining the trophic chain, HM change the intensity of metabolic processes of plants, which reduces their productivity and crop quality. It is known that under the influence of adverse factors, in particular HM, the formation of active forms of oxygen increases in cells: there is oxidative stress, which can lead to death of the organism. Plants have various effective systems of protection against oxidative stress: they synthesize antioxidants and enzymes that eliminate toxic oxygen radicals. At the same time, it is known that microorganisms are intermediaries between soil conditions and plants and can significantly increase the stability of the macrosymbiont to stress. That is why the search for techniques that increase the resistance of plants to the negative effects of HM, does not lose relevance. Application of microbial preparations on the basis of bacteria with a complex of useful properties is an important aspect of modern agriculture biologization. In light of the above, the aim of our research was to study the effect of seeds presowing bacterization on the formation of adaptive potential of winter wheat on the early stages of development in soil pollution by HM (Pb, Cu, Cr) in the conditions of vegetation experience.

The plants were grown for 6 weeks, the soil - southern carbonate heavy-loamy chernozem. The pots were filled with the soil and HM salt solutions following levels of contamination: 1 MPC; 2,5 MPC and 5 MPC. In the control variant HM were not applied. For seeds presowing inoculation used complex microbial biopreparations (CMB): Diazophit, Phosphoenterin, Biopolicid. The seeds in control were not bacterized. Sampling of plants for analysis was carried out three times: 2, 4 and 6 weeks after germination.

It was found that the content of glutathione was the most clear indicator characterizing the stress effect of HM on juvenile plants of winter wheat: the presence of HM in the soil led to increase of its quantity in the leaves. Thus, in 2-week wheat plants glutathione content in leaves was 21.5 mg % (control). Soil pollution of HM at level 1; 2,5 and 5 MPC led to an increase in glutathione content in wheat leaves to 29,8; 97,3 and 139,4 mg%, respectively. Subsequently (after 4 and 6 weeks) this trend has continued. It should be noted that presowing inoculation contributes to decrease the content of glutathione in leaves of wheat. In our opinion, this indicates an increase in the adaptive potential of bacterized plants to HM and less intensive development of oxidative stress. Thus, soil pollution of HM at the level of 1 MPC led to decrease in the content of glutathione in the leaves of bacterized plants compared to not bacterized by 26%, 13% and 7% (2-, 4- and 6-week plants, respectively). On backgrounds 2,5 and 5 MPC HM similar action of inoculation is revealed: decrease in the content of glutathione in leaves on 15-30% and 5-20% respectively in different periods of sampling is noted. Thus, it was established that bacterized plants of winter wheat are more resistant to oxidative stress.

The inhibitory effect of HM on the productivity of young plants of winter wheat was also revealed: their mass decreased from 0.29 g/1 plant (control) to 0.07 g/1 plant on the background of 5 MPC TM. Presowing bacterization contributed to increasing the mass of plants. Thus, the backgrounds of TM (1, 2.5 and 5 MPC), it amounted to 0.30; 0.29 and 0.09 g/1 plant, respectively, which exceeded the indicators of control options to 7-48%.

Thus, it was shown that the use of microbial preparations for presowing inoculation of winter wheat seeds contributes to the adaptive potential of young plants and increase their productivity in soil pollution.

The influence of microbial preparations on the content of copper in the rhizosphere of winter wheat and its grain

Chaikovskaya L.A., Ovsienko O.L.

Federal State Budget Scientific Institution "Research Institute of Agriculture of Crimea", Simferopol, Russia

E-mail: ludachaika@mail.ru

In modern processes of environmental pollution the priority role belongs to heavy metals (HM). They have different ways of entering to natural and agro ecosystems: discharge of factories and plants, motor vehicle emissions, the use of chemical plant protection products, etc. As a result, HM accumulated in the soil and hydrosphere, as well as migrate into the plants grown in contaminated areas. It is possible to reduce the toxic effect of HM in the conditions of agrophytocenosis in the transition to biological agriculture, one of the methods of which is the use of environmentally friendly microbial preparations. It is known that included in their composition beneficial microorganisms improve the growth and nutrition of crops, and also have protective properties, defending plants from pesticides and stress.

The aim of our research was to determine the effect of presowing inoculation on the content of copper in the rhizosphere of winter wheat and its migration into the plants in model field experiments.

Field studies were conducted at the experimental field of the Crimean agro-industrial College (Simferopol district). Soil – southern low-humus carbonate chernozem. The replication of experiments – 4-fold. Culture – winter wheat. The area of experienced plots was 5 m², their placement is randomized. The CuSO₄ solution was added before laying the experiment in the soil from the calculations corresponding to the contamination levels: 5, 10 and 20 MPC. The control variant didn't contain Cu. For presowing inoculation of wheat seeds, a microbial preparation Phosphoenterin was used, the seeds were moistened with water in the control. Determination of the quantitative content of water-soluble forms of copper in the soil and plants (seeds) was carried out by atomic absorption analysis according to the methodological guidelines of GOST for the determination of HM in soils of farm land and crop production.

The analysis of the obtained results showed that the background content of Cu in the soil of the experimental site was 0.59 mg/kg and did not exceed the permissible values of MPC (6 mg/kg). There was a trend to reduction in background contamination of soil in the rhizosphere of wheat plants bacterisated. Pollution of the HM soil led to a significant increase in the level of rhizosphere contamination by water-soluble compounds of copper. Thus, their content exceeded the permissible value of MPC 3, 7 and 12 times against the background of 5, 10 and 20 MPC, respectively. The use of Phosphoenterin for presowing inoculation allowed reducing the concentration of Cu in the rhizosphere of bacterisated plants in comparison with the control: 4, 1.5 and 3 times and amounted to 4.8; 30.7 and 24.9 mg/kg on the background of 5, 10 and 20 MPC, respectively. It should be noted that despite significant fluctuations in the amount of water-soluble copper compounds in the rhizosphere of winter wheat on the background without introducing Cu and at different levels of pollution, their content in grain did not exceed MPC (for grain 10 mg/kg) and was 5,64 – 7,65 mg/kg. Thus, it was found that the use of microbial preparation Phosphoenterin for presowing inoculation of seeds contributes to the reduction of water-soluble copper compounds in the rhizosphere of bacterized plants. There was no noticeable effect of inoculation on the content of water-soluble copper compounds in winter wheat grain.

Microbial diversity of endophytes from wooden plants as promising biotechnological source for agriculture

Chebotar V.K., Shcherbakov A.V., Shcherbakova E.N., Mulina S.A., Tsukanova K.A., Zaplatkin A.N.

All Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia

E-mail: vladchebotar@rambler.ru

Microbiome of seeds and vegetative parts of conifers (Norway spruce, Scots pine, European larch) plants has been studied. It is shown that at the level of phyla dominated by the representatives of Proteobacteria and Actinobacteria. The most interesting results of microbiome analysis of coniferous plants seeds was obtained at the level of families. For Norway spruce found that the diversity of endophytic bacteria in the composition of the microbiome is small and is determined by two main families: Enterobacteriaceae, and Comamonadaceae, which presented in the composition of the microbiome of the seeds from the Republic of Tatarstan and the Republic of Mari El.

Analysis of species diversity of bacteria in the microbiome composition of the vegetative parts of conifers showed similarity to the microbiomes of endosphere of seeds of conifers. It is shown that the composition of the endophytic microbiome of the vegetative parts of conifers found not more than 2-3 species of bacteria that belong to the same families that were found in the seeds. To study the sites of colonization of endophytic bacteria in the internal tissues of plants labelled strain of *Pseudomonas* sp. 2ES+dsRED has been designed. It was studied the spatial localization of endophytic microorganisms in plants using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and with the help of dsRED -labeled strain.

It was established that the cells of the bacteria *Bacillus atrophaeus* 14 actively settled endosperm of wheat, lying in its conductive tissues. Cells of bacteria *Pseudomonas* sp. 2ES+dsRED were localized in the porous vessels of the shoots of grapes, lying single or in small clusters. Their ability to the circulation through the vessels of plants of grapes has been observed. In model experiments it was shown that endophytic bacteria are able to colonize the root surfaces and the rhizosphere of plants. In pot and field experiments the effectiveness of endophytic bacteria on grapes, oats and radishes was demonstrated. Thus, the increase in root length of plants oat radish increased by 43-100% in comparison with the control, and the grape harvest increased by 7.7%.

As a result of experiment with the transgenic line DR5-GUS of *Arabidopsis thaliana* changes in the amount and localization of auxin under the influence of metabolites in culture medium of bacteria were identified. The increase and change in localization of expression of DR5-GUS was observed under the action of metabolites of strains of *Bacillus subtilis* 6ES and *Pseudomonas asplenii* RMBD. Under the influence of metabolites of the standard strain *B. subtilis* Ch-13 small increase in the expression of DR5-GUS was detected only in the transition zone between the meristem and the zone of tension. In a solution of IAA at a concentration of 10⁻⁷M (0.17 µg/ml) increase of GUS expression was strongest. Thus, on the basis of obtained data we can conclude that not all indole compounds identified in culture medium of strains are biologically active auxins.

Technological parameters for cultivation of 5 promising strains of endophytic bacteria have been studied. Temperature and pH optima for cultivation of five promising strains of endophytic bacteria were selected. Composed and optimized nutrient medium for the cultivation of the studied strains of endophytic bacteria as a result of experiments. In experiments for study of fungicidal properties of bacterial suspensions of tested strains produced on optimized culture medium it was shown that the optimized medium has a beneficial effect on the production of antifungal metabolites. The work was carried out within the framework of the study using the means of subsidies of the Ministry of education and science of the Russian Federation (agreement No. 14.601.21.0016, unique identifier of the agreement: RFMEFI60117X0016).

***Bacillus subtilis* metabolites in modulation of wheat resistance to pathogenic fungi**¹Cherepanova E.A., ¹Burkhanova G.F., ²Miranda Chikurova N.C., ¹Maksimov I.V.¹Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia²Bashkir State University, Ufa, Russia*E-mail: k_cherepanova@mail.ru*

Researches in our laboratory have shown earlier that endophytic strains of *Bacillus subtilis* induce an explicit protective effect on wheat leaves infected with *Stagonospora nodorum* Berk, which causes wheat leaf and glume blotch. The ability of endophytic bacteria from the genus *Bacillus* sp. to suppress the development of pathogenic microflora and to degrade pathogen produced toxins, as well as their high growth-regulating activity, is related to the bacterial production of bioactive metabolites. Among these metabolites, cyclic lipopeptides are of particular interest, since they have been shown to cause induced systemic resistance (ISR) in plants. It is widely known that the production of reactive oxygen species (ROS) in the plant cell dramatically increases in response to infection. ROS go through a chain reaction and in its last stage accumulate as hydrogen peroxide. The main enzymes involved in the regulation of hydrogen peroxide concentration are catalase and peroxidase. Peroxidase catalyzes the polymerization of phenolic compounds in a lignin barrier on the way of the fungi, preventing it from spreading to healthy cells. There are evidences of PR-gene enhancing activity of bacterial lipopeptides in plant cells. In this connection, the purpose of this research is to study the effect of lipopeptide-rich fraction from *B. subtilis* strain 11BM metabolites on the generation of hydrogen peroxide, catalase and peroxidase activity and PR-genes (cat, LOX, PR-2, PR-6, PR-9) expression in wheat leaves infected with the hemibiotrophic fungi *S. nodorum* Berk. For this, a lipopeptide-rich fraction with a molecular weight less than 3 kDa was isolated by acid precipitation from a 3-day *B. subtilis* strain 11BM culture filtrate. The object of study were soft spring wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves of the cultivar Kazakhstanskaya 10, which is susceptible to *S. nodorum* leaf and glume blotch. 6-day wheat seedlings leaves were sprayed with solutions of lipopeptides of different concentrations (from 0 to 250 $\mu\text{g/ml}$), and infected with a suspension of a spores (10^6 spores/ml) virulent strain *S. nodorum* from the laboratory collection 24 hours after. The leaves were fixated 24, 48 and 72 hour after being infected. Non-infected wheat leaves were used as a control group.

Our results showed that high concentrations of lipopeptide induces plant susceptibility to the pathogen attack, demonstrated by wider necrotic zones on the leave surface and unbalanced protection system. Spraying the leaves of wheat with a solution of the lipopeptides at a concentration less than of 50 $\mu\text{g/ml}$ resulted in a reduction already 24 hour after infected catalase activity, the increase in the concentration of hydrogen peroxide and increased the activity of peroxidase, the increase of the expression the genes encoding of peroxidase, lipoxygenase and PR-6. Thereby, the use of low concentrations of lipopeptides from *B. subtilis* strain 11BM leads to a moderate stimulating effect on the protective enzymes and the PR-genes, which was demonstrated 5 days after infection by smaller necrotic stains as compared to leaves not treated with lipopeptides.

Undoubtedly, the speed of ROS generation plays a significant role in plant resistance to pathogens. However, only in case of the pro-/antioxidant system working harmoniously not only generating, but also degrading ROS, plants are able to build a successful line of defense against pathogens and maintain the vitality of their tissues.

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).

Endophytic bacteria from leaves optimization of isolation procedure and growing in different medium

Darkazanli M., Kiseleva I.

Ural Federal University, Institute of Natural sciences and Mathematics, Department of Experimental Biology and Biotechnologies, Yekaterinburg, Russia

E-mail: mdarkazanli@urfu.ru

The aim of this study was to isolate the endophytic bacteria and *Methylobacterium*, optimize its isolation procedure and check their ability to grow in different medium.

Ethanol, sodium hypochlorite, and mercuric chloride at various concentrations and duration were employed to optimize the surface sterilization for the isolation of endophytes from *Phaseolus vulgaris* (beans), *Pisum sativum* (peas), *Triticum* (wheat), and *Hordeum vulgare* (barley), and characterization of isolates were carried out by Nutrient agar, Methanol medium with 1% peptone, and *Methylobacterium* medium.

Combination of 2% sodium hypochlorite, and 70% ethanol, was found effective for the surface sterilization of wheat and beans but for different periods, In case of barley and peas, 0.2% mercuric chloride was found suitable for the surface sterilization.

In preliminary screening the bacteria grow good in Nutrient Agar, And for *Methylobacterium*, the methanol medium with 1% peptone is more suitable for bacteria than *Methylobacterium* medium.

Ethanol, sodium hypochlorite, and mercuric chloride were found effective decontaminating agents in optimum condition but for different time. In the preliminary screening diverse colony, different shapes, color, margins, and textures were observed, and the methanol medium with 1% peptone is more suitable for *Methylobacterium*.

Some approaches to the selection of diatoms

Davidovich N.A.

T.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve of the Russian Academy of Sciences, Kurortnoe, Feodosia, Russia
E-mail: karadag-algae@yandex.ru

Diatoms are perspective organisms for different biotechnological applications. Nowadays, reproductive biology of diatoms is sufficiently elaborated, and main principals of their breeding and classical selection have been formulated. In view of infraspecific variability, clones differ by their physiological and biochemical capabilities. The pennate diatom *Haslea ostrearia* (Bory) Simonsen is known because of species-specific water soluble blue pigment, marennine. Clones maintained in our laboratory are differentiated by the intensity of blue colour. In principal, production of target substances can be enhanced as a result of clone selection. Sexual reproduction is a key point of genetic manipulations implied by classical breeding approach. Many diatoms reveal heterothallic mode of reproduction, some of them strictly heterothallic. This suggests differentiation of sexes. Coexistence of sexually compatible clones allows planned breeding manipulations. In the aforementioned *H. ostrearia*, sexually compatible mating types (for convenience, "male" and "female") are morphologically indistinguishable. At the same time, we were able to interbreed them and isolate initial cells, i.e. a progeny of new generations. In the progeny, the clones were also differentiated by the marennine production ability. *H. ostrearia* is known from different parts of the Ocean. We maintained in a culture clones originated from distantly located populations. Mating experiment revealed sexual compatibility of some of them. The fact makes it possible to interbreed clones which gene composition may be not so different to prevent mating but sufficient to provide positive effect of hybridisation. The known genealogy of particular clones of *H. ostrearia* provides a good base for breeding experiments.

Following broader definition of plant breeding, we have to recognize that mutation and genetic engineering are also applicable procedures leading to gene composition changes, apart from classical selection. Discrepancy between these two principal approaches, i.e. classical breeding and genetic engineering consists in the way the new generations acquire new traits. In the case of artificial gene manipulation the genetic complex of a particular organism obtains new combination which may occur to be misbalanced. Classical selection also directed to genome modification but suggests sustainability of newly acquired gene compositions, resulted from sexual reproduction, gene reparation, and natural selection. Genetic engineering cannot substitute classical methods; contrary, the use of both approaches may provide positive complementary effect.

The diversity of actinorhizal symbiosis: cellular and molecular genetic mechanisms¹Demchenko K.N., ¹Ilina E.L., ²Pawlowski K.¹Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia²All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia*E-mail: demchenko@binran.ru*

Filamentous aerobic soil actinobacteria of the genus *Frankia* can induce the formation of nitrogen-fixing nodules on the roots of a diverse group of plants from eight dicotyledonous families, collectively called actinorhizal plants. Within nodules, *Frankia* can fix nitrogen while being hosted inside plant cells. Like in legume/rhizobia symbioses, bacteria can enter the plant root either intracellularly through an infection thread formed in a curled root hair, or intercellularly without root hair involvement, and the entry mechanism is determined by the host plant species. Nodule primordium formation is induced in the root pericycle as for lateral root primordia. Mature actinorhizal nodules are coralloid structures consisting of multiple lobes, each of which represents a modified lateral root without a root cap, a superficial periderm, and with infected cells in the expanded cortex.

An overview of nodule induction mechanisms and nodule structure is presented, including comparisons with the corresponding mechanisms in legume symbioses. The similarity between the infection thread growth mechanism in actinorhizal Fagales and legumes is supported by the fact that in both symbioses, the promoter of a nodule-specific subtilase gene from *Casuarina glauca*, cg12, is only active in infection thread-containing cells, indicating the conservation of a transcription factor in both symbioses. The infection thread growth mechanism in actinorhizal Cucurbitales is clearly different from the infection thread growth mechanism in actinorhizal Fagales and in legumes.

Independent evolutionary origins have been proposed for the actinorhizal symbioses in the three phylogenetic groups of its host plants. This is supported by the infection mechanisms which are consistent within the three groups. Many parallels exist between legume/rhizobia symbioses and actinorhizal Fagales, but parallels between legumes and actinorhizal Rosales or Cucurbitales are less obvious. This is interesting in that the newest phylogenetic studies showed Fabales as a sister group to (Rosales, (Fagales and Cucurbitales)), i.e., the similarities between legumes and actinorhizal Fagales cannot be explained by their phylogenetic position. Even in actinorhizal Fagales, phytohormone effects on nodule formation seem to differ from those in legumes, consistent with the differences in nodule structure in both systems. Actinorhizal Cucurbitales offer a unique opportunity to examine the differentiation of cells that can stably accommodate a eubacterial microsymbiont; however, it seems that at least their infection thread growth mechanism is different from that established in legumes and in actinorhizal Fagales. The fact that the mechanism of stably internalizing microsymbiont involves multinucleation might be correlated with the endoreduplication of infected cells in legume nodules.

This research was financially supported by the Russian Science Foundation (grant no. 16-16-00089).

Transcriptome of flax plants under unfavorable soil acidity and zinc deficiency

¹Dmitriev A.A., ¹Krasnov G.S., ¹Zyablitsin A.V., ^{1,2}Rozhmina T.A., ¹Novakovskiy R.O., ¹Kezimana P., ¹Kudryavtseva A.V.,
¹Melnikova N.V.

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²All-Russian Research Institute for Flax, Torzhok, Russia

E-mail: mnv-4529264@yandex.ru

Flax (*Linum usitatissimum* L.) is a widely distributed crop which is used for fiber and seed production. Cultivation of flax varieties, that are resistant to unfavourable environments, is required for obtaining stable and high yields, while understanding the mechanisms of flax stress resistance is necessary for the development of adoptive cultivars. Unfavourable soil acidity is one of the most harmful abiotic stresses that significantly limits flax growing. Excessive liming of soils causes humus decomposition and limited availability of some macro- and micronutrients, especially zinc (Zn), and results in “physiological depression” of flax plants. Currently, flax genotypes with increased resistance to unfavourable soil acidity are identified, but mechanisms of the resistance are unknown. In the present work, response of flax plants to increased pH level and Zn deficiency was studied. Plants of flax cultivars Norlin (resistant) and Mogilevsky (sensitive) were grown under control conditions, increased pH level (7.5), Zn deficiency (1000-fold reduced Zn content), and both Zn deficiency and pH 7.5. Total RNA was isolated from root tips of pools consisted of 10-12 plants using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). TruSeq Stranded Total RNA Sample Prep Kit (Illumina) was used for library preparation. Sixteen cDNA libraries (two cultivars in four different conditions, in duplicate) were sequenced on Illumina NextSeq500 with 80-nucleotide read length. As a result, about 40 million reads were obtained for each experiment type. Transcriptome assembly, annotation, expression analysis, and gene set enrichment analysis were performed using Trinity, Trinotate, TransDecoder, Bowtie2, RSEM, edgeR, and Goseq. At pH 7.5, upregulation of stress-related genes and downregulation of genes, associated with the biogenesis of the cell wall, were revealed in flax plants. Under Zn deficiency, expression alterations were identified for genes involved in transmembrane transport and photosynthesis. Besides, distinct expression changes were revealed for flax genotypes with diverse resistance to studied stresses. Thus, we identified genes with expression alterations in flax under non-optimal acidity and Zn deficiency. These genes are involved in diverse processes, including cell wall biogenesis, transmembrane transport, and photosynthesis, and could play an important role in flax response to the studied stresses. Genes with distinct expression changes between resistant and sensitive genotypes could determine flax resistance to non-optimal acidity and Zn deficiency. This work was financially supported by the Russian Science Foundation, grant 16-16-00114.

Rhizosphere microorganisms as the basis of biofertilizers for organic agriculture

Doolotkeldieva T.D, Bobusheva S.T

Kyrgyz-Turkish Manas University, Plant Protection Department, Bishkek, Kyrgyzstan

E-mail: tdoolotkeldieva@gmail.com

Recently, the production of organic food and consumer demand in Kyrgyzstan has increased due to their health benefits and mainly because of environmental safety and soil biodiversity. Organic farming, unlike conventional farming, does not use chemical pesticides, synthetic fertilizers, irradiation and GMO seeds. An innovative view of agricultural production attracts a growing demand for biological fertilizers, as an alternative to agrochemicals.

When biofertilizers are applied to seeds, to plant surfaces or soil, they colonize the rhizosphere or the interior of the plant, promoting growth by increasing the availability of primary nutrients to the host plant.

Soil bacteria belonging to Streptomycetes are considered as promising biocontrol organisms, due to their potential to produce a wide range of secondary metabolites such as vitamins, alkaloids, antibiotics, plant growth factors, enzymes and enzyme inhibitors. We have developed a new formula of biofertilizer based on rhizosphere bacteria of the Streptomyces genus.

In the present study, we used this biofertilizer to treat the seeds of cereals and industrial crops before sowing them into low fertility soil to determine the effect of this biological agent on the rate of germination, growth of seedlings and shoots, on the maturation phase of plants, functional rhizosphere biodiversity and resistance of these plants to pathogens. Microbial diversity of plant rhizosphere was studied in different phases of vegetation by amplifying of 16S rRNA genes.

Despite the low soil fertility and the lack of irrigation water in summer, this fertilizer or Streptomyces product has showed a growth stimulating effect in all phases of development of soybean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*) and beetroot (*Beta vulgaris*), ultimately increasing biomass and yield of grain and beans, root crops as a whole. The germination rate of seeds for eight days was ranging from 85,0 to 100%; in control – 70-71,8%.

Thus, as the results have shown, the effects of Streptomyces biofertilizer on the rhizosphere microflora of wheat differed from that of soybean and beetroot in relation to phases of plant development. In the shoot phase of wheat, we observed a marked restraining effect of biological agents on the development of ammonifiers in the rhizosphere. 16S ribosomal RNA analysis revealed a rich biodiversity of bacteria in the rhizosphere of wheat in the maturation phase, which differs from the biodiversity of bacteria in the rhizosphere of soybean and beetroot in the same phase. Bacteria of Microbacterium genus from the Actinobacteria phylum dominated in the rhizosphere of wheat.

The degree of Streptomyces sp. survival in the rhizosphere of soybean and beetroot was stable and higher than in the rhizosphere of wheat.

The results allowed us to confirm that Streptomyces sp. is an ideal biological agent for use against soil infections, due to its high colonization of the root system of soybeans, beetroot and significant colonization of wheat. Streptomyces sp. introduced into non-sterile soil entered into competition with the local soil microflora and had the ability to colonize the rhizosphere system of plants.

Using Streptomyces sp. through the seeds has improved the composition of the soil microflora, attracting saprophytic rhizosphere and nitrogen-fixing microorganisms. The use of Streptomyces sp. as a biological agent hastened the phenophases of plants by 3-5 days, increasing the height of the plants and the size of the leaf blade, creating a hostile environment for the development of weeds and phytopathogens. Treatment of seeds by biological fertilizer such as Streptomyces gn-2 is an important prerequisite for profitable crop production and ensuring a full and environmentally healthy crop.

The microbial degradation of obsolete pesticides in burial soils of Kyrgyzstan

Doolotkeldieva T.D., Konurbaeva M.U., Bobusheva S.T.

Kyrgyz-Turkish Manas University, Plant Protection Department, Bishkek, Kyrgyzstan

E-mail: doolotkeldieva@gmail.com

In the present age, more than 500 different formulations of pesticides are used, mainly in agricultural tricks. These formulations are in general artificially synthesized substances that are non-biodegradable and enhance environmental toxicity. Kyrgyzstan is a unique country with a rich natural and agricultural biodiversity in almost every region. However, there is a large legacy of former storehouses and dumping zones for obsolete pesticides and wastes from pesticide production, as is often observed in former Soviet countries. They pose a serious threat to the people living there, to livestock and to the environment. Pesticide persistence in the environment is caused by either the physico-chemical properties of the pesticide or the lack of organisms able to degrade it. Degradation caused by organisms (biodegradation) could help decrease considerably pesticide persistence in the environment. Microorganisms are vital for the bioremediation of pesticides. The complete biodegradation of the pesticide involves the oxidation of the parent compound, resulting in carbon dioxide and water; this provides energy to the microbes. In soil where the innate microbial population cannot manage pesticides by themselves, the external addition of pesticide-degrading microflora is recommended. The main purpose of this research is to study the microbial structural complexes of pesticide-contaminated soils in dumping zones, and to search for and select microorganism-destroyers with cytochrome P450 genes for pesticide degradation, the use of selected bacteria for the bioremediation of heavily polluted soils around the burial sites in model experiments. The 16S rRNA analyses and the specific primer set P450R have revealed bacteria from heavily polluted soils with cytochrome genes, which are directly involved in degradation process of organic carbon compounds. Active bacterial strains from *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus polymyxa*, *Micrococcus flavus*, *Bacillus megaterium* and *Flavobacterium* sp. populations were selected *in vitro* experiments. *In vivo* experiments blend of bacteria: *Micrococcus flavus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas fluorescens* and *Flavobacterium* sp, and single culture of *Pseudomonas fluorescens* were used for biodegradation in soils contaminated with obsolete pesticides. The chromatographic analysis of the polluted soils at the Suzak A site before and after biodegradation using a blend or a single culture of active destructive bacteria was conducted. The level of degradation and transformation was different for each of the various species of pesticides. Six months later, following the incubation of the soil containing high concentrations of pesticides with active destructive bacteria, heptachlor-epoxide pure and dieldrin were fully degraded and their concentration was almost reduced to zero values (0.382 mg/kg and 0.096 mg/kg respectively) by the blend of bacteria. On the other hand, Endrin aldehyde was only subject to non-severe degradation by the blend of bacteria over this period; its concentration was reduced only 1.5 to 1.6 times. The concentration of B-BHC was decreased by 5.5 times and that of Endosul-sulf + 4.4 DDT by 27.5 times within six months using the blend of bacteria. The single culture of *Pseudomonas fluorescens* reduced B-BHC and Dieldrin pesticide concentration to zero values (0.044 mg/kg and 0.32 mg/kg). Endrin aldehyde was resistant to this bacterial degradation and remained almost intact after the six months. In the control soils for both sites, abiotic degradation was insufficient, in spite of the fact that loosening and watering was conducted regularly. We conclude that the bioremediation of polluted soils around the Suzak A and Suzak B burial sites should be achieved based on the type of pesticide, the environmental matrix and the organisms present in this ecosystem. Soil pH, temperature, cell count, biomass growth rate, substrate bioavailability and moisture are important parameters to assure bioremediation.

Usage efficiency of methods of biotechnology and genetic engineering in soy-bean breeding in Primorsky Krai

Efremova O.S., Fisenko P.V., Dega L.A.

Primorsky Scientific Research Institute of Agriculture, Ussuriysk, Russia

E-mail: efremo.olga2010@yandex.ru

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr) is one of the many Far Eastern riches. The content of valuable nutrients (full protein and oil) in the seeds makes it one of the main crops of agricultural production in many countries of the world. The traditional selection of crops cannot provide the radical restructuring of plants, so the use of biotechnology and genetic engineering is of particular interest. As a result of researches the genetically changed somaclones of soybean which reliably exceeded the initial forms on a number of economic valuable features are received. Applying laser and gamma irradiation upon the seeds for the first time in our practice there were obtained *in vitro* regenerant lines resistant to *Septoria* (R646) and *Cercospora* (R623). Using method of ISSR-analysis there were defined genetic differences of the regenerant lines which were developed with the use of heavy metal ions as a mutagenic agent (Cd^{2+} , Cu^{2+}). In the analysis of the amplification products of regenerant line 1357 and its original form-variety Hodson, there were identified 53 fragments, nine of which were polymorphic (16.98%). According to biochemical indicators, the three lines had higher content of oil and histidine in the seeds, with a low indicator of linolenic acid (R 1485, R 1357 and R 1490).

Applying method of agrobacterial transformation, we gave an estimation of influence of genotypes and type of explant upon regeneration ability of seven soybean varieties. Immunologic evaluation *in vitro* of the soybean transgenic line containing the gene AMP I, in its genome, allowing to expand limits of the plants resistance to phytopathogenes, showed that degree of the *Septoria* leaves infection of transformant- plants (*Septoria Glycines* Hemmi) is 25.7% less than the standard variety *Cercospora* infection, (*Cercospora sojina* Hara) and *Peronospora* infection (*Peronospora manshurica* (Naum.) Syd.) – 20, 0%. The results present efficiency of use of the mentioned directions of biotechnology and genetic engineering used for the development of the initial material for soybean selection.

Effect of plant-growth-promoting rhizobacteria on potato microclones subjected to osmotic stress *in vitro*

Evseeva N.V., Tkachenko O.V., Denisova A.Yu., Burygin G.L., Matora L.Yu., Shchyogolev S.Yu.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Saratov, Russia

E-mail: evseeva_n@ibppm.ru

Plant-growth-promoting rhizobacteria are important for plant adaptation to external stress, in particular to water deficit or to drought. We examined the effect of the associative plant-growth-promoting rhizobacteria *Azospirillum brasilense* Sp245 and *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 on the physiological and morphological variables and proline content in potato (cv. Nevsky) microclones. The microclones were osmotically stressed *in vitro* by adding 25 g l⁻¹ of polyethylene glycol (PEG; Mr 6000) to the nutrient medium; this corresponded to an osmotic pressure of -0.0189 MPa in the growth medium. To study the effect of bacteria and water deficit on the plants, we designed four experimental treatments: (i) control (no bacteria or PEG); (ii) bacteria minus PEG; (iii) PEG minus bacteria; and (iv) bacteria plus PEG. Suspended bacteria were added to a liquid Murashige-Skoog nutrient medium so that their final concentration in the medium was 10⁶ cells ml⁻¹. The stress lasted 7 days, after which the stress was removed and the efficacy of repair was assessed. The state of the plants was assessed on the basis of morphological and physiological variables such as shoot length, number of nodes per shoot, number of roots per plant, average root length, and wet weight of roots and shoots. We also measured the content of proline, a cellular defense component, in stems, roots and leaves. In the absence of PEG *A. brasilense* Sp245 positively affected shoot length (increase, 37%) and the wet weight of leaves, stems and roots (increases, 64%, 22%, and 77%, respectively), as compared with uninoculated plants. By contrast, *O. cytisi* IPA7.2 under the same conditions was weakly stimulatory only to shoot length. PEG inhibited plant growth, particularly root growth. Under osmotic stress, the leaf content of proline increased sharply. The proline content of root decreased, possibly as a result of cell injury by PEG. Bacterial inoculation contributed in part to the alleviation of the stress and to the promotion of shoot growth. After the stress was removed, the content of proline remained high for 7 days. Inoculation, however, promoted a quicker decrease in proline content during repair, which correlated with shoot growth and, correspondingly, with increases in leaf and stem weight, as compared with the control. During repair, *O. cytisi* IPA7.2 more stimulatory to plant growth than *A. brasilense* Sp245. It may be that strain Sp245 could not withstand prolonged stress and was losing its defense functions. Overall, inoculation of potato *in vitro* with *A. brasilense* Sp245 and *O. cytisi* IPA7.2 let to better adaptation of potato microclones to osmotic stress. Increasing the adaptation potential of plants in purposely developed plant-microbe associations is promising from the standpoint of general approaches to environmentally benign agriculture, with decreased amounts of pesticides and fertilizers applied.

Participation of cytokinins in the early stages of embryoidogenesis *in vitro* in wheat embryo calli

Galim I.R., Zaytsev D.Yu., Seldimirova O.A., Kruglova N.N.

Ufa Institute of Biology UFRC RAS, Ufa, Russia

E-mail: o_seldimirova@mail.ru

Modern development of innovative directions of plant biotechnology requires new fundamental data on morphogenesis both in natural conditions and in culture *in vitro*. Callus is a convenient model for studying various aspects of plant morphogenesis. To date, considerable factual material has been accumulated concerning various aspects of callus research, but many questions remain open. So, far from the final solution remains the question of the phytohormones participation in the realization of the morphogenetic potential of callus cells. In cultivated wheat calli there are different morphogenesis pathways *in vitro*, one of which is embryoidogenesis - the formation of embryoids (embryo-like structures). The role of auxin (considered to be the main regulator of embryogenesis from the earliest stages) has been studied quite well. At the same time, data on the role of other phytohormones, including cytokinins, are few in number. The aim of the investigation was to study the cell localization of cytokinins in the early stages of embryoidogenesis, which are critical periods of development. The objects of investigation were embryo calli of wheat (cv. Bashkirskaya 26). The standard methods of histological studies and the method of immunolocalization of phytohormones with the using of gold-labeled antibodies were applied in the work. It has been established that the initial stage of all morphogenesis pathways *in vitro*, including embryoidogenesis, is universal and consists in the isolation in the callus of groups of meristematic cells that differ from the rest of the callus cells by a dense cytoplasm and the central location of the nucleus. These cells are characterized by intense divisions.

Strategies of precise design of endophyte microbioms in the creation of preparations for plant growing

^{1,2}Garipova S.R., ²Lastochkina O.V., ²Pusenkova L.I., ³Anisimova L.G., ³Garaev I.A., ⁴Babaev M.S., ⁵Khairullin R.M.

¹Bashkir State University, Ufa, Russia

²Bashkir Scientific Research Institute of Agriculture of Ufa Federal Research Centre of RAS, Ufa, Russia

³Institute of Organic Agriculture, Scientific and production organization, Ltd, Moscow, Russia

⁴Bashinkom Scientific & Innovation Enterprise, Ltd, Ufa. Khairullin R.M. - Institute of Biochemistry and ⁵Genetics of Ufa Federal Research Centre of RAS, Ufa, Russia

E-mail: garipovasvetlana@gmail.com

Traditional and genetic engineering selection of crops, growing them on a rich agronomic phone with the use of pesticides, in optimal soil conditions lead to the loss of symbiotic connections with useful microorganisms, including bacteria protecting plants from diseases and increasing stress resistance. Increased interest to "green" technologies, organic farming, revives the demand for biological methods for managing the productivity and sustainability of cultivated plants. One of the promising agrotechnologies is the use microorganisms associated with the plant and representing an "additional genome" of plants, replenishing and improving some of the functions of the macroorganism. The plant microbiome consists of both ectophytic and endophytic bacteria, capable of nitrogen fixation, phosphate-solubilization, production of phytohormones, physiologically active substances, contributing to overcoming abiotic and biotic stress. The use of bacterial preparations ensures an increase in the productivity and quality of biological products while reducing energy intensity and material costs.

In recent years, an interest in endophytic microbiome – the normal "internal" microflora of the plant organism – has increased significantly. Today, more than 200 species of endophytic bacteria are known that can colonize any plant species without causing pathogenesis, spread systemically over the plant and carry out a prolonged regulatory effect on its metabolism. Deciphering the mechanisms of symbiosis of plants and endophytes at the molecular-genetic level is in the trend of modern scientific research.

Endophytic bacteria are not characterized by highly specific relationships with plants like the legume-rhizobia symbiosis. However, the same endophytic strain manifests its properties differently when interacting with even different varieties of one plant species. The theory of a universal strain that works effectively on all kinds of plants is not confirmed in practice. The solution of this problem could be application of bacterial consortia with a wide set of strains possessing specific activity to certain kinds and grades of plants. But the maintenance of such consortia on artificial environments lead to a competitive exclusion of some participants and the prevalence of others. Therefore, a system for maintaining the stability of bacterial consortia in vivo is needed.

The second problem is related to take into account the different doses of the biologicals because growth regulating effect of endophytic bacteria associated with the phytohormones production, which can be manifested in opposite ways in different plant species. Therefore, precise adjustment of recommended doses of introducing bacteria into different crops is necessary.

The third task of creating preparations based on endophytes is due to the fact that under certain stress conditions, certain genes "on / off" certain genes not only of plants, the expression of which can influence the host's relationship with microorganisms, but also endophyte genes. Consequently, it is not enough to provide the plant with the right bacteria and to give them in the right dose, it is necessary to help the owner activate the existing "additional genome" resource in order to successfully overcome stress and be highly productive. To solve this problem it is necessary, on the one hand, to select the host genotypes for the "ability" to control the endophytic microbiome, and on the other hand, the ability to enhance the metabolic capabilities of endophytes with the help of effectors (signal molecules) produced by these endophytes.

Problems and strategies for the precise design of endophyte plant microbiomes (inoculation of flowers to form a microbiome in the emerging seeds, injection into the plant in vivo, the creation of an "intelligent" capsule that selectively releases its components depending on the signal requirements of the host plant and others) are discussed in the report.

The “xylem story” of life of pectobacteria inside the host plants

^{1,2}Gorshkov V.Y., ^{1,2}Daminova A.G., ¹Petrova O.E., ¹Mikshina P.V., ¹Ageeva M.V., ²Islamov B.R., ²Gubaev R.F., ³Burygin G.L.,
¹Gogoleva N.E., ^{1,2}Vorob'ev V.N., ^{1,2}Tarasova N.B., ^{1,2}Gogolev Y.V.

¹Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia

²Kazan Federal University, Kazan, Russia

³Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, Russia

E-mail: gvy84@mail.ru

Bacteria of *Pectobacterium* genus cause plant soft rots that lead to great crop losses all over the world. These bacteria are considered as inhabitants of intercellular spaces of core parenchyma where they degrade middle lamella resulting in characteristic symptoms of tissue maceration. However, by a comprehensive analysis of plant-*Pectobacterium atrosepticum* (Pba) pathosystem formation, we have demonstrated that a considerable part of the life cycle of this bacterium proceeds in the primary xylem vessels, where Pba forms biofilm-like structures termed by us bacterial emboli. These structures represent dense clusters of bacterial cells that tightly bind to each other forming huge bungs in the primary vessels. The assemblage of bacterial emboli requires many physiological and biochemical processes to take place in the infected plant.

The effective association of separate microbial cells in a holistic structure – bacterial emboli – is provided by a peculiar extracellular matrix composed of plant cell wall pectic polysaccharide rhamnogalacturonan I (RG-I). RG-I is released from the plant cell wall into the vessel lumen because of the host plant susceptible responses. These responses include the accumulation in the primary xylem vessels of the reactive oxygen species that were previously shown to provide scission of polysaccharides and loosening of the plant cell walls. In addition, by RNA-Seq analysis of Pba-infected plants we revealed the induction of expression of plant genes encoding the enzyme and proteins for the plant cell wall loosening, including those that encoded rhamnogalacturonan lyases – the enzymes for scission of RG-I.

When released into the vessel lumen, RG-I forms a polymeric network that serves as an initial matrix for bacterial cells enabling them to gain a foothold in a particular site of the xylem vessel and to form “multicellular” structure. Using the original artificial model of xylem colonization by Pba, RG-I was shown to induce aggregation of pectobacteria. The phenolic compounds included in the composition of RG-I are discussed to be engaged in the association of RG-I-fragments into supra-molecular network resulting in matrix formation.

At the advanced stages of bacterial emboli development, RG-I within the extracellular matrix is substituted for Pba exopolysaccharides that were firstly identified in our study. The structure of these polymers was characterized by NMP-spectroscopy; by immunolabeling, Pba exopolysaccharides were detected within mature bacterial emboli.

The observed phenomena permitted us to make conclusions on the functions of bacterial emboli in systemic plant colonization. First, bacterial emboli by blocking upward transpiration stream in the primary vessels provide the conditions for the downward migration of bacteria to underground plant parts, including progeny tubers that is advantageous for vertical transmission of the pathogen to the next generation of the host. Second, within these structures Pba cells are likely to pass through developmental stages that is supported by a gradual modification of Pba cells morphology in the course of bacterial emboli development; herewith, the terminal stage is associated with conjugation-like processes that are known to precede the formation of dormant cells. And third, bacterial emboli are unlikely to determine Pba aggressiveness, since their formation occurs not only during acute infection but also in the course of asymptomatic one. In addition, these structures are not formed in the secondary xylem – the major water-transporting tissue of the plant, therefore, bacterial emboli cannot significantly reduce water transport in the whole plant. Thus, the life of pectobacteria in the primary vessels seems to be the basis for the development and functioning of the pathosystems. The study was supported by RSF (15-14-10022) and a grant MK-2191.2017.4.

Complex characterization of plant responses that determine resistance/susceptibility to pectobacteria by means of transcriptome profiling

¹Gubaev R.F., ¹Gorshkov V.Y., ¹Daminova A.G., ¹Petrova O.E., ²Parfirova O.I., ¹Gogoleva N.E., ¹Gogolev Y.V.

¹Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center "Kazan Scientific Center of RAS", Kazan, Russia

²Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

E-mail: rim.gubaev@kibb.knc.ru

Plant soft rot is a pectobacteria-caused disease that greatly impacts crop production worldwide. Pectobacteria are usually considered as brute force pathogens that degrade plant cell walls. Nevertheless, these phytopathogens may presumably apply much more sophisticated strategies during interaction with the host, since the genomes of pectobacteria contain genes that encode type III and type VI secretion systems, effector proteins as well as phytotoxins – the weapons of “stealth” biotrophic pathogens that normally induce specific plant susceptible responses in order to colonize macroorganisms. Unfortunately, plant responses to pectobacteria including those related to susceptibility/resistance to these pathogens remain poorly described.

Here we compared the transcriptional profiles of mock and *Pectobacterium atrosepticum* (Pba)-infected tobacco plants in order to describe general picture of the host physiology in the course of soft rot development. Over eight thousand differentially expressed genes (DEGs) in infected and control plants were revealed. In order to correctly interpret a large amount of transcriptomic data in terms of general physiology, cDNAs were functionally classified according to various general (UniProt, KEGG, GenBank, Gene Ontology) and plant-specific databases (TAIR, SolGenomics, PlantPAN, PlantProm) using blastx. For DEG classification into functional categories and evaluation of up- and down-regulated ones, custom scripts have been written in R programming language. These scripts are now freely-available at GitHub (<https://github.com/RimGubaev>). Since automatic classification may possess some drawbacks, it was manually checked and supplemented according to literature data in order to avoid information losses. To present complex transcriptome information within representative schemes and plots, KEGG Mapper, MapMan, BioCyc software as well as custom R scripts were used.

The application of various databases and computational approaches allowed us to draw very detailed and literally colorful picture of infected plant. Gene categories related to some hormonal systems (jasmonic acid- (JA) and ethylene-mediated), cell wall modification, secondary metabolism, respiration, protein and starch degradation were up-regulated during the infection. In turn, processes that control cell cycle, plant development, auxin- and gibberellin-mediated responses, photosynthesis were repressed after pathogen invasion. Gene expression changes of several functional categories are discussed in terms of susceptibility/resistance of the plants. For example, the induction of JA-related genes represents plant susceptible response, since 1) the coronafacic acid-deficient mutant unable to induce JA-pathway is avirulent, and 2) pre-infectional treatment of plants with JA did not reduce lesion development caused by Pba.

This study was supported by Russian Scientific Foundation №15-14-10022.

Antimicrobial effect of endophytic actinobacteria isolated from *Achillea millefolium* L.

Hassan G.O.O., Yagudina I.R., Karamova N.S.

Department of Microbiology of the Institute of Fundamental Medicine and Biology of Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

E-mail: gamal_micro84@yahoo.com

Respiratory tract infections (RTI) are responsible for health burden worldwide. The major etiological agents of RTI are viruses. However a disease is often complicated by bacterial pathogens that colonize respiratory tract. Currently, it is considered that the opportunistic microflora plays an important role in the development of respiratory diseases. The problem is complicated by the increasing resistance of microorganisms to currently used antibiotics. So, nowadays it is important to search for new antimicrobials agents of natural origin. Endophytic actinobacteria are the microorganisms found inside the plant tissues (roots, stems, flowers, fruits, seeds) and not causing damages to their plants. Endophytic microorganisms can prevent plant from diseases and they can be used as biological agents for treating human diseases also.

In this work, we obtained 11 isolates of endophytic microorganisms from *Achillea millefolium* L. (1 - from the leaves, 5 - from the stems and 5 - from the roots). By using agar block method we obtained that 8 isolates of endophytic actinobacteria show antimicrobial activity against microorganisms associated with respiratory tract infections (*Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium striatum*, and *Candida tropicalis*). Endophytic actinobacteria from roots exhibited the highest activity against the selected microorganisms than those from leaves and stems. Isolate 8R2 from roots showed antimicrobial activity against *Staphylococcus epidermidis* and *Candida tropicalis*. The antimicrobial activity of cellular acetone extract, extracellular ethyl acetate and n-butanol extracts of the 8R2 isolate was measured using the disc diffusion method. Extracellular ethyl acetate extract caused the largest growth inhibition zones of microorganisms tested: *Staphylococcus epidermidis* (31 mm), *Enterococcus faecalis* (27 mm), *Candida tropicalis* (22 mm), *Klebsiella pneumoniae* (20 mm), *Enterobacter cloacae* (20 mm), *Escherichia coli* (18.5 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (17.7 mm), *Staphylococcus aureus* (17.7 mm), *Acinetobacter baumannii* (13 mm). The results obtained show that endophytic actinobacteria 8R2 from *Achillea millefolium* L. can be considered as a promising source of novel antimicrobial agents against respiratory tract infections microorganisms.

The plasmidome of bacteria of the genus *Serratia*: composition and classification

Iasakov T.R.

Ufa Institute of Biology UFRC RAS (UIB UFRC RAS), Ufa, Russia

The genus *Serratia* belongs to *Enterobacteriaceae* family and its members are widely distributed in soil, water, insect and animal organisms, in plants. Often are pathogens. At the same time, many are capable of degrading a variety of xenobiotics, for example, chlorophenoxyacetic acids, crude oil. To a large extent, their high adaptive potential is ensured by the plasticity of the genome. In this case, plasmids as a mobile part of their genome provide them with additional competitive advantages. The aim of the work is *in silico* analysis of the plasmidome (a collection of plasmids) of bacteria of the genus *Serratia*. The tasks of the work included: searching for full sequenced sequences of plasmids in GenBank international database, their annotation and classification. The subjects of the study were plasmids of bacteria of the genus *Serratia*, isolated from various sources, sequenced and deposited in GenBank. The search for complete sequenced plasmids of bacteria of the genus *Serratia* revealed 29 plasmids with a sequence length range from 3 to 275 kb. Using the pMLST resource, plasmids were classified by replicon types as members of IncHI2, IncFII and IncA/C incompatibility groups. At the same time, the classification of some of them proved to be difficult due to the restriction of pMLST to new types of replicons. Later, the plasmid sequence was analyzed for the relaxase protein sequence (if available) for their classification by the conjugative transfer system. It was found that a significant part are belongs to the families MOB_F, MOB_H, MOB_P, MOB_Q. Thus in this work the plasmidome of bacteria of the genus *Serratia* was analyzed and identified plasmids, probably, having Inc-specific loci not described previously. It is shown that a number of plasmids are non-transmissible.

Soil nutrient variation in a natural ecosystem limits leaf size, but not function, during delayed leaf greening in phosphorus-efficient *Hakea prostrata* R. Br. (Proteaceae)

Ilyasova A.A., Lambers H., Finnegan P.M.

School of Biological Sciences, University of Western Australia, Perth, Western Australia, Australia

E-mail: besyaika@yandex.com

Hakea prostrata R. Br. (Proteaceae) has evolved in extremely phosphorus (P)-impoverished environments. This species displays particularly low leaf P and nitrogen (N) concentrations, but has comparatively fast photosynthesis rates. The delayed greening phenomenon, which is characterised by slow development of the photosynthetic apparatus until after the completion of leaf expansion, is one of the P- and N-saving strategies in *H. prostrata* and at least some other Proteaceae. Nothing is known about the effect of external P and N availability on their allocation to young and maturing leaves in species with delayed leaf greening. We examined developing leaves of *H. prostrata* plants growing in their natural habitat on two soils differing in plant-available P and N. Nutrient, pigment and gas exchange analyses were made on developing leaves at four distinct leaf stages. The P allocation and investment patterns in developing leaves were dependent on soil P concentrations, whereas N and S distributions [WU1] were independent of soil N. Moreover, there was a close link between the ratio of organic P and total P concentrations in leaves and leaf metabolism in general, including photosynthetic capacity, that is important in determining the extent of leaf growth. However, the P- and N-conserving strategy of delayed leaf greening was unaffected by ecologically-relevant variation in leaf P concentration.

Morphological description of non-effective arbuscular mycorrhiza developed by plant mutant (*Medicago lupulina* L. subsp. *vulgaris* Koch.) in association with *Rhizophagus irregularis*

¹Jacobi L.M., ^{1,2}Zheleznyakov S.V., ¹Kojemyakov A.P.

¹All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, S. Petersburg, Russia

²Saint-Petersburg State Agrarian University, Faculty of Agrotechnologies, Soil Science and Ecology, S. Petersburg, Russia

E-mail: lidija-jacobi@yandex.ru

Arbuscular mycorrhizae (AM) are the close symbiotic associations of a living host plants (mainly grasses and shrubs) and the fungi affiliated to the Glomeromycota phylum, a group of obligate biotrophs. AM root colonization is known to have beneficial effects on plant growth especially under phosphorus (P) deficit conditions. In particular, AM play a pivotal role in plant uptake mineral nutrients and water from the soil. Typical characteristic of all mutual symbiotic relationships in AM is the exchange of benefits between partners: the host plant transfers the carbohydrates to the fungus in return for the nutrients (especially phosphorus).

The study of biological bases of mycorrhizal activity has both scientific interest and practical significance. Mycotrophic plant line (*Medicago lupulina* L.), which formed the effective (mutual) symbiosis in association with *Rhizophagus irregularis*, was pre-selected by us for investigations. The mycorrhiza-defective plant mutants (*M. lupulina* L.) have been derived via the application of ethyl methanesulfonate. Thus the semi-dwarf mutant was isolated from M2 population of the plants, growing on the P deficit soil. This mutant formed non effective symbiosis with *Rh. irregularis*. Namely, the mycorrhiza formation in mutant did not influence on root and shoot productivity and phosphorus accumulation of the plant. The semi-dwarf sign of mutant (or «non effective mycorrhiza» sign) was stabile observed in series of generations (M3 – M11). Most probably, the formation of non effective mycorrhiza by mutant was directly or indirectly connected with lack of P transfer from the fungus to the plant. Specific morphological features of mutant mycorrhiza were revealed by light microscopy examination: the intercellular hyphae were very thin (width up to 2 μm), the vesicles were small and weakly developed and the arbuscules looked like very small shrubs. In spite of this the appressoriums were normal. At the same time AM of wild type line was characterized by the big arbuscules, vesicles and spores, and by presence of the thick intercellular hyphae (width up to 7 μm). In addition, the frequency of AM in the root system (F%), abundance of arbuscules (A%) and vesicles (V%) in the root system of mutant in M11 (on 70th day after sieving) amounted only to 43%, 5.6% and 0,4 %, accordingly, that was significantly less than the AM values of wild type line (81%, 10% and 15%, accordingly).

Thus, the mycorrhiza of mutant (*M. lupulina* L.) with semi-dwarf phenotype (or «non effective mycorrhiza» phenotype) has been characterized by wasted intercellular and intracellular structures of the fungus (*Rh. irregularis*), what is probably due to the limited transfer of the carbohydrates from plant to fungus. Based on our observations of the plant mutant and the wild type line (*Medicago lupulina* L.) outlined above, we have assumed that there is any host plant mechanism (for example, transpiration) which provides the primary driving force for the useful interchanges between the components of symbiosis in AM of mycotrophic plants and adjusts the intensity of these exchanges and the effectiveness of mycorrhiza.

Phage control of potato bacteriosis caused by the new pathogen *Pectobacterium parmentieri*

^{1,2}Kabanova A.P., ²Bugaeva E.N., ^{1,3}Zyabreva A.A., ¹Shneider M.M., ⁴Korzhenkov A.A., ⁴Toschakov S.V., ^{2,3}Ignatov A.N.,
^{1,2}Miroshnikov K.A.

¹M.M. Shemyakin – Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²“PhytoEngineering” Research Center, LLC, Rogachevo, Moscow region, Russia

³Peoples’ Friendship University of Russia, Moscow, Russia

⁴I.Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

E-mail: asiasay@yandex.ru

Bacterial infections annually destroy a significant share of the potato crop, leading to large losses for the agricultural sector. Preparations of bacteriophages specific to bacteriosis pathogens are considered as effective means of combating phytopathological processes. The purpose of our study is the selection and characterization of bacteriophages, and the design of the drug to control black leg and soft rot of potato caused by the pathogen *Pectobacterium parmentieri*.

P. parmentieri, a potato specific *P. wasabiae* genotype, recently isolated in a separate species, is characterized by high aggressiveness and adaptability to moderate climate conditions. Episodic outbreaks of infections caused by these pathogens, introduced through seed and irrigation water, cause significant damage to potato cultivation in the US, Europe and Russia.

A number of bacteriophages infected with the typical Russian isolate *P. parmentieri* PB20 were isolated during the work, also were studied their morphological and biological features (adsorption rate, parameters of the infection cycle, optimal multiplicity of infection, resistance to chloroform, ultraviolet, pH and temperature sensitivity, kinetics of formation and virulence of phage-resistant mutants). The bacteriophage PP74 has been fully characterized genetically. Model tests on potato slices and tubers showed high efficacy of the bacteriophages studied as antibacterial agents.

The project is supported by Russian Science Foundation, Grant #16-16-00073.

Influence of polyfunctional complex of microbial preparations on productivity of grain crops

Kameneva I.A., Yakubovskaya A.I., Melnichuk T.N., Radchenko L.A., Gritchin M.V., Radchenko A.F., Smirnova I.I.

Federal State Budget Scientific Institution "Research Institute of Agriculture of Crimea", Russia

E-mail: irina.kameneva.7@mail.ru

Application of microbial preparations based on active strains with a complex of characteristics useful for plants is an ecological method to increase the productivity of agrophytocenosis. Preparations containing strains of several microorganisms of different functional orientation are the most promising. Notwithstanding the experience throughout the world, issues of establishing the efficacy of microbial preparations, including poly-strain ones, remain relevant in the technology of growing agricultural crops. The multifunctional complex of microbial preparations (CMP) for mineral nutrition optimization and biocontrol of pathogenic micromycetes of cereal crops was developed in the Department of agricultural microbiology of FSBSI "Research Institute of Agriculture of Crimea". Research according integration of biological methods into intensive agrotechnology of growing agricultural crops are of scientific and practical interest. These methods allow obtaining high yields and at the same time reducing the anthropogenic (industrial) impact on soils.

The aim of the work is to study the influence of the multifunctional complex of microbial preparations on the productivity of such cereal crops as rice (*Oryza sativa* L.) and winter wheat (*Triticum aestivum* L.).

On the meadow-chestnut soils of the Crimea, pre-sowing seeds bacterization positively influenced on the structural elements of the rice crop: number of productive shoots increased by 11.7%, grains in panicle - by 10%, thousand-seed weight - by 15.2% compared to control. Yield increase on average during the years of research (2011-2013) was 3.6 tons/ha. Enhance of biological activity in the rhizosphere of inoculated plants, as well as decrease of phytotoxicity of the soil has been established. This is important when growing rice in monoculture.

High efficiency of CMP was established in the fields of wheat on the southern chernozems (formed on heavy loams and loess rocks), when black fallow was preceding crop. Agroclimatic conditions during the period under review (2006-2017) were contrasting, differed from the average multi-year indicators, and in some years were extremely arid. The CMP steadily raised grain productivity of winter wheat on a conventionally intensive agricultural background (N30P60K30 + early spring application of mineral nitrogen (N30) as well as chemical insecticides and fungicides). It was noted that seeds bacterization functioned best (9.2-31.8% to control) on the background application of mineral fertilizers before sowing (N15P15K15) without use of chemical plant protection products (conditionally biological technology of cultivation). Taking into account that wheat productivity essentially depends on cultivation technology and initial parameters of soil fertility, application of CMP activates reserve capacity of increasing plants' productivity. Bacterization of seeds promoted an increase in the number of useful forms of microorganisms in the rhizosphere of wheat and an increase in the biological activity of the soil.

Thus, during multi-year field research, the effectiveness of multifunctional complex of microbial preparations, when rice and winter wheat are grown, has been established. Application of CMP is an alternative resource-saving and environmentally friendly method to intensify grain production of the studied crops.

Adhesin RapA1 of *Rhizobium leguminosarum* in the bioengineering of microbial-plant symbiosis¹Khakimova L.R., ¹Lavina A.M., ²Serbaeva E.R., ¹Sadykova L.R., ¹Vershinina Z.R., ¹Baymiev Al.Kh.¹Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, Ufa, Russia²Bashkir State University, Ufa, Russia*E-mail: lili-nigmatullina@bk.ru*

Adhesin RapA1 is a Ca²⁺-binding protein isolated from *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. It is shown that the increasing of constitutive expression of the gene rapA1 affects the competitiveness of rhizobium strains of *R. leguminosarum* and increases the adsorption capacity of bacteria to the root hairs of plants.

The aim of this work was to study the possibility of using the bacterial adhesin RapA1 from *Rhizobium leguminosarum* as a tool for creating artificial symbiotic systems between cultivated plants and PGPR microorganisms.

Rhizobium strains *R. leguminosarum* (TPr4, PVu5) with increased production of RapA1 and *R. galegae* and *E. coli* producing RapA1 de novo were obtained. Recombinant strains had increased agglutination activity. In addition, the expression of rapA1 in a co-cultivated strain of microorganisms led to the sufficient agglutination after binary inoculation. A positive effect of the overexpression of the rapA1 gene in *R. leguminosarum* PVu5 on the formation of nodules and the growth parameters of the bean plants was also found. In addition, transgenic tobacco plants were obtained using the pCambia1301LPSLRapA1 vector with the leader peptide psl of pea. These plants had RapA1 protein on the surface of the roots. The study of the colonization of transgenic roots of tobacco plants by fluorescently labeled bacterial strains showed that the number of *E. coli* cells adhering to transgenic roots was an order of magnitude higher than the control, and the number of rhizobial cells doubled. Thus, it has been proven that the RapA1 adhesin can be used as a tool for bioengineering for creating de novo bacterial and plant associations.

In the future, the use of the gene rapA1 for the transformation of bacteria and plants is proposed with the aim of creating new stable symbiotic systems for phytoremediation.

This work was performed with support from the Russian Foundation for Basic Research (projects № 16-04-00902 A and №18-34-00033).

Crop genes modified using CRISPR/Cas system^{1,2}Khlestkina E.K., ²Korotkova A.M., ²Gerasimova S.V., ²Shumny V.K.¹N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Genetic Resources (VIR), Saint-Petersburg, Russia²Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia*E-mail: khlest@bionet.nsc.ru*

The CRISPR/Cas system is the most promising among genome editing tools. It can provide the development of modified nontransgenic plants with the possibility of simultaneous multiple targeted mutations. Systematic analysis of the published papers describing the utilization of the CRISPR/Cas system for crop gene modification has allowed evaluating the potential of this technology as a new plant breeding technique. The systematic analysis was performed by searching for “CRISPR & crop name” within article titles, abstracts and keywords in the Scopus database. The database was selected in order to assess results, which have pass reviewing process. The search was carried out for 45 crop names. Only 42% of the results found by this search have been recognized as original articles describing editing crop genes with the CRISPR/Cas system. However, even within these studies the most part was aimed at the approbation of the technology or was to elucidate target gene function, while modification of just 26% of the target genes was related with crop improvement. Among these results the largest number of genes modified has been observed for rice. The catalogue of the CRISPR/Cas modified genes was composed for more than 15 crops. It is important that in most studies mentioned in the catalogue, the ability to get transgene-free modified plants with desirable phenotype has been demonstrated. The preferred approach used in these studies was NHEJ-based knockout of the genes such as negative growth and development regulators or negative regulators of plant resistance. However, since the estimated number of “negative regulators” is limited in plant genomes, the CRISPR/Cas-directed gene knockout has a restricted potential for crop improvement. Intensive application of the CRISPR/Cas system for more complicate modifications such as replacement of defect alleles by functional ones or insertion of a desired gene is required (so far reports about such modifications are very rare). In addition, to provide a basis for broad practical application of CRISPR/Cas-based genome editing, more cultivars of crop species should be involved in ongoing studies. Just a few genotypes of crop species have been used for gene modifications thus far, with the exception of rice. Nevertheless, in spite of the restrictions mentioned, essential success has been achieved over a short period since the first publications on CRISPR/Cas application in plants.

The study was supported by RSF (No 16-14-00086).

Identification of sequences coding ncr peptides in pea (*Pisum sativum* L.) transcriptome databases¹Kliukova M.S., ¹Afonin A.M., ¹Zhukov V.A., ^{1,2}Tikhonovich I.A.¹All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St.-Petersburg, Russia²Saint-Petersburg State University, St.-Petersburg, Russia*E-mail: marina.kliukova@gmail.com*

Nitrogen starvation of the legume plant, as known, induces establishment of rhizobia-legume symbiosis. This process requires selective penetration of the soil bacteria belonging to the Rhizobium group into de novo formed symbiotic structures on the roots of the legume plant, also known as nodules. Bacteria are differentiating into nitrogen-fixing bacteroids in that symbiotic organ. The differentiation degree strictly depends on the species of plant. In some cases, the irreversibly differentiated bacteria are not viable after extraction from the nodule in legume belonging to the IRLC (Inverted Repeat-Lacking Clade). Nodule-specific cysteine-rich peptides (NCR-peptides) are the primary regulators of terminal differentiation process. NCR-peptides were first described in the model legume plant *Medicago truncatula*, and by now about 700 NCR genes have been identified in the genome of this plant. On the other hand, only eight NCR peptides involved in processes of establishment the symbiotic relationships are known in pea, which is an important crop plant. Thus, the aim of the study was to describe and characterize the gene family encoding NCR peptides in pea.

The available pea nodule transcriptome databases (such lines as SGE, Cameor, Kaspia and Parafield) and the transcriptome of mycorrhized roots (Frisson line) were analyzed for identifying NCR gene candidates. The analysis was carried out using the specialized script SPADA (Small Peptide Alignment Discovery Application), which algorithms involve the construction of hidden Markov models based on the known sequences of NCR peptides of *M. truncatula* and *P. sativum*. We identified 554 sequences that satisfied all the criteria for the members of this family. Further, physicochemical parameters such as charge, hydrophobicity, antimicrobial activity index, etc., were analyzed. Antimicrobial activity is one of the necessary characteristics to control the differentiation of endosymbiont. Based on the obtained data, sequences with the predicted highest antimicrobial activity were selected as the most promising plant effectors needed for bacteroid differentiation in pea nodules.

The antimicrobial activity of synthesized NCR peptides of *P. sativum* will soon be analyzed in microbiological assays. In general, the results of the work allowed us to describe and comprehensively characterize the gene family encoding NCR peptides in pea, which is of high importance for understanding the mechanisms of plant control over the fate of symbiotic microorganisms in its tissues.

This work was supported by Russian Science Foundation [grant number 17-76-30016 and 16-16-00118].

Effect of polyfunctional bacterial preparations on plant growth and development and oil content in soil

Korshunova T.Yu., Bakaeva M.D., Loginov O.N

UIB UFRC RAS, Ufa, Russia

E-mail: korshunovaty@mail.ru

The most effective, environmentally friendly and cost-effective method of rehabilitation of oil-polluted areas is bioremediation. It consists in treating soils with biological preparations of hydrocarbon oxidizing microorganisms. Often after this, plants are planted so that they help to prevent erosion by their root system, improve the gas-air regime of the soil and enrich it with various active compounds. This, in turn, leads to an increase in the number of microorganisms of the root zone and the intensification of decomposition of oil and oil products. All this contributes to the restoration of soil fertility. Therefore, the work on the creation of multifunctional biological preparations for soil purification from oil pollution and simultaneous stimulation of growth of plants-phytomeliorants, are topical.

In a laboratory experiment, the soil was contaminated with oil in an amount of 3 or 6% by weight, after which it was inoculated with any biopreparation in a volume of 10 ml/kg, watered and mixed thoroughly. The following biologics were used: a consortium of microorganisms *Acinetobacter calcoaceticus* IB DT-5.1/1 and *Ochrobactrum intermedium* IB DT-5.3/2; a mixture of microorganism cells of the consortium and *Ps. koreensis* IB-4 in the ratio 1:1; a mixture of cells of the microorganisms of the consortium, *Ps. koreensis* IB-4 and *Paenibacillus ehimensis* IB 739 in the ratio 1:1:1. Consortium of microorganisms has significant oxidative activity with respect to hydrocarbons of different classes, oil and its derivatives. Strain *Ps. koreensis* IB-4 and *P. ehimensis* IB 739 synthesize phytohormones. After 2 days, seeds of oat seed (*Avena sativa* L.) (30 pieces per vessel) were planted. The experiment was carried out at a temperature of 24°C for 42 days.

The difference in the oil content in the soil did not have any significant effect on the number of soil microbiota, the size and mass parameters of oat plants. Germination of seeds was approximately the same in all vessels – 94-96%, but more amicable and early (for 2 days) in variants with inoculation with biological preparations. The initial titer of heterotrophic microorganisms in the soil used was $(1.6 \pm 0.1) \cdot 10^5$, nitrogen fixing - $(1.0 \pm 0.1) \cdot 10^5$, hydrocarbon oxidizing microorganisms - $(2.4 \pm 0.1) \cdot 10^4$ CFU/g. Processing by the consortium of microorganisms and a mixture of three strains increased the number of heterotrophic and nitrogen-fixing microorganisms by 2 orders. A mixture of four strains contributed to an increase in the number of these groups of microorganisms by 3 orders. The titre of hydrocarbon oxidizing microorganisms, regardless of the composition of the biopreparation used, increased by 3 orders. Inoculation of contaminated soil with biological preparations contributed to a decrease in the content of pollutant in it by 3.2-3.5 and 3.4-3.7 times (at 3 and 6% oil content, respectively) compared with the variants where only oats were used without the addition of additional amount bacteria.

Introduction of biopreparations accelerated for 6-7 days the beginning of each stage of oat plant development and positively influenced the length and weight of its organs. The best results were achieved with the help of a biopreparation containing cells from a consortium of microorganisms and strains of *P. koreensis* IB-4 and *P. ehimensis* IB 739. When used, the growth of oat shoots increased by 54.0 and 77.8%, their mass in 2.3 and 2.6 times compared with plants in untreated soil with oil (3 and 6%, respectively). This is probably due to the presence of phytohormonal activity in bacteria *P. koreensis* IB-4 and *P. ehimensis* IB 739. The obtained data testify to the principle possibility of using the developed combined biologics containing bacteria-oil destructors and microorganisms with growth-stimulating activity, for soil purification from oil and acceleration of restoration of its fertility.

Composition of shoots endophytic flora of *Syringa vulgaris* plants from different populations

Krinitsina A.A., Churikova O.A., Konorov E.A., Speranskaya A.S.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.

E-mail: krinitsina@mail.ru

The vital activity of endophytic bacteria, associated with plants, doesn't affect the appearance and state of plants as a rule. The composition of endophytic communities which form in different organs (leaves, roots or shoots) may differ considerably as within one organism both in different individuals. Host genotype, plant age, soil type and geographical location as well may be involved in the composition and changeability of the shoot associated endophytic community.

The composition of endophytic flora of buds and adjoined parts of shoots of *Syringa vulgaris* plants from Moscow (municipal green plantations and Botanical garden of Lomonosov Moscow State University), Moscow region (municipal green plantations) and Voronezh (green plantations near small office buildings) was analyzed. Plant material was collected during the physiological plant dormancy – in winter and early spring. After superficial sterilization the bud scales were removed in sterile conditions from buds and bark – from the part of lignified shoot. Total DNA extraction was carried out with CTAB – method. The preparation of samples for high throughput sequencing of the region of 16S rRNA gene was conducted according to Illumina protocol. PCR was carried out on T100 ThermalCycler ("Bio-Rad", USA) with the use of primers recommended by Illumina, sequencing – on MiSeq (Illumina). Phylogenetic profile of methagenome readings was get with the aid of BLASTN (data base 16S RefSeq Microbial, e-value <0.01) and MEGAN v6.10.

7 independent bacterial communities were analyzed: 2 from plants which grow in MSU Botanical garden, 2 – from plants which grow in Moscow near dwelling houses, 1 – from Moscow region, 2 – from Voronezh industrial zone. It was shown that the most various communities (Shannon-Weaver index = 3.148, 2,32 и 2,304) turned out the communities of endophytic bacteria from the shoots of lilac plants which grew near dwelling houses in Moscow and Moscow region. But on the whole in these communities two genera are predominated: *Chthonomonas* and *Dichotomicrobium*. The same ones were found in other analysed communities, while their shares were 3,04-8,07% and 3,02-5,43%, accordingly. The least variety (Shannon-Weaver index = 0,813 and 1,385) of endophytic bacteria genera turned out to be in shoots of plants from Voronezh industrial zone. For four bacterial communities, which were obtained from plants growing in MSU Botanical garden and in industrial zone of Voronezh the main genus of bacteria is Burkholderia. Its share is 46,34% and 68% (bacterial communities of plants from MSU botanical garden) and 54,19% and 90,3% (bacterial communities of plants from Voronezh). In bacterial communities of shoots from lilac plants from MSU botanical garden bacteria of genera *Sediminibacterium*, *Ralstonia*, *Plesiocystis*, *Microbacterium*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas* and *Pseudanabaena* were found as well. The representatives of three latest genera also were found in other communities. In whole the composition of bacterial communities of lilac plants from Voronezh turned out to be similar to the bacterial communities of plants from MSU botanical garden.

Thus the presence of *Chthonomonas*, *Dichotomicrobium*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas* and *Pseudanabaena* representatives is characteristic of all analyzed bacterial communities. Three latest genera are typical representatives of leaves and stem microbiota. *Chthonomonas* and *Dichotomicrobium* were detected only in plant rhizospheres till quite recently.

This work was carried out in accordance to Government order for the Lomonosov Moscow State University (project No. AAAA-A16-116021660105-3).

Effect of glyphosate on Cu(II) uptake by *Medicago sativa* Lam. inoculated with *Enterobacter cloacae* complex K7

Kryuchkova Ye.V., Burygin G.L., Lyubun E.V., Turkovskaya O.V.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, RAS, Saratov, Russia.

E-mail: kryu-lena@yandex.ru

Glyphosate (Gl) is an organophosphorus herbicide. The Gl molecule has phosphonate, amine, and carboxylate groups, which can coordinate with metal ions, especially at near-neutral pH. Cu(II) is extensively used for agricultural purposes as a fungicide and also as a complex former in Gl–Cu complexes. We examined the uptake of Cu(II) and Gl–Cu complexes by alfalfa. Another objective was to determine the protective effect of the plant–growth–promoting, Gl–degrading strain K7 on plants under phytotoxic conditions and the strains influence on the bioavailability of the contaminants. Surface–sterilized seeds of alfalfa (*Medicago sativa* Lam.) were grown in nutrient solution in a glass pot under aseptic conditions. In all experiments, fresh solutions of Cu(II) or of a Gl–Cu complex was added to the nutrient medium at concentration of 0.5 mM and 1 mM. The seeds were inoculated by soaking in a suspension of strain K7 (OD₆₆₀=0.2) for 2 h, and then 15 seeds were planted in each pot. After 30 days of growth, the plants were harvested, weighed, and dried at 65°C for 72 h. The amount of copper taken up by the plants was found by atomic absorption spectroscopy. Inoculation with strain K7 did not produce statistically significant change in the fresh weight of *M. sativa*, except in the treatment significant with the Gl–Cu complex. Compared with the uninoculated treatment, the fresh weight of the inoculated plants increased by 55% ($p < 0.05$). Inoculation statistically significantly increased the dry weight of control plants (by 11%; $p < 0.03$) but did not change this variable in a polluted environment. Summary, Gl significantly increased the Cu(II) concentration in alfalfa (by 50%), as compared with the treatment with the non-chelated metal. In addition, the amount of Cu(II) in the inoculated plants was 1.29-fold greater with 0.5 mM Cu(II) and 2–fold greater with 1 mM Cu(II) than it was in the uninoculated plants. Our data are important for the prediction of pollutant transport in agricultural crops.

Influence of bioinsecticides based on *Bacillus thuringiensis* on potato leaves pigment and antioxidant complex

Kryzhko A., Kuznetsova L.

Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russia

E-mail: solanum@ukr.net

Applying the bioinsecticides based on *B. thuringiensis* entomopathogenic bacteria in the potato pest protection system causes the interest in studying the influence of these bacteria on the plants physiological condition. Changes in photosynthetic pigments content of, activity of peroxidase and polyphenoloxidase have an adaptive significance and can be considered as a necessary condition of plant resistance. Thus, the question of the bioinsecticides impact on the plant physiological condition is of some interest.

The bioinsecticides based on *B. thuringiensis* 0371 and 836 strains (BT 0371 and BT 836) was used as the object of studies. The strains were isolated from the natural populations of insects in the entomopathogenic microorganisms laboratory of Research Institute for Agriculture of Crimea. The strain 0371 can produce the parasporal crystals and exotoxin during sporification. The strain 836 can produce only the parasporal crystals. The action of strains was compared with the action of the chemical insecticide Biscaya. All studies were carried out on the potato pea Nevsky variety. The pigments content was determined spectrophotometrically. The activity of peroxidase and polyphenoloxidase was determined by the method of A. N. Boyarkin (1961). Benzidine and paraphenylenediamine were used as a substrate.

The study of bioinsecticides effect on the pigment complex of potato leaves showed a decrease in the content of chlorophyll b and carotenoids in germination phases (18,7 and 13,8% to control) and budding (29,4 and 12,3% to control) in the variant with the plants treatment by BT 0371. The decrease in chlorophyll concentration may indicate that β -exotoxin inhibits the activity of light-harvesting complex. Treatment of plants by BT 836 had no negative impact on the pigment complex.

On the contrary, the most expressed decrease in the content of chlorophyll a were observed in the when flowering phase (by 45,6%) while processing potato plants with Biscaya. There was also a decrease in the content of carotenoids by 41,4% to control.

It was found that the activity of enzymes peroxidase and polyphenoloxidase in potato leaves depends on the type of insecticides and their safety on the surface of the leaf. Under the influence of BT 0371 and BT 836, there was a slight and short-term increase of enzyme activity in 6-8 days after their application. There was no a significant impact on the activity of antioxidant enzymes while processing the plants with Biscaya.

The obtained data indicate that bioinsecticides based on *B. thuringiensis* strains differ in the effect on the pigment complex of potato plants. Their using in potato agrocenosis can contribute to the preservation of plants oxidative metabolism at a stable level and provide an increase in the adaptive capacity of the plant organisms.

Capacity of rhizobacteria to produce and destroy plant hormones as a basis for biotechnology to promote growth, productivity and stress resistance of inoculated plants

Kudoyarova G., Arkhipova T.

Ufa Institute of Biology UFRC RAS, Ufa, Russia

E-mail: guzel@anrb.ru

Introduction of plant growth promoting bacteria (PGPB) into rhizosphere became a popular approach aimed on increasing plant productivity at both favorable and stressful environment. Capacity of PGPB to produce or destroy phytohormones is believed to be one of important mechanisms contributing to their beneficial effects on plants. This assumption is based on discovery of phytohormones or enzymes involved in hormone metabolism in the PGPBs culture media. In many cases this discovery was considered as sufficient explanation for beneficial effects of PGPBs and researchers did not go further in their study. High capacity of plant roots for the uptake of almost any compound suggests that phytohormones produced by PGPB should easily penetrate plant roots. This assumption is confirmed by our experiments using immunohistochemical technique showing increased content of cytokinins and abscisic acid in the root cells of plants, to whose nutrient medium we added these hormones. Still experiments show the importance of following not only potential capacity of bacteria to produce hormones *in vitro*, but also their effect on hormone content in the plants treated with PGPB. Comparison of the hormone content in wheat plants inoculated with the strains of *Bacillus subtilis* IB-21, *Advenella kashmirensis* IB-K1 and *Pseudomonas extremaustralis* IB-K13-1A showed that their effect on auxin content in the wheat plants and corresponding effects on plant productivity in the field experiments depended on both potential capacity to produce auxins and efficiency of colonization of plant roots with the bacteria. Detection of increased levels of auxins in the plants allowed predicting beneficial effects on plant productivity. The increase in hormone content was also registered in lettuce plants inoculated with cytokinin producing *B. subtilis* IB-22. Changes in cytokinin content were accompanied by and were likely responsible for increased productivity of biomass accumulation in inoculated lettuce. The effect of bacterial inoculation on leaf area of lettuce plants was far more noticeable with the increased density of planting that by itself decreased cytokinins content in the absence of bacterial treatment. Elevated cytokinin content and increased productivity of the lettuce plants treated with cytokinin producing bacteria were observed both under optimal water supply and its shortage. Capacity of cytokinins to increase plant productivity under stressful conditions is of special interest, since some researchers believe in detrimental effects of these hormones on plant stress resistance. This assumption is based on experiments with excessively high (non-physiological) concentrations of exogenous cytokinins applied to the plants. Concentrations of PGPB produced hormones, by definition, should be beneficial and within physiological range, and consequently the study of the effect of phytohormone producing PGPB on plants is a promising model for revealing mechanisms of actual hormone action. Thus capacity of PGPR to produce phytohormones has a distinct beneficial effect on plant growth and productivity. But what is the profit of hormone production for microbes themselves? Our study of the effects of both treatment of lettuce plants with exogenous cytokinin 6-benzylaminopurine and introduction of cytokinin producing bacteria into their rhizosphere showed increased exudation of amino acids by the roots of treated plants. Similar effect may be expected in the case of auxin producing bacteria, since auxins have also been shown to increase root exudation. These results suggest that production of phytohormones by microbes is likely to elevate root exudation thereby increasing the supply of carbohydrates necessary for microbe growth. Thus regulatory loop involving hormone production by microbes is likely to be important for establishment of the successful association between PGPR and plants.

Molecular mechanisms of organ size regulation in plants

Kuluev B.R., Mikhaylova E.V., Knyazev A.V., Berezhneva Z.A., Nikonorov Y.M., Chemeris A.V.

Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, Ufa, Russia

E-mail: kuluev@bk.ru

One of the most important growth parameters of plants are the organ sizes that are regulated by a variety of internal and external biotic and abiotic factors. In general, the size of plant organs is controlled by two main mechanisms, namely the regulation of cell division and cell expansion. The aim of our work was to elucidate the molecular mechanisms of regulation of transcription and interaction of the *AINTEGUMENTA*, *ARGOS*, expansins and endoxyloglucantransferases genes, as well as the creation of transgenic plants with altered organ sizes. In the our research, it was shown that in the transgenic tobacco plants, the dahlia mosaic virus promoter has a greater activity than the 35S promoter, and when combined with genes involved in the regulation of growth, contributes to a more significant effect of the latter on organ sizes in transgenic plants. It was proved that the compensatory cell growth with a decrease in the number of cells in growing organs is controlled by cytokinins through the stimulation of expansins and endoxyloglucantransferases expression. It was found that the transcription factor *AINTEGUMENTA* controls the organ size affecting not only cell division but also cell expansion, and its expression is regulated not only by auxins, but also by cytokinins and brassinosteroids. It has been shown that the expression of the poplar *ARGOS-LIKE* gene is controlled by auxins, and its protein product is involved in the regulation of cell expansion and the organ size. It turned out that the signals from the phytohormones to the expansin and xyloglucanendotransglycosylase genes partially go through the products of *ARGOS* genes, where the signal transduction occurs and its transfer to the transcription factor *AINTEGUMENTA*. At this stage of the transmission of the cellular signal, its multiple amplification occurred. The *PnANTL1*, *AtARGOS-LIKE*, *PnARGOS-LIKE*, *NtEXPA1*, *NtEXPA5*, *PnEXPA1* and *PnEXPA3* genes are involved in the regulation of organ sizes through stimulation of cell expansion, while the *NtANTL*, *BnaX.ANT.b*, *PnANTL2* and *AtARGOS* genes control the organ size not only through the effect on cell division, but also through stimulation of cell expansion. One of the applied tasks of the work was to increase or decrease the size of plant organs by changing the level of expression of the *AINTEGUMENTA*, *ARGOS*, expansins and xyloglucanendotransglycosylases genes. In general, about 100 target genetically engineered constructs in binary vectors were created and tested on tobacco within the framework of the whole work. For the morphological analysis, about 400 lines of second-generation tobacco transgenic plants were used. About the third part of all the analyzed lines of transgenic tobacco plants were characterized by a significant change in the size of the organs compared to wild-type plants. The genetically engineered constructs (in binary vectors) approved on tobacco were selected for transformation of other economically valuable plants. For example, in the our research, transgenic plants of rapeseed, aspen, and amaranth were obtained and analyzed, with constitutive expression of *ARGOS* genes, which were characterized by an increase in the size of organs.

The study was funded by RFBR according to the research project № 18-04-00118.

Azospirillum phenol oxidases interactions with host plants

Kupryashina M.A., Nikitina V.E.

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

E-mail: kupryashina_m@mail.ru

Diazotrophic *Azospirillum* bacteria are known for synthesizing biologically active substances, which positively affect plant growth and development, and used as model objects to study plant-bacterial associations. We have recently demonstrated that these bacteria can produce a phenol-oxidizing enzymes complex together with the other enzymes like laccase, Mn- and lignin peroxidases.

The three-day sterile wheat seedlings of Saratovskaya strain 29 were inoculated with *A. brasilense* Sp245 (endophytic strain) and Sp7 (epiphytic strain) with subsequent co-cultivation for 4 weeks to study the dependence of phenol oxidases activity in the presence of host plant.

The inoculation of wheat with bacteria resulted in increase of laccase and Mn-peroxidase activity in the growing medium compared to the control samples. The inoculation of the host plant with an epiphytic strain showed the main increase of extracellular Mn-peroxidase activity. The lignin-peroxidase activity was detected in trace amounts with non-strain specificity.

The colored zones on the light microscopy images of bacterial cells clusters on the root surface dyed with specific chromogenic substrates indicated the accumulation of phenol oxidases. In contrast, the control samples without bacteria were colorless. Analogous staining was noticed both for the endophytic *A. brasilense* Sp245 strain and *A. brasilense* Sp7.

The formation of biofilms and cell clusters with inner accumulation of biological active compounds and enzymes is one of the well-established ways for bacterial environmental survival. The obtained data indicate that Mn-peroxidases and laccases are accumulated in the bacterial cluster zones on the root surface activity thus indicating the possible role of these enzymes for azospirilles adaptation to rhizosphere conditions.

It can be assumed that extracellular phenol oxidase production is functionally significant both for bacteria and host plants. The kinetic properties of laccases, lignin and Mn-peroxidases mediate the elimination of the negative effect of toxic substances accumulated in soil. Finally, we have demonstrated the azospirilles' phytotoxic pollutant dyes biodegradation ability.

The reported study was funded by RFBR according to the research project No 18-316-00008 mol_a.

Bacteria belonging to genera *Advenella*, *Bacillus* and *Pseudomonas* as a promising biopreparations base for horticulture

Kuzmina L.Yu., Arkhipova T.N., Aktuganov G.E., Galimzianova N.F., Chetverikov S.P., Melentiev A.I.

Ufa Institute of Biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: ljkuz@anrb.ru

Bacteria that capable to colonize the rhizosphere and positively affect plant growth are commonly termed as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). The mechanisms of the beneficial effect exerted by PGPR are associated with synthesis of various metabolites and hydrolytic enzymes, as well as with their ability to increase the availability of nutrients and the survival of plants. Currently the great significance for agriculture is search and characterization of plant-growth promoting microorganisms promising as base of novel biopreparations displaying complex protective and stimulating effect.

The objective of the study is to evaluate the complex of PGP-properties displayed by promising bacterial strains belonging to genera *Advenella*, *Bacillus* and *Pseudomonas* including such characteristics as mobilization of poorly soluble phosphates; production of phytohormones, chitinases and cellulases; nitrogenase activity; antagonism against phytopathogenic fungi; relative halotolerance; and the potential of combined application of mentioned strains comprised of single biopreparation.

The subjects of the study were 14 strains of bacteria of the genera *Advenella*, *Bacillus* and *Pseudomonas* from the Microbial Collection of UIB UFRC RAS. The ability of bacteria to synthesize hormones was evaluated in liquid media, where IAA was determined by enzyme-linked immunosorbent assay in the appropriate test system. The nitrogenase activity of the bacteria grown in a liquid submerged culture was determined by acetylene method. Enzyme production, phosphate-mobilizing and antifungal activities were studied on agar media with appropriate substrates. Enzymatic and phosphate-solubilizing activities were calculated from the index of the halo zone and colony size. The antagonistic effect of bacteria against micromycetes was evaluated in co-cultivation experiments. Antagonistic interactions between bacterial strains were studied using perpendicular streak technique.

All studied bacterial strains were capable to dissolve phosphates. Six strains additionally produced auxins (283 - 790 ng/ml). Some of the cultures revealed also nitrogenase activity, antagonism against phytopathogenic fungi, production of extracellular chitinase and cellulase. Most significant antagonistic effect was demonstrated by the strains belonging to genus *Bacillus*.

Among

the strains displaying nitrogenase and CMC-ase activity *B. subtilis* IB-54 was characterized with maximal antagonistic action against broad range of plant pathogenic fungi, while the strain *A. kashmirensis* IB-K1 exerted a significant phosphate-mobilizing ability. Both the cultures belonging to *Bacillus* and *A. kashmirensis* IB-K1 were moderate halophiles (up to 7% NaCl), whereas the members of genus *Pseudomonas* were resistant to rather minor salt concentrations (4-5%).

In estimating of bacterial interaction specifics at co-cultivation experiments it was found unilateral antagonistic action of the strains belonging to genus *Bacillus* against *A. kashmirensis* IB-K1, *P. mandelii* IBKi14, *P. extremaustralis* IBKi13-1B and *Pseudomonas* sp. IBKi-19 while all members of bacilli well grew under co-cultivation with each other. Only strain *P. extremaustralis* IB-K13-1A could successfully grow together with all studied bacterial cultures.

The main experimental results revealed six bacterial strains (*A. kashmirensis* IB-K1, *P. extremaustralis* IB-K13-1A, *P. mandelii* IBKi-14, *B. atrophaeus* IB-21, *B. subtilis* IB-22, *B. subtilis* IB-54) demonstrating the properties specific for PGPR and promising as base of novel multifunctional biopreparations for horticulture.

The study was carried out with the funding from Russian Foundation for Basic Research, grant No. 18-04-00577 A.

Pulsatilla uralensis* (Zämelis) Tzvelev: the features of input in culture *in vitro

Kuznetsova E.N.

Udmurt state university, Izhevsk, Russia

E-mail: pteris-2008@mail.ru

One of the most laborious stages of microclonal reproduction is the introduction of explants into the culture *in vitro*. Different parts of the plant, as well as seeds, can be used as explants. The last type of explant is preferable to use for input into sterile conditions of rare plant species, because a relatively large amount of seed (if it compared to other types of explants) increases the probability of success of microclonal reproduction.

The object of the study was the species *Pulsatilla uralensis* (Zämelis) Tzvelev, listed in the Red book of the Udmurt Republic (2012) and has 3 category of rarity. Seeds for experiments have been collected from the plants growing in natural population in the Yakshur-Bodyinsky district of Udmurtia. Generally accepted methods were used to determine the quality of the seed material and input into the culture *in vitro*.

Estimation of seed's quality showed that germination under non-sterile conditions was $88.3\% \pm 3.1$. So the collected seed material is suitable for further input into aseptic conditions.

According to literature data, pubescence of seeds of *P. uralensis* can be as a source of contamination. Just before input seeds in culture *in vitro* pubescence has been removed by physically with the aim of increasing the probability of successful putting in a sterile environment. For *P. uralensis* the best option of disinfectants was the combination of 70% ethyl alcohol and 15% peroxide of hydrogen (germination $80,0\% \pm 5,8$). Removal of pubescence and the use of complexes of various sterilizing agents significantly reduced the likelihood of infection on the explants. Also for this species the process of seed germination *in vitro* conditions and the further development of seedlings slowed down compared to similar indicators in non-sterile conditions. So that the beginning of germination during the introduction into the culture *in vitro* ranges from 14 to 30 days, whereas in non-sterile conditions the duration of the same period is twice less. Germination in aseptic conditions is sporadic, strongly stretched in time, in non-sterile conditions the seeds germinate together. The peak of germination *in vitro* is observed about 17-25 days. Seeds treated with ethyl alcohol and hydrogen peroxide begin to germinate earlier than seeds that treated by other sterilization agents.

Thus seeds of rare species *Pulsatilla uralensis* are characterized by high rates of both laboratory germination and germination under sterile conditions (over 50%). Application of various sterilizing agents at input in the culture *in vitro* slows down germination process. The influence of sterilizing agents on germination should be considered in the selection of sterilizing agents for the purpose of successful input in the culture *in vitro* of seeds *Pulsatilla uralensis*.

Transformation of tobacco plants by the pseudochelatin gene *pph6*

¹Lavina A.M., ¹Khakimova L.R., ¹Blagova D.K., ²Serbaeva E.R., ¹Sadykova L.R., ¹Vershinina Z.R., ¹Baymiev Al.Kh.

¹Institute of Biochemistry and Genetics UFRS RAS, Ufa, Russia

²Bashkir State University, Ufa, Russia

E-mail: lili-nigmatullina@bk.ru

At present, the problem of soil contamination with heavy metals (HM), in particular cadmium (Cd) and nickel (Ni), is becoming more urgent. They are toxic to all organisms and cause diseases of animals and humans. In this regard, it is actual to develop effective methods for cleaning contaminated areas from HM. For the cleaning and stabilization of contaminated areas, the most attractive is the use of plants, or "phytoremediation." The use of plant-hyperaccumulators that are able to accumulate significant amounts of HM and promote their removal from the soil, will allow the purification of contaminated areas. To increase the phytoremediation efficiency of plant-hyperaccumulators HM, it is advisable to transform the plants with phytohelatin genes, which encode the synthesis of metal-binding peptides. Most phytohelatins are characterized by the presence of a gamma-peptide bond in the molecule, which complicates their synthesis in cells. Therefore, for the transformation of plants the most promising is the use of synthetic pseudochelatin genes (without gamma-peptide bond) that retain the ability to bind HM.

The aim of the study was to obtain tobacco plants transformed with pseudophytochelatin gene *pph6*.

The transformed tobacco leaf sheets were grown at various concentrations of Cd²⁺: 100, 200, 300, 400 µM. At a concentration of 100 µM there were no special differences between the development of the experimental and control groups. With a concentration of 200 µM, there were obvious differences between the experimental and control groups: the growth of the control group was suppressed and proceeded slowly, and clear signs of growth and differentiation were observed in the experimental group. In experiments with extreme concentrations of cadmium 300 and 400 µM, almost all plants died within a month and there were no signs of regeneration of leaf blades. Thus, it can be concluded that at the metal concentrations of approximately 200 µM, the transformed plants develop better than the control ones. It indicates the stable expression of the pseudophytohelatin gene, which increases their resistance to stress by reason of excess HM due to bind heavy metals.

To assess the storage properties of tobacco plants transformed with the *pph6* gene, they were grown on soil containing 100 µM cadmium. The results of the experiments showed that in the transformed plants cadmium accumulates by 35% more than in the control plants.

In the future it is supposed to create recombinant soil bacteria transformed with pseudophytochelatin *pph6*, and plant-hyperaccumulators transformed with the adhesin gene, for example, the gene *rapA1*. Adhesins promote the attachment of bacterial cells to root hairs of plants. It will help to create new stable symbiotic systems for phytoremediation.

This work was performed with support from the Russian Foundation for Basic Research (projects № 16-04-00902 A and № 18-34-00033).

Diversity of agrobacteria in the vineyards of the Krasnodar Territory

Makarkina M.V., Ilnitskaya E.T.

Federal State Scientific Budget Institution «North-Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Winemaking», Krasnodar, Russia

E-mail: konec_citatu@mail.ru

Agrobacterium (*Agrobacterium vitis* and *A. tumefaciens*) are dangerous phytopathogens that can cause the development of tumor formation in grape plants, the so-called crown gall. The systematization of agrobacteria is a complex issue, due to the wide variety of bacteria of this genus. It is common to divide agrobacteria into 3 main species: *A. tumefaciens* (mainly parasitize on fruit crops), *A. vitis* (parasitize on grapes), *A. rhizogenes* (cause the disease "bearded roots"). Grapes are mostly parasitized by agrobacteria of the *A. vitis* type, however, some strains of *A. tumefaciens* are also capable of causing the development of crown gall. Agrobacterium strains are also classified by the type of Ti-plasmids contained in them. Currently, eleven types of opines are distinguished: octopine, nopaline, succinamopine, agropine, agropine/mannopine, mannopine, chrysopine/succinamopine, chrysopine/nopaline, cucumopin/mikimopine, octopine/cucumopine and vitopine. *A. vitis* predominantly metabolizes nopaline, vitopine, octopine in various combinations and rarely other types of opines. The purpose of our work is to identify and study the diversity of *Agrobacterium* by the type of Ti-plasmids contained in them.

76 samples of tumor-like growths were collected in 14 farms of the Krasnodar Territory, located in different geographical areas. DNA was isolated by the CTAB method with some modifications. For PCR analysis, 5 test-systems were selected: virD2A/virD2C to *virD2* gene, for a long time considered universal for the identification of all agrobacteria; PGF/PGR to the polygalacturonidase (*PG*) chromosomal gene, designed to identify only *A. vitis*; OCTF/OCTR to octopine synthase, NOPF/NOPR to nopaline-synthase and VISF/VISR to vitopine-synthase genes, defining the type of Ti-plasmid of the studied agrobacteria.

Using a universal test-system for virD2A/virD2C to the *virD2* gene, the target sample (224 bp) was able to amplify only in 85 % of the samples, which probably tells us about the unique structure of the isolates studied. It should be noted that similar data were obtained in the works of other scientists engaged in studying agrobacteria on grapes. Using the PGF/PGR test-system for PG gene, the target fragment (466 bp) was amplified in 100% of the studied samples, which indicates the unambiguous belonging of the studied agrobacteria to the *A. vitis* species. Using the OCTF/OCTR test-system for the octopine synthase gene, it was possible to amplify the target fragment (475 bp) in 73 % of the samples. With the NOPF/NOPR test system to nopaline synthase gene, the target fragment (394 bp) was determined in 13,5 % of the samples. The VISF/VISR test-system for the vitopine synthase gene revealed the target fragment (561 bp) of this gene in 27 % of the samples studied. As a result, the agrobacteria studied by us were divided into 4 groups by the type of Ti-plasmids contained in them: octopine (59,5 %), nopaline (13,5 %), vitopine (13,5 %), octopine-vitopine (13,5 %).

Thus, vineyards of the Krasnodar Territory are parasitized by *A. vitis* differing in type of Ti-plasmids contained in them.

The work was carried out with the financial support of the RFBR grant № 16-34-00827 mol_a.

The hydrolase immobilization on the glass electrode to develop conductometric biosensor

Maksutova V.O., Tsvetkov V.O.
Bashkir State University, Ufa, Russia
E-mail: zv347@yandex.ru

The development of fast, accurate and cheap methods for determining the content of antibiotics in bee products is an urgent task for our region. To solve this problem, the use of electronic biosensory systems based on a specific enzyme and a digital recording device is promising. A number of authors proposed similar systems for determining the concentration of some compounds in the environment, for example, a conductometric biosensor for the determination of pesticides based on screen-printed carbon electrode with immobilized phosphatase.

To create a model biosensor and choose an immobilization technique, we used the glass electrode, which is cheaper than SPCE. As a model enzyme trypsin was used, for which it is possible to determine the activity quickly and clearly by hydrolysis of synthetic substrate BAPNA. The activity was evaluated on a spectrophotometer at a wavelength of 405 nm.

To immobilize the first way on the glass electrode site with a size of 10 by 10 mm was applied a saturated solution of egg albumin in 2% glycerol, dried, denatured at 70 °C in dry air thermostat, then added 10 µg of trypsin in 2% glutaraldehyde and dried at 37 °C. To immobilize the second way the same amount of trypsin in 3% gelatin was dried, and then maintained at 2% glutaraldehyde. Then the glasses were stored at 4 °C, and the activity of immobilized enzymes was measured for 10 days. The hydrolysis reaction of BAPNA was carried out according to the previously described technique, keeping the glass in the substrate solution for 20 and 40 minutes.

The measurements showed that enzymes immobilized using albumin remained an activity unchanged during the measurement period, whereas the enzyme immobilized in gelatin showed a continuous decrease in activity. It should be noted that for the reaction duration of 40 minutes there were actually no differences in enzyme activity due to immobilization technique. At the same time, when the reaction lasted 20 minutes, the activity of trypsin immobilized in gelatin was significantly lower than that immobilized in albumin. The observed effect can be explained by the fact that, in the case of immobilization using gelatin, the active enzyme is inside the carrier layer, and it takes some time for the substrate to penetrate the enzyme. Therefore, in the practical absence of differences in the effectiveness of enzyme binding between the two methods, binding the enzyme to the surface of the carrier is more preferable to create a biosensor for use in express test systems.

Localization of CLE peptide receptors in radish storage root and natural tumors

Malovichko Y.V., Tkachenko A.A., Dodueva I.E., Lutova L.A.

Saint Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

E-mail: 271296251017a@gmail.com

In plants, cell proliferation and differentiation processes are contained within specialized tissues called meristems. Ectopic meristematic activity leads to formation of so called irregular meristems, which give rise to such morphological structures as tumors, galls or calli. Unlike callus or gall formation, tumorigenesis has been reported in a narrow spectrum of species, including those of genera *Nicotiana*, *Raphanus*, *Arabidopsis*, etc. Our research group has been studying tumor formation in several inbred lines of *Raphanus sativus* (radish), in particular, with role of WOX-CLE signalling in this process. Several CLE genes, such as RsCLE1, 2, 11, 13, 16, 19 and 41, were found to be expressed in radish tumors, either in specific tissues or ubiquitously throughout the tumor. In the present work we elucidate the involvement of CLE peptides in tumorigenesis by determining tissue localization of CLE receptors, such as CLV2, CRN and PXY. First, we confirmed the presence of respective transcripts by RT-PCR and RNAseq. To localize these receptors, we constructed plasmids containing either coding sequences of receptors in question fused with that of eGFP or native GUS coding sequences under control of respective promoters cloned from *Arabidopsis*. We transformed radish plants of two genetic lines differing in tumor-formation trait with with *Agrobacterium rhizogenes* containing aforementioned plasmids and obtained chimeric plants with transgenic roots. Distribution of reporter signal was validated by means of confocal microscopy and suggests involvement of receptors of interest in storage root formation as well as distortion of localization pattern in root tumors. We also plan to elucidate localization of expression for several CLE genes and WOX4/WOX5 genes to see whether its pattern is consistent with receptor gene expression.

Application of associations of fouling from the entrance areas of karst caves for recultivation¹Mazina S.E., ²Kozlova E.V., ³Koncevova A.A., ²Kurbatova A.I.¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia³Russian State Agrarian University-Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia*E-mail: conophytum@mail.ru*

Recultivation includes technical and biological stages. Technogenic landscapes formed as the result of anthropogenic activities, military operations and tests as well as lands suffered due to elemental calamities and natural hazards fall under the recultivation.

Waste dumps can occupy significant areas representing substrates unfit not only for the growth of higher plants, but for the development of microbiota as well. This is determined by physical and chemical characteristics of substrates, among which there are the low porosity, non-optimal acidity, content of harmful elements and so on.

Even in case of measures on the recultivation undertaken competently, it needs time, sometimes, significant to create a stable phytocenosis, the formation of which also depends on the soil microbiota. Unfortunately, in practice, recultivation is not always carried out at the appropriate level, often, we can observe the waste-pile sites, in which not all the procedures of technical stage of work were fulfilled or the technologies of recultivation were violated. The deserted dumping sites also represent a problem, where recultivation was not carried out in those volumes that are accepted at present.

Geomorphological features of the recultivated landscapes, the difference in physical-and-chemical conditions of potential habitat of biota, climate, surrounding ecosystems and the direction of restoration determine the variety of approaches to the biological stage of recultivation. The complex restoration of phytocenosis includes not only the selection of optimal, for this region, microclimate and substrate species of plants, but the formation of soil and its microbiota as well.

Thus, it is necessary, in every particular case, to select the optimal choice of measures, strategy of restoration of relief, ground and soil content, species of plants and microbiota to create stable associations and ecosystems.

In the implementation of biological stage of recultivation, a number of problems arises, for example, restoration of lifeless substrates, in particular, rock exposures and waste dumps and, in case of soil cover restoration, maintenance of soil fertility and its microbiota, since the soil used in recultivation is significantly transformed.

These problems can be solved by introduction of the associations of microbiota into the ground able both for a rapid development at the initial stages of fouling and for enrichment of soil that was the purpose of this work.

It is considered as optimal to use species having a wide range of adaptations to the changes of the environment. Such species can be obtained from the associations of the extremal habitats and ecotones. In this case, the associations of karst underground ecosystems were chosen. As the result of analysis of the associations of fouling of the entrance zone of a number caves, some species of cosmopolites and ubiquists, psychrotolerant bacteria stable to the deficiency of illumination, phototrophs able to endure drought and rapidly to restore in moistening, were selected. The majority of community films represent the symbiotic associations from photosynthetic species and micromycetes. As illustrated by caves of Bashkiria, Siberia, Crimea, Caucasus and Abkhazia, it was established that there are stable associations of species of green algae *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck], cyanobacteria *Leptolyngbya tenuis* (Gomont) Anagnostidis & Komárek with micromycetes of the genus *Penicillium*; species *P. chrysogenum* Thom and *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl were isolated more often from the associations. These associations can be used for recultivation.

The work is carried out with support of RFBR, grant № 17-55-40003.

Selection of strains of associative bacteria to different plant species

Melnichuk T.N., Kameneva I.A., Yakubovskaya A.I.

FSBSI «Research Institute of Agriculture of Crimea», Simferopol, Russia

E-mail: melnichuk7@mail.ru

Formation of productive systems "plant-microorganism-soil" with the use of microbial preparations is an important prospect of obtaining high-quality competitive agricultural products, preserving soil fertility and environment. Associative microorganisms provide plants with elements of mineral nutrition stimulate growth, increase adaptive potential to stress factors.

In order to accelerate and make the selection process more focused, the methodical approach that allows general selection of associative microorganisms for specific plant species is offered. Obtaining the apical part of the root, free from the substrate, is provided by growing the plants in the vascular system. This part of the root is populated by those microorganisms that independently or in cooperation with others are able to associate with the root system of a given plant species. Since microorganisms and plants are in interaction and mutual influence on one another, conditions for a cumulative culture of microorganisms with selective influence of root exudates are created.

As a result of the studies, associative strains of bacteria from southern chernozems in regard to cabbage (*Brassica capitata* var. *alba* Litzg.), tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cucumber (*Cucumis sativus* L.) and soft wheat (*Triticum aestivum* L.) were isolated. The number of associative bacteria for cabbage was 31 morphotypes with a frequency of occurrence 17-100% and abundance 0.3-65.4%. The largest number of morphotypes (52) was obtained from the apical part of the tomato root. The frequency of their occurrence and abundance was 10-100% and 0.2-49.9%, respectively. The least number of morphotypes (27) was isolated from the cucumber with the lowest frequency of occurrence (10-70%) and abundance (0.2-65.4%). Two samples of southern chernozems from the virgin soil and agrocenosis were used in the experiment. The maximum number of bacterial morphotypes on each plant species was isolated from virgin soil. Five strains of associative bacteria were isolated from the apical part of the wheat root.

Analysis of microorganisms for the presence of spores showed that 57% of all studied isolates were spore bacteria: 60% of isolates isolated from the apical part of cucumber roots, 62% - from tomato, and 50% - from cabbage. On Vinogradsky's nitrogen-free medium, 30% of isolates grew well, and the same number did not grow at all, and 40% of bacteria showed weak growth. Strict aerobic organisms were 12% of isolates.

Our research shown, that associative strains positively influenced on the growth and development of different species of vegetable plants. An increased stimulating effect on the development of the root system was noted. This is an important factor for root development of vegetable crops seedlings. Tested strains positively influenced on the development of cress (sometimes referred to as garden cress), increased above-ground dry weight of plant by 9.1-27.3% and dry weight of roots by 18.2-63.6% compared to the control.

Twenty-one morphotypes were isolated from the apical part of the soft wheat root. Five strains of associative wheat bacteria showed positive effect on various types of cereals. Stimulation of wheat roots during bacterization of seeds showed an increase in their length by 8.5-21.3%, by 15.4-24.0% for barley, by 8.5-24.3% for triticale and by 26.8-63.5% for rye in comparison with the control.

Thus, the developed methodological approach provides accelerated production of new strains of microorganisms that are associative to particular plant species. The number of obtained strains, their abundance and frequency of occurrence in the apical part of the root determine the type of plant and the characteristic composition of root exudates, as well as the diversity of microorganisms in soil samples. Associative strains had positive influence on the growth and development of different plants species.

Prospects for genome editing in Brassicaceae¹Mikhaylova E.V., ¹Kuluev B.R., ²Sukhareva A.S., ¹Chemeris A.V.¹Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, Ufa, Russia²Bashkir State Pedagogical University, Ufa, Russia*E-mail: mikhele@list.ru*

CRISPR/Cas genome editing technology is still used mostly on bacterial and animal objects, but not on plants. Although it has great potential in fighting hereditary diseases, the practical use of technology for editing plant genome seems to be more achievable in the coming years. However, a problem of delivering the genetic construct to the cell still remains. Successful editing depends strongly on the design of the guide RNA, which should be chosen properly in order to reduce the possibility of the formation of hybrid DNA / guide RNA duplexes in non-targeted genome sites. Many programs for the design of guide RNA are available, however, they can only be applied to the organisms, which genomes have already been sequenced.

The most well studied plant organism might be *Arabidopsis thaliana*, a famous model plant. It is no good for agriculture, but its close relatives are popular crops. The guide RNA design is available for economically valuable plants of Brassicaceae: canola, turnip, mustard, cabbage and false flax. These plants are very stress-tolerant and, therefore, important for Russian agriculture.

In 2015, the SU Canola variety, created with the help of CRISPR and resistant to sulfonylurea herbicides, was commercialized for the first time. But CRISPR/Cas technology has not yet been applied on other listed species, so it is an important task of great scientific and practical concern. As for knock-in, there are no published data even for the model plant *A. thaliana*.

It has been shown that gene knockout using CRISPR/Cas can be performed in *Arabidopsis* in planta, by floral dip method. This type of agrobacterial transformation is well reproducible in many plants of Brassicaceae family, transformation success averaging from 2 to 10%. To the date, no one ever performed the knock-in using in planta method.

So, Brassicaceae plants are the most suitable objects for genome editing, with both scientific novelty and a great chance for practical application.

Dickeya bacteriophage PP35 alternatively infects non-pathogenic environmental hosts via tail spike interaction with identical bacterial O-antigens

^{1,2}Miroshnikov K.A., ¹Shneider M.M., ^{1,2}Kabanova A.P., ³Miroshnikov K.K., ⁴Zdorovenko E.L., ²Bugaeva E.N., ³Kulikov E.E., ³Korzhenkov A.A., ⁴Knirel Yu.A., ⁵Toschakov S.V., ²Ignatov A.N.

¹M.M. Shemyakin – Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
²“PhytoEngineering” Research Center, Ltd, Rogachevo, Moscow region, Russia

³S.N. Winogradsky Institute of Microbiology, Federal research center “Fundamental biotechnology”, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴N.D.Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁵I.Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

E-mail: kmi@ibch.ru, kmi@bk.ru

Dickeya solani, a recently emerged virulent agent causing black leg and soft rot of potato, is a major threat to world agriculture. Because of the limitations in antibiotic use alternative strategies of control are considered, including the use of bacteriophages.

Complete characterization of *D. solani*-specific phage PP35 proves it as an attractive candidates for this purpose. Similar Myoviridae phages belonging to the newly proposed genus Limestonevirus of bacteriophages were isolated in all locations of infection outbreaks caused by *D. solani*.

The host range of PP35 is determined by the function of the tail spike protein, PP35 gp156, and the sequences of corresponding genes are highly conserved among Limestonevirus genomes. The recombinant tail spike protein was shown to degrade the O-polysaccharide of *D. solani*. The polysaccharide structure, $\rightarrow 2$ - β -D-6-deoxy-D-altrose-(1 \rightarrow), is unique among soft-rot Pectobacteriaceae, however may be present in non-virulent environmental bacteria. Such alternative host, *Lelliottia* spp. F154, was isolated and characterized. Non-pathogenic bacteria may maintain the threshold population of the phage, and, thus, play an important role in the ecology of environmental microbiome. Also, such bacteria may serve as non-pathogenic host for industrial production of therapeutic phages.

The project is supported by Russian Science Foundation, Grant #16-16-00073.

The creation of new competitive microbial preparations of cotton plant based on local rhizobacteria strains that increase a resistance to stress conditions

Murodova S.

National University of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan

E-mail: ssmuradova@rambler.ru

The aim of the research work is creation of the new competitive microbial preparations on the basis of local strains of rhizobacteria increasing cotton plant resistance to stress conditions.

Scientific novelty of the research work is as follows: as a result of screening the strains which are stable at chloride-sulfate and sulfate salinization (up to 200 mM) were selected from the cotton rhizosphere; by means of study of morphological-cultural, physiological-biochemical properties and 16S rRNA analysis the local salt resistant strains of rhizobacteria *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium* are identified; it is revealed that local strains of rhizobacteria have large-molecular plasmid DNA with sizes for *P. stutzeri* SKB 308 - 55 kb; *B. subtilis* SKB 309 -13.3; 30 and 48.5 kb and *B. megaterium* SKB 310 - 23.1 kb; it is established that isolated strains *Pseudomonas stutzeri* SKB 308, *Bacillus subtilis* SKB 309 and *Bacillus megaterium* SKB 310 in stress conditions (pH-9) reveal high activity of indole-3-acetic acid (IAA) in the amount of 20.7 ± 1.01 ; 19.4 ± 0.79 ; 17.74 ± 0.85 $\mu\text{g/ml}$ respectively; it is revealed that strain *P. stutzeri* SKB 308 synthesizes the intermediate substance 1-bromine-2-phthalimidethane possessing high antagonistic activity; the synergetic mechanism of rhizobacteria-cotton mutualistic interactions is proved; the mechanisms of stability of the local rhizobacteria strains *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Pseudomonas stutzeri* to Cl⁻ and SO₄²⁻ ions and mechanisms of their antagonistic activity are revealed, the strains are deposited; the biological efficiency of preparation «Zamin-M» against main phytopathogens of cotton (*Fusarium* sp., *Xanthomonas compestris* pv. malvacearum, *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum, *Botrytis cineria* and *Verticillium dahliae*) is proved; the biotechnology of liquid and dry biopreparations production for plant growing with a complex effect is developed; for the first time an associative culture of compatible, salt-resistant, non-competing in conditions of joint storage and use, rhizobacteria strains *P. stutzeri* SKB 308, *B. subtilis* SKB-309 and *B. megaterium* SKB 310 is developed.

Novel mechanism of protein storage in plant seeds^{1,2}Nizhnikov A.A., ¹Belousova M.E., ^{1,2}Belousov M.V., ¹Shtark O.Y., ^{1,2}Kosolapova A.O., ^{1,2}Antonets K.S.¹All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia²St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*E-mail: ant.nizhnikov@gmail.com*

Amyloids represent protein fibrils with highly-ordered spatial structure called cross-beta. Such a structure makes amyloids one of the most stable biogenic particles resistant to various chemical and physical influences. Historically, amyloids were mainly perceived as the lethal pathogens causing dozens of incurable disorders in humans and animals but during last decade amyloids became clear to be not only pathogenic but essential functional quaternary protein structures implicated in a wide range of biological functions in prokaryotes and eukaryotes. Despite their social significance, plants remain the only large group of multicellular organisms where amyloids were not identified.

We performed a large-scale bioinformatics analysis of the distribution of potentially amyloidogenic regions in the proteomes of 75 species of the land plants which involved about 2.9 million of proteins. Using two bioinformatics tools, Waltz and SARP, we demonstrated that potentially amyloidogenic proteins are widespread in the proteomes of plants with their number corresponded to the number of amyloidogenic proteins in the proteomes of organisms in which amyloids were identified, like humans and different species of fungi. Amyloidogenic proteins tended to be associated with different biological processes and functions including transmembrane transport, defense against pathogens and protein storage in seeds. We performed in-depth analysis of the association between amyloidogenic properties and seed storage function of plant proteins. We found that seed storage proteins comprising conservative barrel domain Cupin-1, predominantly 7S and 11S globulins, are rich in amyloidogenic regions in the most of land plant species. So, 302 storage proteins with Cupin-1 domain belonging to 54 of 75 analyzed species contained amyloidogenic regions. For example, we identified 119 seed storage proteins with Zein domain, 121 proteins with Gliadin domain, 13 with Vicilin domain and 7 proteins with high molecular weight Glutenin. All of these domains were found to be amyloidogenic. Experimental analysis performed with several storage proteins or their regions confirmed their amyloid properties including formation of unbranched fibrils and binding amyloid-specific dyes.

Based on the data observed we propose that amyloid formation by seed storage proteins represent a novel molecular mechanism of the protein storage in seeds which is important for stabilization of proteins to prevent their degradation and misfolding during natural dehydration and unfavorable environmental conditions.

This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No 17-16-01100).

Expression of genes of *Fusarium oxysporum* fungus upon infection of flax cultivars with diverse resistance¹Novakovskiy R.O., ¹Krasnov G.S., ^{1,2}Rozhmina T.A., ^{1,3}Kezimana P., ¹Melnikova N.V., ¹Dmitriev A.A.¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia²All-Russian Research Institute for Flax, Torzhok, Russia³Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia*E-mail: Alex_245@mail.ru*

Fusarium oxysporum sp. lini leads to fusarium wilt that causes over 20% flax yield reduction, and epidemics of the disease can result in 100% yield loss. This is one of the most harmful flax (*Linum usitatissimum* L.) pathogens. Flax cultivars have diverse resistance to fusarium wilt. Earlier, we performed transcriptomic analysis of resistant and susceptible flax genotypes inoculated with *F. oxysporum* and revealed specific expression alterations for a number of flax genes in resistant genotypes compared to susceptible ones. In the present study, we addressed the question of whether there is any difference in expression of the fungus genes when the pathogen infects genotypes with diverse resistance.

Seedlings of resistant (Dakota and #3896) and susceptible (AP5 and TOST) to *F. oxysporum* flax cultivars were inoculated with *Fusarium oxysporum* sp. lini isolate #39 from the collection of the All-Russian Research Institute for Flax. For each cultivar, RNA was isolated from two pools of plant roots. TruSeq Stranded Total RNA Sample Prep Kit (Illumina, USA) was used for the preparation of 8 cDNA libraries. The libraries were further sequenced on NextSeq500 high-throughput sequencer (Illumina, USA) using 80-nucleotide pair-end reads. As a result, about 25 million pair-end reads were obtained for each cultivar. About 30-40% of the reads were mapped to genome and transcriptome of *F. oxysporum*. Then, the number of reads for each *F. oxysporum* transcript was assessed, and expression analysis was performed using the edgeR. The similarity of gene expression profiles was higher within groups of cultivars with similar resistance to the pathogen. *F. oxysporum* genes with the most significant differences in expression level upon inoculation of resistant and susceptible flax genotypes were identified.

The analysis of expression of genes of *F. oxysporum* fungus upon infection of flax cultivars with diverse resistance is important for understanding the plant-pathogen interactions. The data on *F. oxysporum* genes with distinct expression when pathogen infects resistant and susceptible cultivars bring new insights into mechanisms of fungal infection. This work was financially supported by the Russian President Grant MK-5828.2018.4.

Jasmonate- and salicylate-regulated plant responses during development of typical and latent infection caused by *Pectobacterium atrosepticum*

¹Parfirova O.I., ²Gorshkov V.Y., ²Gubaev R.F., ²Petrova O.E., ²Daminova A.G., ²Ageeva M.V., ³Nikolaichik E.A., ²Gogolev Y.V.

¹Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

²Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center "Kazan Scientific Center of RAS", Kazan, Russia

³Belarusian State University, Minsk, Belarus

E-mail: Olenka5296@mail.ru

Salicylic (SA) and jasmonic (JA) acids are key regulators of plant defense responses to pathogen invasion. However, there are examples indicating that the induction of the above systems leads to plant susceptibility. SA- and JA-induced pathways work in antagonism and only one of these pathways can be active. In turn, pathogens possess different degree of sensitivity to SA- and JA-induced responses and may activate the type of response preventing their development within the host to a lesser extent. For example, biotrophic pseudomonads produce phytotoxin coronatin which activates JA-dependent plant responses and represses the SA-dependent ones. Gene cluster that encode enzymes for biosynthesis of coronafacic acid (cfa) – structural component of coronatin was detected in necrotrophic *Pectobacterium atrosepticum* (Pba). Despite the fact that Pba is usually considered as brute force pathogen causing soft rots it may inhabit the host without any visible damage as biotrophic pathogen. Here we assume that different types of interaction could be related to alterations in JA/SA balance in the infected plants.

First, we evaluated the activity of JA- and SA-dependent hormonal systems during latent and typical infection in potato and tobacco plants by analyzing the expression levels of marker genes. We also estimated the effect of JA and SA pretreatment on plant resistance to *pectobacteria*. The expression of JA-marker genes was activated during the typical infection in tobacco and potato plants. During the latent infection the expression of JA-marker genes either did not differ from that of intact plants or was significantly lower than during the acute infection. Typical infection was not related to activation of the expression of the SA-regulated PR1 gene however during a latent infection the transcript content of this gene increased. Thus, the development of disease with typical symptoms is associated with activation of the JA-dependent system which does not restrict pathogenic organism in planta. In contrast the latent infection is related to the induction of the SA-dependent system and reduced propagation of the pathogen. To confirm different effects of the JA- and SA-dependent systems on the disease development exogenous pretreatment of plants with methyl jasmonate (MeJA) and SA was performed. SA pretreatment inhibited the development of disease symptom while MeJA pretreatment caused no significant effect.

Next, we determined the role of cfa during the interaction of plants with *pectobacteria*. The strategies of plant colonization by wild type Pba and cfa-deficient cfa mutant were compared. The wild type and cfa mutant bacteria were able to propagate within the host with the same efficiency i.e. form the bacterial emboli and colonize the primary xylem vessels. In contrast to the wild type the cfa mutant was unable to colonize the parenchyma and did not cause tissue maceration. To test whether coronafacic acid may activate JA-responses, we compared the expression of the level of the JA-marker gene (LOX) in infected plants. The expression level of LOX gene in plants infected with cfa mutant was higher compared to mock plants but much lower compared to plants infected with the wild type.

Thus, we have revealed that development of disease caused by Pba is related to the balance of JA- and SA-dependent responses. SA inhibits the propagation of *pectobacteria* and determines the development of asymptomatic interaction of pathogen with the host. The development of typical infection is related to the induction of JA-mediated responses which is determined by coronafacic acid production by Pba.

This study was supported by Russian Scientific Foundation #15-14-10022.

The conception of a multiplicity of adaptive strategies in phytopathogenic bacterium *Pectobacterium atrosepticum*¹Petrova O.E., ^{1,2}Gorshkov V.Y., ²Sergeeva J.P., ^{1,2}Daminova A.G., ¹Ageeva M.V., ^{1,2}Gogolev Y.V.¹Federal Research Center "Kazan Scientific Center of RAS", Kazan, Russia²Kazan Federal University, Kazan, Russia*E-mail: poe60@mail.ru*

Bacteria have high adaptive potential that provides their survival during various environmental challenges. For adaptation bacteria activate a physiological program of stress-response that makes them able to persist under adverse conditions. Modern views on the mechanisms of bacterial adaptation are based on the following postulates. The program of bacterial stress response begins with the induction of stringent response related to the negative regulation of the expression of genes associated with growth and cell division as well as the positive regulation of genes involved in the cell differentiation, resistance and persistence. At the same time, the program of cell death is activated in the remainder part of the bacterial population. The activation of stress response program occurs depends on bacterial systems of cell-to-cell communication and therefore it can be implemented in populations of high cell density only. A universal cascade of stress reactions leads to the formation of one type of a resistant cellular forms.

Considering the variety of stress factors in the environment, different physiological states of microorganisms and unequal cell densities in bacterial populations under stress, we have assumed the existence of a multiplicity of the bacterial adaptive programs. In our study we have revealed that phytopathogenic microorganism *Pectobacterium atrosepticum* (Pba) is able to use different adaptive strategies under starvation.

First, the Pba cells were subjected to carbon (or nitrogen) starvation at high (10^6 - 10^9 , above quorum level) and low (10^1 - 10^5 , below quorum level) population densities. Bacteria were able to adapt to starvation at low population density; herewith, the initial part of stress response was related to cell proliferation until the population density reached 1 million cells/ml – the value at which intercellular communication as well as stringent response was induced. Herewith, the cells acquired specific morphology different from that of the cells starved at high density. As a result of adaptation, cells that starved at both low and high density acquired cross-protected phenotype, e.g. became resistant to multiple stressors.

Second, the cells of Pba at different physiological states (actively growing exponential phase and stationary phase cells) were exposed to carbon starvation. In exponential phase cells under starvation, the nucleoids of cells became condensed, and their DNA was detected by qPCR less effectively than the one of the cells growing in nutrient-rich medium or stationary phase cells encountered starvation. Exponential phase cells subjected to starvation shown increased expression level of genes encoding DNA-binding histone-like proteins. In turn, cell wall deficient forms that were inefficient in their colony forming ability and, thus, had non-culturable phenotype, were formed in the starving cultures inoculated by stationary phase cells. Cell wall deficient forms displayed reduced expression level of genes of synthases of cell-wall components.

Third, when Pba was subjected to nitrogen starvation, no stringent response or nitrogen stress response controlled by global transcriptional regulator NtrC (GlnG) were induced in bacterial cells. Wherein the increase in the transcript level of gene encoding master regulator of nitrogen fixation NifA has been observed for the starving cultures. These results point to ppGpp- and NtrC-independent activation of stress response in Pba under the described above conditions.

Thus, phytopathogen *P. atrosepticum* is able to modulate its metabolism according to suitable adaptive programs. Herewith, the following events may occur in the bacterial populations: cell lysis or cell division, the activation of stringent response or not, the formation one or the other resistant cell phenotypes.

This study was supported by RSF (15-14-10022) and a grant MK-2191.2017.4.

Induction of shoot regeneration from different explant types of Agastache J. Clayton ex Gronov.

Polivanova O.B., Cherednichenko M. Yu.

Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

E-mail: polivanovaoks@gmail.com

Agastache is a genus of Lamiaceae encompassing more than 20 species of perennial aromatic and medicinal plants. Some of Agastache species are used as a source of spice, essential oils and herbal drugs. Agastache are rich of specialized metabolites such as phenylpropanoids and terpenoids. The first group contains phenolic acids, flavonoids and depsides. Terpenoids are volatile compounds contained in various plant organs - monoterpenes and sesquiterpenes. Tissue culture technique is a valuable tool for mass propagation and germplasm conservation of medicinal plants. Also plant *in vitro* culture is important for secondary metabolites production. Agastache rugosa hairy roots culture and suspension culture are used for the efficient production of rosmarinic acid. Plant *in vitro* cultures have been applied mainly to *A. rugosa* and only rarely to other species (*A. mexicana* and *A. foeniculum*). Other Agastache species are not sufficiently studied in *in vitro* culture. The aim of our research is to develop and to optimize an efficient and reliable protocol for direct regeneration of three Agastache species (*A. foeniculum*, *A. scrophulariifolia*, *A. urticifolia*) by comparing the shoot regeneration capacity of various explant types on nutrient media containing different plant growth regulators. Seeds were surface sterilized by soaking in 70% ethanol for 1 minute followed by 5% sodium hypochlorite solution for 15 minutes. Subsequently the seeds were rinsed three times with sterilized distilled water. The sterilized seeds were cultured on the Murashige and Skoog (MS) medium without any growth regulators. For obtaining *in vitro* explants, 30-days-old aseptic seedlings were used. Stem, leaf and node segments were the explants. Leaf-derived callus was also used for shoot regeneration. Optimal callus was developed from 30-days-old *in vitro* plants on MS medium supplemented with 0.5 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 0.1 mg/l kinetin. For regeneration studying explants were transferred onto MS medium supplemented with various cytokinins in different concentrations (kinetin – 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 mg/l; 6-benzylaminopurine – 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg/l; thidiazuron – 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) and the shoot differentiation efficiency of the explants were evaluated. MS medium lacking growth regulators served as control. For all studied Agastache species regeneration was possible only from nodal explants. The highest regeneration efficiency was achieved on MS media contained 0.1-1.0 mg/l kinetin and made up 52.5-76.0 % for *A. foeniculum*, 72.0-82.0 % for *A. urticifolia* and 60.0-81.8 % for *A. scrophulariifolia*. There was not significant difference between control for *A. urticifolia* and *A. scrophulariifolia*. But shoots regenerated from kinetin supplemented medium showed better elongation for all studied species. In other variations of media with cytokinins explants formed callus, teratomas, leaves and stems. Second set of experiments was carried out to test the response of growing shoots to auxins supplementing. Explants were transferred onto MS medium supplemented with 1-naphthalene acetic acid (NAA) or indole-3-acetic acid (IAA) (0.1 mg/l or 0.2 mg/l) in combination with kinetin (0.5 mg/l). MS medium lacking auxins was served as control. Auxins did not have significant effect on the regeneration efficiency for all studied species. MS medium supplemented with 0.2 mg/l NAA reduced the regeneration efficiency for all studied species. This *in vitro* propagation procedure should be suitable for conservation and large-scale commercial cultivation of Agastache species.

Evaluation of plant growth promoting fluorescent pseudomonads for abiotic stress tolerance

Prasad V.

Institute of Environment and Sustainable Development, Banaras Hindu University, Varanasi - 221005, Uttar Pradesh, India

E-mail: vp.iesd@bhu.ac.in

Plant growth promoting rhizobacteria are a vital component of soil ecosystem owing to their beneficial activities towards plants. Presence and abundance of these PGPR's within the vicinity of plants root helps in better growth, development and production of plant. Fluorescent pseudomonads are one such group of PGPR that play a major role in plant growth promotion, induced systemic resistance, biological control of pathogens and resistance against several types of abiotic stresses. *Pseudomonas fluorescens* are known to enhance and promote plant growth and reduce severity of various abiotic stresses. The present work was carried out with an objective to evaluate the plant growth promoting traits and abiotic stress tolerance potentials of fluorescent pseudomonads isolated from different locations. A total of 16 fluorescent pseudomonad isolates showing production of green fluorescent pigments on King's B agar media were tested in this work. All the 16 isolates tested were found positive for the production of the phytohormone indole-acetic acid. The amount of IAA produced ranged from 25 mg/L to 153 mg/L. All the 16 isolates were also found to exhibit phosphate solubilization potential under in-vitro conditions. Using insoluble tricalcium phosphate as sole source of phosphate the amount of phosphate solubilized ranged from 3.18 mg/L to 9.37 mg/L. These isolates were further evaluated for their tolerance capabilities against 3 different abiotic stressors viz. salinity, heavy metal and water limiting/desiccation stress. All the isolates were tested for growth against salinity on 4 levels of salinity amended media (250 mM, 500 mM, 750 mM and 1000 mM). All the isolates showed survival and growth upto the highest level of salinity tested. These isolates when tested for heavy metal tolerance (Cd and Pb) showed selective tolerance and only 8 out of 16 isolates exhibited tolerance against heavy metal stress. Both the heavy metals were tested at different concentrations by amending the growth media with their respective salts. In case of Cd applied as CdSO₄ 8 isolates exhibited growth at 150 µM; amongst these 8 only 4 isolates showed growth at 200 µM; while further from these 4 only 2 isolates survived at 250 µM CdSO₄. In case of Pb the 8 isolates which expressed tolerance showed survival and growth upto 1000 µM of PbCl₂ tested. Tolerance of the fluorescent pseudomonad isolates against desiccation was tested by culturing and growth evaluation in media amended with different concentrations of PEG 6000. All the 16 isolates exhibited growth at 10% of PEG. With increase in PEG concentration to 15% only 8 isolates showed growth and survival. With further increase in PEG concentration to 20% and 25% respectively these 8 isolates exhibited significant survival but with delayed growth. The results obtained in this study put forward that these fluorescent pseudomonad isolates tested hold promising potentials for their field application owing to their dual nature of plant growth promotion capabilities and a wide range of abiotic stress tolerance.

Relationships between accumulation heavy metals and roots exudation of organic acids in *Pisum sativum* L.

Puhalsky Y.V., Shaposhnikov A.I., Azarova T.S., Loskutov S.I., Belimov A.A.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, Saint-Petersburg, Russia

E-mail: puhalskyyan@gmail.com

Among the many pollutants, heavy metals are one of the most dangerous. An increase in their content in the environment and accumulation in the soil adversely affect the composition of the taxonomic groups of soil microbial sequences. In addition, soil contamination with toxic concentrations of heavy metals can cause changes in the composition of root exudates of plants, which are the main readily accessible sources of nutrition for microorganisms. The main classes of root exometabolites are sugars, amino acids and amides, fatty and organic acids (aliphatic carboxylic acids), as well as aromatic and phenolic acids. The quantity and quality of the root exudates depends on the age and health of the plant, the presence of other plants, the organo-mineral constituent of the soil type, fluctuations in the surrounding environment and, as is known, the species and even the plant variety.

Increase the synthesis of root exudates allows the binding of metals in the soil, with the formation of less toxic complex compounds by phytochelatins and organic acids. The organic acids have stronger affinity with heavy metals than that of amino acids.

The purpose of our work was to study the relationship between the accumulation of heavy metals and the change in the composition of root exudation of organic acids in pea (*Pisum sativum* L.) with mono- and polymetallic contamination. Because studying exudation from plant grown in unsterilized soil is challenging, most scientific research is conducted on hydroponic culture. Despite the artificial environment, far from real environmental conditions, hydroponic techniques may still be suitable for screening general plant root metabolic reactions to nutrient deficiencies or pollutant toxicities.

As the plant objects, we chose the laboratory line - SGE and obtained on its basis mutant - SGECdt, characterized by increased resistance to cadmium and cobalt. Plants were inserted into a floating platform and this floating platform was placed on the surface of the nutrient solution. Heavy metals were added to the solution in the form of solutions of salts: 2 μM CdCl_2 and/or 20 μM CoSO_4 . Anion of cadmium was not chosen by chance, since the salinity of chlorides is strongly associated with an increase in the absorption of cadmium by plants from the solution. Controls were vessels without the addition of metals. In each variant were put 4 replicates. The experiment was carried out in the phytotron within 14 days prior to the time of collection of exudates.

The single introduction of cadmium and cobalt inhibited the growth of roots and shoots to a greater extent in wild-type pea - SGE. With the combined addition of metals, an additive negative effect on plant growth SGECdt was not observed. The measurement of elemental analysis using an inductively coupled plasma emission spectrometer ICPE-9000 (Shimadzu, Japan) of dry straw plants showed, that the content of cadmium in mutant-genotype increased in the presence of a toxic concentration of cobalt. On the contrary, the content of cobalt in plants decreased with the introduction of cadmium into the solution. Hydroponic solutions containing exudates were analyzed by high performance liquid chromatography Acquity UPLC H-class (Waters, CIHA). The treatment with metals significantly changed the profile of root exudation of organic acids in both pea genotypes. It was shown that the mutant SGECdt releases significantly more exometabolites. Adsorption of cobalt in solution and reduction of its accumulation in plants with polymetallic contamination is most likely due to an increase in the yield of pyruvic acid in SGE and acetic and malic acids in SGECdt.

Thus, the SGE line and the cadmium-resistant mutant SGECdt is a unique genetic model to search for plants with an increased level of root exudation for use them in phytostabilization technologies on the interaction of plants with microorganisms. This work was supported by the Russian Science Foundation (14-16-00137).

Characteristics of rhizosphere microbial community associated with *Camellia sinensis* (L.) kuntze is grown in the humid subtropical zone of Russia

Rogozhina E.V.

Federal State Budgetary Scientific Institution "Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops", Sochi, Russia

E-mail: RogojinaEW@yandex.ru

Microorganisms associated with plants play an important role in their development, performing a wide range of adaptively significant functions: Study of the structure of the rhizosphere microbiocenosis of a tea plant (the ratio of the number of microorganisms of different groups), the properties of microorganisms participating in microbial-plant interaction (antibiotic, fungicidal activity, ability) are needed to understand the conditions of the existence of the tea plant ecosystem and is necessary in assessing adaptive sweat and the increase of stability by regulating the species composition of the microbiocenosis.

The investigations were carried out in 2014 in the zone of humid subtropics of the Black Sea coast of Russia (Uch-Dere settlement, Krasnodar Territory), on the production tea plantation of the variety Kolkhida (50-80 centners per hectare), 1983 planting. The soil is brown, acidic, on mudstones-deluvium of argillites; agrofion N240P70K90 kg / ha, pH of the salt. in the range 3.71 to a depth of 40 cm, 3.81 - in a layer of 60-80 cm; the humus content averaged 3.4%. In the fall period (October) soil samples were taken from the rhizosphere locus (1 mm directly adjacent to the roots) in the depth of propagation of the plant root system (up to 80 cm); a generic identification of the dominant forms of microorganisms of different groups was carried out. From the rhizosphere of the surface layer of soils (10-20 cm), bacterial isolates were isolated and their properties were studied. Fungicidal activity of isolated bacterial isolates was determined with respect to strains of phytopathogenic fungi of the genus *Fusarium* using the method of "wells" on potato dextrose agar, bactericidal activity on 4 strains of phytopathogenic bacteria using the "agar blocks" method on 2% potato agar. A qualitative reaction to indolyacetic acid (IAA) and its derivatives was carried out with the aid of the Salkovsky reagent. The number of microorganisms was taken into account in the reconstituted samples after storage in a freezer at a temperature of -180 °C by dilution and seeding the soil suspension onto elective media (bacteria-MPA, actinobacteria-Gouse-1 supplemented with penicillin (1 mg / l) and nystatin (50 mg / l), micromycetes - acidified Czapeka).

As a result of investigations, a fairly uniform distribution with depth in the rhizosphere region of saprotrophic bacteria was established (from 3.0 ± 1.0 in the 10-20 cm layer to 8.8 ± 3.0 in the 60-80 cm $\times 10^6$ colony forming units / gram of soil), with the predominance of gram-positive (spore) forms of bacteria (71-96%) over gram-negative (non-spore forming) (4-29%) and micromycetes (from 30.0 ± 9.0 in the 30-40 cm layer to $60, 0 \pm 5,0$ in the 10-20 cm $\times 10^3$ colony forming units / gram of soil). The higher abundance of actinobacteria (10 times) in the upper root zone of soils to a depth of 20 cm ($190.0 \pm 20.0 \times 10^3$ colony forming units / gram of soil) was noted in comparison with the deeper layers. The dominant groups in the tea rhizosphere were representatives of saprotrophic aerobic bacteria of the genus *Bacillus*; actinobacteria of the genus *Streptomicetes*; micromycetes genera *Penicillium* (78%) and *Aspergillus* (14%), to a lesser extent genera *Trichoderma*, *Fusarium*, *Mucor*, *Alternaria* 6 morphotypes of saprotrophic bacteria were isolated and described. Of these, 33 per cent had a fungicidal activity and 100 per cent – bactericidal activity, while 33 per cent had an ability to produce auxins (IAA).

Application of microbial preparations for rape cultivation in Belarus Republic

¹Safronava H.V., ¹Aleschenkova Z.M., ¹Ananyeva I.N., ¹Naumovich N.I., ¹Solovyova E.A., ²Pilyuk Ya.E.

¹Institute of Microbiology, NAS Belarus, Minsk, Belarus

²Research-Practical Center for Agriculture, NAS Belarus, Zhodino, Belarus

E-mail: hsafronava@mail.ru

Rape fields in Belarus occupy the total territory about 450 thousand hectares. The area sown by spring rape varieties constituted in 2017 83 thousand hectares, by winter cultivars – over 360 thousand hectares. Rape is a unique agricultural crop producing seeds containing up to 44% of vegetable oil, 18–22% of protein, 6–7% of crude fiber, 24–26% of nitrogen-free extractive substances. This cruciferous culture is widely used in the republic for technical, fodder and alimentary purposes. Rape is a valuable oleaginous crop. Rapeseed oil is properly balanced in the contents of major unsaturated fatty acids – linolenic (omega-3) – 11%, linoleic (omega-6) – 20% and oleic (omega-9) – 59%. Omega-6 acid is the constituent of most vegetable oils, whereas omega-3 is the food component deficient in human diet. Potential productivity of local rape cultivars and hybrids is high: 35–50 c/ha for spring varieties, 55–70 c/ha for winter crops. However, the real harvests reach only 30 to 50% of the expected values and average rapeseed yields at many farms vary from 11 to 16 c/ha. To maximize genetically determined characteristics of the culture it is essential to formulate grounded approach to tillage technology allowing to use efficiently the inherent gene stock of the plants and soil-climatic resources of the country. The performed analysis of available literature reports emphasizes bright prospects of microorganisms as the agents promoting rape productivity.

Researchers from Institute of Microbiology, NAS Belarus developed several biopreparations for plant cultivation – Gordebac, AgroMyc, Bactopin, distinguished by a complex phytobeneficial action: growth stimulation determined by IAA synthesis, nitrogen fixation, phosphate mobilization, antimicrobial activity. All biopreparations are based on nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing bacteria of genera *Enterobacter*, *Rahnella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* and arbuscular mycorrhizal fungi of genus *Glomus*.

Variety – dependent influence of microbial preparations Gordebac, AgroMyc, Bactopin on seed germination and seedling length of 12 cultivars and 2 hybrids of home-bred rape was investigated in a series of model experiments. The leading position in these parameters was held by spring rape cultures Hedemin, Duke, hybrid Ruby F1 and winter crops Imperial and Vitaut. Microbial treatment raised seed germination rate of spring cultivars and hybrids by 14.6%, length of seedlings – by 12.0% on the average in comparison with the control values assumed to be equal to 100%. Germination and seedling length parameters in winter rape cultures also increased under the impact of microbial treatment, with the average 14.5% rise over the control. Effect of pre-sowing seed treatment with biopreparations Gordebac, AgroMyc, Bactopin on productivity of winter rape was tested in field experiments. Favorable action of all studied biological products on productivity of oleaginous seeds was recorded to reach 72.0–77.1 c/ha. The increment in yield of winter rape seeds equivalent to 11.9 c/ha, or 18.2% up the control, was superior in experiments with Gordebac supply.

Summing up, application of microbial preparations possessing a set of valuable properties to promote rape cultivation is a sound alternative to other types of fertilizers. Introduction of microorganisms isolated from natural sources into agricultural practice is especially relevant non because shrinking share of mineral fertilizers is a vital prerequisite for production of eco-safe vegetable products.

Embryoidogenic ability of wheat and barley calli *in vitro* is determined by the balance of content of endogenous IAA and ABA

Seldimirova O.A., Galin I.R., Kruglova N.N., Veselov D.S.
Ufa Institute of biology UFRC RAS, Ufa, Russia
E-mail: o_seldimirova@mail.ru

The effectiveness of somatic embryogenesis (SE) in callus cultures *in vitro* largely determines the practical importance of plant biotechnologies. The role of selection of optimal concentrations of exogenous phytohormones in SE induction and in increase of the embryoidogenic ability of calli is well studied. At the same time, data on the involvement of endogenous phytohormones in these processes are very limited. The aim of the work is to study the content of endogenous phytohormones (free IAA, ABA and cytokinins) in calli and the effect of the ratio of their concentrations on the embryoidogenic ability of calli. The objects of investigation were embryo calli of wheat (cv. Bashkirskaya 26) and barley (cv. Steptoe and its ABA-deficient mutant AZ34). The concentration of phytohormones was determined by the ELISA method. It has been established that embryoidogenic calli of wheat and barley cv. Steptoe are characterized by a relatively high level of IAA and low levels of ABA and cytokinins. Thus, the relative ratio of the amount of ABA: IAA: cytokinins was 1:12:1 in wheat and 1:7:3 in barley. Wheat calli, obtained on medium with a high content of 2,4-D and incapable of SE induction, showed a 2-fold increase in the content of IAA and cytokinins with respect to ABA (the ratio of ABA: IAA: cytokinin was 1:24:2). Such a high content of IAA and cytokinins, possibly, significantly increases the proliferative activity of calli and thus makes callus cells impossible for differentiation. In addition, the obtained data support the opinion on the possibility of increasing the endogenous auxins concentration under the influence of exogenous synthetic auxins, and also confirm the fact that ABA participates in SE processes in callus cultures *in vitro*. Calli of the ABA-deficient mutant of barley AZ34, obtained under the same conditions as the embryoidogenic calli of the parental form and incapable of SE inducing, showed a significant increase in the content of IAA and cytokinins in relation to ABA (the ratio of ABA: IAA: cytokinin was 1:22:6). Such data can be explained by the antagonistic interactions of ABA and auxins/cytokinins: very low absolute values of the ABA content in AZ34 barley calli cells lead to a significant increase in the concentrations of IAA and cytokinins. The obtained data also confirm the participation of ABA in the SE processes in calli. Calli of AZ34 barley, obtained on medium with the addition of ABA, were able to regenerate plants, and the relative content of ABA: IAA: cytokinins was 1:2:1. It should be noted that the absolute values of cytokinin concentrations in all variants of the study were similar. On the basis of these data, it can be concluded that the ratio of the concentrations of IAA and ABA plays a decisive role in the ability of calli to SE induction. Thus, under the conditions of the performed experiments, the embryoidogenic ability of the calli of the studied cereals is determined by the balance of endogenous IAA and ABA. Obtained data make it possible to artificially increase the ability to SE induction and, in general, to plant regeneration in callus culture *in vitro* of cereals.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 17-04-01477.

Molecular genetic analysis of new invasive plant *Thladiantha dubia* Bunge (Cucurbitaceae)¹Shvets D.Yu., ²Probatova N.S., ^{1,3}Kuluev B.R.¹Bashkir State University, Ufa, Russia²Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity FEB RAS, Vladivostok, Russia³Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, Ufa, Russia*E-mail: shveisdasha99@yandex.ru*

Thladiantha dubia Bunge is a perennial herbaceous climbing liana from the Cucurbitaceae family, which in natural conditions occurs in the Russian Far East and beyond - in Northeast China and on Korea. Potential aggressiveness and high invasive potential are the distinctive features of this species. Such characteristics of the *T. dubia* are prerequisites for a more detailed study of the biological invasion of the plant and the possible exclusion of the *Thladiantha* from the range of cultivated plants in the Republic of Bashkortostan.

The purpose of the study is features of biological invasion of the *T. dubia* in the Republic of Bashkortostan with the involvement of molecular genetics methods.

T. dubia plants were searched and investigated on the territory of several administrative districts of the Republic of Bashkortostan in the summer of 2017. We found the plants of the *T. dubia* in the villages of Ukarlino (55°1'53"N, 56°29'3"E), Istrikovo (55°3'0"N, 56°29'21"E), Nimislyarovo (55°3'45"N, 56°34'2"E) and Bolshetenkashevo (55°0'15"N, 56°30'30"E) of Nurimanovsky district of the Republic of Bashkortostan (RB), 60 km north of the Ufa city. The leaves and tubers of the *T. dubia* were selected for analysis in the Ukarlino village due to the most abundant growth. Part of the tubers of the *T. dubia* were carefully washed, cut into small pieces and placed in Petri dishes with filter paper moistened with distilled water. Petri dishes were then placed in a climatic chamber with a temperature of 25°C and a light intensity of 5 klux. Another portion of the tuber is not washed and divided into pieces of different size with the skin or skinless. Then these small pieces of tubers were placed in vegetation vessels with a universal soil and covered with a film for the first 5 days to prevent loss of moisture. Vegetation vessels with slices of tubers were stored in a light room at a temperature of 27°C and a light intensity of 4 klux.

The leaves, tubers and fruits of *T. dubia* were collected under natural conditions of growth (Primorsky Krai, Nadezhdinsky district, neighborhood of the railway station Nadezhdinskaya, valley of the Schmidtovka river (131°98'53"N, 43°33'58"E)).

The dry leaves of the *T. dubia* were used to isolate total DNA by the CTAB method. The quality of the isolated total DNA was determined by electrophoresis in a 1% agarose gel. RAPD analysis was performed using universal primers LMBD, AFK1, AFK3, DAPD171, OPAI-04, OPAI-05, OPC-06, OPAB-08, OPAC-14, which were synthesized in Evrogen (Russia). 6 ISSR primers (IS1, IS3, DAC1, DAC2, HB12, HB14) were also used in the work.

As a result of our work, we detected the largest invasive populations of *T. dubia* in the territory of the Republic of Bashkortostan. By artificial reproduction of the *T. dubia* with small pieces of tubers in the laboratory, we showed a very high ability of this plant to vegetative reproduction. Comparative RAPD and ISSR analyzes of samples from the natural population of the *T. dubia* from the Primorsky Krai of the Russian Federation and its invasive population from the Republic of Bashkortostan were carried out. Between the native and invasive populations of the *T. dubia*, genetic differences were identified.

From our and published data it follows that the *T. dubia* should be referred to a weed species with a high invasive potential, and therefore all the necessary measures must be taken during its cultivation to exclude its spread in natural biocenoses and agroecosystems.

Structural studies of the lipopolysaccharides from *Azospirillum formosense* and *Azospirillum fermentarium*

¹Sigida E.N., ¹Fedonenko Yu.P., ²Shashkov A.S., ^{1,3}Konnova S.A., ³Potapova O.A., ²Knirel Yu.A., ¹Ignatov V.V.

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, Russia

²Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Moscow, Russia

³Chernyshevsky Saratov State University, Saratov, Russia

E-mail: sigida_e@ibppm.ru

Nowadays, the genus *Azospirillum* of free-living alphaproteobacteria from the family Rhodospirillaceae comprises 19 species. Many species of azospirilla have been isolated from cultivated soil in association with wild grasses and agricultural crops and demonstrate plant-growth-promoting activity. *Azospirillum* displays a versatile C- and N-metabolism, which together with high genomic plasticity, makes them well adapted to different, sometimes unusual environments. Several *Azospirillum* species have been isolated from non-plant-associated sources: oil-contaminated soil (*Azospirillum rugosum*), discarded road tar (*Azospirillum picis*), sulphide spring (*Azospirillum thiophilum*), fermented tank (*Azospirillum fermentarium*), and microbial fuel soil (*Azospirillum humicireducens*), but nitrogen fixation genes were identified in their genomes, therefore PGPR activity of these species is to be investigated.

Lipopolysaccharides (LPSs), predominant cell surface components of azospirilla, in addition to barrier function are involved in the early stages of colonization of the plant roots. Recently, it has been demonstrated that the LPS of *Azospirillum* induces deformations of root hairs, stimulates plant-growth-related biochemical responses, and specifically enhances the morphogenetic activity of wheat somatic tissues. Structural studies of lipopolysaccharides are essential for understanding their role in the formation of the associations with plants.

In the last years, the structures of the O-specific polysaccharide (OPS), the most variable domain of the LPS, were elucidated for about 40 strains of *A. brasilense*, *A. lipoferum* and *A. halopraeferense*. However, information about the OPS structures of the other azospirilla species remains obscure. This work aimed at structural analysis of the lipopolysaccharides from the type strains *Azospirillum formosense* and *Azospirillum fermentarium*.

A. formosense and *A. fermentarium* type strains IBPPM 579 and IBPPM 578, respectively, were obtained from the Collection of the Rhizosphere Microorganisms IBPPM RAS. The bacteria were cultivated at 30 °C in a liquid malate medium to late exponential phase, and cells were separated by centrifugation. Capsular polysaccharides were removed by repeated washing with 0.15 M NaCl, the cells were washed with acetone and dried on air. The biomass (10 g) was extracted by the Westphal procedure, proteins and nucleic acids were precipitated by TCA (pH 2.7) and removed by centrifugation. After dialysis of the supernatant, LPS preparations were obtained in yields ~6-8 %.

Fatty acid composition of the LPSs by GLC of FAME revealed the presence of characteristic for azospirilla fatty acids: 3OH-C-14:0, 3-OH-C-16:0, C:16:0, C:16:1 and C-18:1. O-deacylated LPSs contained predominately 3-OH-C-16:0, indicating this fatty acid to be N-linked.

SDS-PAGE analysis showed that LPS was of S-type, due to the presence of the bands in the upper part of the gel. The OPSs were obtained by mild acid degradation of the LPSs and separated from low-molecular fractions by gel-permeation chromatography on Sephadex G-50.

Monosaccharide analysis by GLC of the aldidol acetates revealed that the OPS of *A. formosense* contains Man, Man3OMe, Fuc and Xyl, whereas the OPS of *A. fermentarium* – Man and Fuc. The structures of the repeating units of the OPS were determined by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy, including ¹H-¹H COSY, ¹H-¹H TOCSY, ¹H-¹H ROESY, ¹H-¹³C HSQC, and ¹H-¹³C HMBC experiments. As a result, it was established that the OPS of *A. formosense* is presented by branched trisaccharide repeating units having 4-substituted L-Fuc and D-Xyl in the main chain and Man (Man3OMe) in the side chain. The degree of methylation of Man residues was about 60-65%. The OPS of *A. fermentarium* is linear and composed of tetrasaccharide repeating units, in which L-Fuc interchange with D-Man residues.

Generation of transgenic amaranth plants *Amaranthus cruentus* with the genetic engineering structure 35S::*ARGOS-LIKE*

¹Taipova R.M., ²Kuluev B.R.

¹Bashkir State University, Ufa, Russia

²Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: Taipova.Ragida@yandex.ru

Amaranthus cruentus (red amaranth) is one of promising crops for Russia. The high nutritional value due to the increased protein content balanced by amino acid composition, vitamins and mineral salts makes amaranth attractive in cooking and agriculture and there are also data on the use of amaranth and its products as a source of antioxidant and anti-inflammatory substances. The works of domestic breeders are aimed at obtaining new varieties of amaranth with improved growth characteristics and other economically valuable traits, however, modern methods of genetic engineering which involve the introduction of target genes into the genome can also be used to increase the productivity and yield of amaranth.

For example, overexpression of the *ARGOS-LIKE* gene (*ARL*) which encodes an ethylene signaling inhibitor increases the size of aerial organs of transgenic *A. thaliana* due to a positive effect on cell expansion. At the moment, one can find the description of only several works on agrobacterium-mediated transformation of amaranth in which embryogenic callus or epicotyl segments were used as explants.

However, for the species *A. cruentus* the method of agrobacterium-mediated transformation has not been applied yet. In this regard, there is a need to develop effective methods of transformation of this species of amaranth.

The purpose of our work is to develop a method of agrobacterium-mediated transformation of the cultural species of *A. cruentus*. For this purpose, the task was to develop a method for microclonal propagation and agrobacterial transformation of red amaranth in an *in vitro* culture with subsequent adaptation of rooted shoots to soil and open air conditions. The genetic engineering structure 35S::*ARL* containing the target *ARL* gene from *A. thaliana*, was used in the study. For experiments on agrobacterium-mediated transformation of amaranth plants epicotyl segments obtained from aseptic germinated seeds of *A. cruentus* were used.

The works carried out resulted in generating three transgenic amaranth plants bearing the genetic engineering structure 35S::*ARL*. The transgenicity of amaranth obtained during the study of plants was confirmed by PCR-analysis for the presence of marker and target genes. Two transgenic amaranth plants were acclimatized to soil and open air conditions.

Chloroplast DNA sequencing and analysis of three D-Genome cotton species

Talat F.

West Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Urmia, Iran

E-mail: f.talat@areeo.ac.ir

This is a fact that if there is one feature that distinguishes plant from animal life on our planet, it is not plants being primarily sessile, as a few animals share this trait, rather, it is the reliance of plants on solar energy to generate molecules with energy-rich bonds, the fuel that will be used by almost the entire biosphere (including plants themselves) to build other organized molecules and drive the rest of the processes that we know as life. Chloroplasts are the sites of this wonderful process. Cotton, as a world leading textile crop and a model system for studies of many biological processes, genomics research of cottons has advanced rapidly in the past few years. *Gossypium* contains five tetraploid (AD_1 to AD_5 , $2n = 4X$) and 47 diploid species (designated A through G, plus K, $2n = 2X$), but the origin and evolution of allotetraploid *Gossypium* has remained controversial.

Complete chloroplast genome sequences belong to three diploid species were determined and annotated. Bioinformatics analyses showed that, the chloroplast genomes of *Gossypium* were highly conserved. Three chloroplast genomes were typical circular chromosomes like those of most other higher plants, including the large single copy (LSC), the small single copy (SSC) and two IR regions. The whole genome size ranged between 159,945 bp (*G. laxum*; D_9), 159,973 bp (*G. turneri*; D_{10}) and 160,122 bp (*G. shwendimanii*; D_{11}). The assignment of the potential genes identified 140 genes for each genome, including 113 functional gene (79 of protein coding genes, 30 tRNA and 4 rRNA), 2 ORFs, 4 pseudogenes and 21 repeated genes. Four genes viz. *infA*, *ycf68*, *ORF42* and *ORF56*, in addition to earlier mentioned genes, were been confirmed to be existed in studied genomes. SSRs totally varied from 62 to 64, and the average rate was 0.36 SSRs/kb between the three genomes. This study revealed that wide ranges of expansions and contractions of IR are very common evolutionary events among 14 *Gossypium* species, which compared in our research. The phylogenetic analyses based on 50 protein-coding genes for 41 angiosperms and four gymnosperm out groups (*Cycas*, *Ginkgo*, *Pinus* and *Gnetum*) performed. Our phylogeny tree continued strongly support that *Theobroma cacao* as the closest species to *Gossypium* inside eudicots.

Yield and yield components in Cotton (*G. hirsutum* L.) cultivars from multivariate statistical analyses point of view¹Talat F., ²Anarjan M.B.¹West Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Urmia, Iran.*E-mail: f.talat@areeo.ac.ir*²Department of Plant Breeding and Plant Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran*E-mail: Mehdi_esz@yahoo.com*

Cotton is the first and the main fibrous plant that plays an important role in the creation of careers for individuals and development of textile industries in all over the world. Selection of a suitable cultivar for the West Azerbaijan region is important since West Azerbaijan is the origin of cotton in Iran. This research conducted in order to evaluate of quantitative and qualitative traits of hopeful cotton cultivars under cold weather conditions in Urmia region. In this study eight cultivars evaluated with Varamin and Sahel as check cultivars in form of randomized complete block design (RCBD) with four replications in 2014 and 2015 (two cropping seasons) at Saatluo station of West Azerbaijan Agricultural and natural resources research and education center. Results showed that K8802 cultivar is earlier cultivar, one of the best cultivars according to traits such as the number of bolls per plant, sympodia per plant, total yield, seed cotton yield (yield of per plant) and qualitative traits. According to combination analysis results, the interaction effect between treatment and year (treatment*year) for seed cotton yield, yield and the number of bolls per plant at probability level ($\alpha=0.01$) were significant. In analysis of stepwise multiple liner regression, three variables, the number of bolls per plant, boll weight and plant height entered in the model. Path analysis showed that direct effect of the number of bolls per plant with yield, indirect effect of the number of bolls per plant and boll weight with yield are the most in among all effects, as well as principal components analysis for two main components with the high value for variables showed that there is the number of bolls per plant in both components and this trait is one of the main traits in cotton and relevant studies to cotton, therefor the cotton breeders must work on the number of bolls per plant trait. Due to the results of this study in two years, K8802 cultivar for cultivation in Urmia weather conditions suggested.

Synonymous codon usage bias in chloroplast genome of *Vitis vinifera* and two *caucasica* subspecies of grape fruit¹Talat F., ²Shahdparvar S., ²Karapetian J.¹West Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Urmia, Iran²Saba Institute of Education, Urmia, Iran*E-mail: f.talat@areeo.ac.ir*

Chloroplast research have significant advantage of genomics and genome sequencing, and a new picture is emerging of how the chloroplast functions and communicates with other cellular compartments. Grape (*Vitis vinifera*) is a genus of trees in the family Vitaceae. *Vitis vinifera* species belongs to Eurasian grapes. The chloroplast genome is the most comprehensive genome in plants and has many features for evolution analyses due to the unique molecular structure and single-parent inheritance. Sequence and gene annotation was mainly performed by DOGMA. Map of chloroplast genome structure and gene distribution was carried out using OGDRAW V1.1. Relative synonymous codon usage (RSCU) of different codons in each gene sample was calculated by codonW in Mobylye. An online version of REPuter was used to specify the repeat sequence and location. this research was targeted to study and compare the complete chloroplast genome sequences of *Saperavi* and *Meskhuri mtsvane* from *caucasica* subspecies with common grape (*Vitis vinifera*) and as well genome structure analysis, gene content, organization and repetitive sequences, codon usage and comparison among genomes. The chloroplast (cp) genome of *Vitis vinifera* is a circular DNA molecule of 160928 base pair (bp) which is longer than chloroplast genome of *Saperavi* and *Meskhuri Mtsvane* cultivars. Large and small unique regions are separated by two inverted repeat regions a, b. In all of three genomes, whole genome contains 131 genes which include 79 protein coding genes, 4 rRNA genes and 30 tRNA genes. In other words, there are totally 113 single-copy genes and 18 double-copy genes located in inverted repeat region (IR) in the three studied genomes. The SSRs of the chloroplast genomes were identified and the results indicated that the chloroplast genomes of *Vitis vinifera* and *Saperavi* both have 74 and *Meskhuri mtsvane* has 73 SSRs. The cpSSRs are important and useful for genetic diversity studies. Low GC content is a significant feature of plastid genomes, which is possibly formed after endosymbiosis by DNA replication and repair.

The role of streptomycetes in the relationships of plant and rhizobiota

Tarchevsky I.A., Egorova A.M.

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

E-mail: egorova@kibb.knc.ru

In recent years, the study of the complex problem of the relationships between plants and the population of rhizosphere attracts much attention. Studying the contribution of synthesis and degradation to an increase in protein content in plants under the action of salicylic acid - one of the key factors of phytoimmunity we obtained data concerning this problem. Cycloheximide - an inhibitor of protein synthesis by cytoplasmic 80S ribosomes was used to solve this problem. It was found that in pea roots, cycloheximide inhibited the synthesis of salicylate-inducible proteins absent in the control. The content of a number of salicylate-independent proteins, mainly involved in protein metabolism also decreased. Surprisingly, the content of more than 30 proteins mainly enzymes, catalyzing the synthesis of antipathogenic phenolic and terpenoid compounds increased under the action cycloheximide. It was concluded that pea roots perceive cycloheximide as a signal of the pathogens attack. None of the phytoimmunity inducers studied by us caused an increase in the synthesis of such a unique large number of "phenolic" enzymes. It should be borne in mind that streptomycete *Streptomyces griseus* is the producer of cycloheximide. Among more than 500 species of streptomycetes inhabiting the soil, there are saprophytes, phytosymbionts and phytopathogens. A distinctive feature of streptomycetes is the formation of antibiotics, intended to suppress the competitors in the rhizosphere mainly phytopathogenic fungi. We have found that cycloheximide causes not only the induction of enzymes of phenylpropanoid metabolism, but also increases the content and appearance of new types of soluble phenolic compounds. Confocal microscopy revealed that they accumulated in pea roots cortex, while polymeric lignin - in xylem cells. Cycloheximide behaving in the root cells as a two-faced Janus - stimulated the synthesis of proteins in endoderm and xylem cells, but inhibited - in parenchyma cells. It is believed that the activation of phenolic metabolism occurs not only due to an increase in the content of "phenolic" enzymes, but is defined by the formation of heteroenzyme complexes – metabolons. It is known that exudation of phenolic compounds from the roots to the rhizosphere can occur. It causes the change in the structure of the rhizosphere community to a much greater extent than that by other compounds released by the roots. The complexity of the relationship between streptomycetes and the microbial population of the rhizosphere can be judged by the following example. Streptomycetes can inhibit the development of soil fungi by two ways: directly - with the help of chitinases, endoglucanases and antibiotics; and indirectly - with help of phenolic compounds of plants, induced in our case by cycloheximide.

Photomorphogenesis of embryogenic wheat calluses in edaphic stresses conditions

¹Terletskaya N.V., ²Stupko V.Yu., ²Zobova N.V., ¹Iskakova A.B.

¹Institute of Plant Biology and Biotechnology of Science Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan

²Federal State Institution of Science "Krasnoyarsk Research Institute of Agriculture", Krasnoyarsk, Russia
E-mail: teni02@mail.ru

We studied the photomorphogenesis of calluses of various wheat species obtained from immature and mature embryos and cultivated both under optimal conditions and under conditions of edaphic stresses (salinity – NaCl, 0.63% and drought - polyethylene glycol, 16% w/v). PA of calluses was recorded at the day of their passaging to the stress proliferation medium and then on third, seventh and fifteenth day of cultivation. The data recorded at PPFD of 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ were involved into analysis of Y(II), Y(NO) and Y(NPQ) parameters. When visualizing the maximum quantum yield of photosynthesis of photosynthetic system II (PSII) calluses obtained from immature embryos, the active formation of chlorophyll-containing areas (CCA) was noted on the optimal background. The two-peak shape of callus PA dynamic curves of these two species was similar to those described in other work conducted with spring wheat, as shown Stupko and Zobova earlier. Probably the second peak is associated with increase of PA of existing CCA. In the process of photomorphogenesis, species-specific differences were revealed. The maximum frequency of callusogenesis was observed in hexaploid forms, the minimum frequency in diploid species of *T. monococcum*. The calluses of tetraploid species of *T. dicoccum*, *T. polonicum*, *T. aethiopicum*, and hexaploid *T. aestivum* in control conditions were significantly superior to other species in the growth of raw biomass. The process of histogenesis was accompanied by the mass formation of trachea-like structures, which are ringed or spiral formations that grow green in the light. Chloroplasts in zones of somatic embryogenesis were similar to chloroplasts of leaf mesophyll cells. But in contrast to intact plants, in which chloroplasts cells are usually located near the wall in the calluses the arrangement of chloroplasts was predominantly chaotic. The stressful action led to the processes of degeneration of the photomorphogenic tissues and the destruction of CCA and trachea-like structures, primarily in the calluses of less stable species. The most active processes of photomorphogenesis under stress conditions are found in calluses which have a relatively small increase in the biomass of cell colonies. This is confirmed by reveals the negative correlations between Y(II) and Y(NO) and callus weight ($r = -0.5^*$, $r = -0.7^{**}$) and between the same parameters of quantum yield and relative callus weight growth (stress / control %) ($r = -0.9^{***}$ и $r = -1^{***}$) under drought conditions. The salt stressed calluses often characterized by high weight due to high level of risogenesis. Relations between Y(II) and Y(NO) and relative callus weight growth (stress / control %) are described by coefficients of $r = 0.6^*$ и $r = 0.9^{***}$ respectively.

A large percentage of regenerating plants under drought conditions *in vitro* was noted in species *T. dicoccum* (67%) and *T. aestivum* (50%), under salt stress conditions – in species *T. compactum* (80%), *T. polonicum* (65%), *T. dicoccum* (50%), *T. macha* (50%), *T. aestivum* (50%).

For the purpose of optimization of photosynthetic callus culture development, the attempt of PA analysis of callus culture, developed from mature embryos. Data on PA of calluses, developed from mature embryos, had wide scatter. The dynamic of PA of other species refers their culture to old ones. The effectiveness of their photosynthetic reaction decrease with time on all media including optimal background. Also Y(NO) of these calluses increased in that course. So we couldn't distinguish the influence of stress on the culture. Such data recorded on optimal media can be the evidence of no CCA active grows. Therefore, for the purpose of photosynthetic active callus culture of described wheat species production the immature embryos are more suitable than mature ones.

Effective transformation of conidia of entomopathogenic fungi *Lecanicillium* spp. and evaluation of the properties of fluorescently labeled isolates

¹Timofeev S.A., ¹Mitina G.V., ¹Tsarev A.A., ¹Senderskiy I.V., ²Rogozhin E.A., ¹Dolgikh V.V.

¹All-Russian Institute for Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, Russia.

²Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.

E-mail: ts-bio@ya.ru

Lecanicillium species (former complex species *Verticillium lecanii* Zimm.Viegas) are a group of fungi which may exhibit pathogenic properties both to insects and to other fungi. Some species of *Lecanicillium* genus has been developed as biocontrol agents for control of soaking pests. To enhance fungal efficacy against pests by transferring endogenous or exogenous pathogenic genes, the various transformation systems have been developed for a large number of filamentous fungi, but the systems of transformation for *Lecanicillium* spp. are still not numerous. Here we have adopted a simply method of germinated conidia electroporation, which was previously developed for other entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, and demonstrated efficiency of this technique for *Lecanicillium muscarium*.

Electroporation of *L. muscarium* VI72 strain by pBARGPE1 vector harboring eGFP gene followed by selection of phosphinothricin-resistant transgenic conidia demonstrated relatively high level of expression of fluorescent protein, comparable to that observed in *B. bassiana* strain Bb13 transformed with the same plasmid, without any influence on its growth and virulence. Analysis of GFP-expressing isolates by fluorescent microscopy and immunoblotting showed that *Aspergillus nidulans* PgpDA promoter and trpC terminator in pBARGPE1 vector provide effective synthesis of heterologous proteins in *L. muscarium* cells comparable to that observed in *B. bassiana*. During GFP accumulation, we did not detect any influence of the foreign protein on growth rate, conidia production and virulence of *L. muscarium*. This result allows to plan new experiments to study the relationship between insects and entomopathogenic fungi using their fluorescently labeled isolates. We acknowledge financial support from the Russian Foundation of Basic Research (RFBR grant 17-34-50141 mol_nr).

Effect of *Azospirillum* bacteria on growth and productivity of potato under aeroponic conditions¹Tkachenko O.V., ¹Terenteva E.V., ²Evseeva N.V., ²Burygin G.L.¹Vavilov Saratov State Agrarian University, Saratov, Russia²Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, RussiaE-mail: oktkachenko@yandex.ru

Obtaining minitubers from mericlones is an important stage in the healthy and disease-free seed potato production. Increasing the efficiency of this stage is achieved through the use of innovative technologies, including aeroponic cultivation of plants. Using this approach, it has become possible to regulate as the chemical composition of the nutrient solution, as and the controlled bacterization of sterile plants.

The purpose of this work was to study the effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 bacteria on the morphometric parameters of the plant growth and the minituber production of potato in an aeroponic system.

Potato microplants of Nevsky and Kondor cultivars were planted into the aeroponic system. After 3 weeks, a bacterial suspension of *Azospirillum brasilense* Sp245 was introduced on the nutrient solution, so that the concentration of bacteria in the solution 108 cells / ml. Control was provided to plants that grown without bacterial inoculation. Results of enzyme-linked immunosorbent assay for bacterial detection showed that during 3 days the number of bacterial cells is preserved in solution, but by 7 days – it decreases more than 2 times, and after 7 days it drops up to practically undetectable level. At the same time, morphometric analysis of plants in 3 weeks (the active growth phase of shoots) and 6 weeks later (in the beginning of tuber laying on reaching the maximum vegetative mass) showed that inoculation of plant roots with *Azospirillum brasilense* Sp245 had a significant effect on the growth of shoots. According to the shoot height, the superiority of experimental plants was observed by 15.5% on average in two cultivars. The analysis of the productivity of plants also established the advantage of experimental plants over the control (by the number of tubers by almost 1.5-fold, by weight of tubers from one plant by 1.3-fold, and by a total yield of tubers from 1 m² by 28%).

The size of the starch granules and the starch content of mini tubers can serve as an important indicator, on the one hand, of the efficiency of photosynthesis in the process of producing mini tubers, and, on the other hand, the quality of the obtained seed material. The maximum size of starch granules was noted in experimental plants of the Kondor cultivar, and minimal in the control plants of the Nevsky cultivar. In general, starch granules were larger in experimental plants by 12%. The starch content of the mini tubers depended on both the cultivar and the way they were obtained. Bacterization of plants significantly increased the starch content in tubers of both cultivars by 1.5-fold.

Thus, as a results of the studies, it has been found that the inoculation of potato microplants by *Azospirillum brasilense* Sp245 bacteria under aeroponic conditions promoted the growth of shoot biomass and potato productivity, and also positively influences the process of starch precipitation in tuber. The obtained data can be used to improve the agrobiotechnology of healthy potato planting stock production.

Deciphering rhizospheric soil of chromium mine for chromium tolerant plant growth promoting bacteria

Tripti, Kumar A., Maleva M.G., Kiseleva I.S.

Department of Experimental Biology and Biotechnology, Institute of Natural Sciences, and Mathematics, Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia
E-mail: adarsh.biorem@gmail.com

Industrialization has led to an increase in toxic contaminants (heavy metals, pesticides and chemical fertilizers) and hence its subsequent release into the environment. Heavy metal (loids) are non-biodegradable contaminant, remain persistent for a long period of time in soil and exert serious effect on its living biota. Chromium (Cr) is one of the most toxic elements when present in higher concentration, causes significantly harmful effects on fertility of surrounding soil, vegetation status, rhizospheric and endophytic microbial communities, as well as several health risk issues such as cancer. Plant growth promoting microbes play a vital role in reduction of toxic metals from soil by associating either in the rhizosphere or/and phyllosphere of the plant hence improved metal uptake and plant growth. Therefore, it is important to understand and decipher the beneficial microbial community of heavy metal stressed soils to get rid of this problem.

Present study investigates the presence of beneficial bacterial population in the rhizospheric regions of plants growing in vicinity of Cr mine, near the town Verkhnyaya Pyshma, Russia. Brushed out rhizospheric soil from the roots of Red clover (*Trifolium pratense*) and White sweet clover (*Mililotus albus*) was collected in triplicates. Cr resistant bacterial strains were isolated by serial dilution technique by spreading over Luria Bertani (LB) agar medium amended with 100 mg Cr Kg⁻¹, and growth were observed after 24 h of incubation at 28 ± 2°C. Colonies showing different morphological features were selected and further purified by streak plate method and pure cultures were kept at 4°C for further experiments.

Cr sensitivity of the isolates at different concentrations (200, 400, 600, 800 and 1000 mg kg⁻¹) was analyzed by minimum inhibitory concentration test. The isolates were further identified and screened for plant growth promoting activities i.e. tri-calcium phosphate solubilization (PS) by vanadomolybdate method at 420 nm and indole-3-acetic acid (IAA) using L-tryptophan (200 mg L⁻¹) as a precursor at 530 nm in microtiter plate in presence of 0, 100 and 200 mg Kg⁻¹ of Cr with varying time interval (24 h and 120 h).

A total of 5×10³ and 3×10³ colony forming units per gram of rhizospheric soil were found, out of which 12 and 11 morphologically different isolates were selected from Red clover and White sweet-clover, respectively. A total of 6 and 4 isolates showed a maximum tolerance of 1000 mg Cr kg⁻¹ on LB agar plates were selected for quantitative analysis of IAA and PS in the presence of varying Cr concentrations (0, 100 and 200 mg Kg⁻¹). With increase in time (24 to 120 h), PS has increased significantly whereas, IAA was reduced for most of the studied isolates at all the three Cr concentrations. At 120 h, significantly high phosphate solubilization (52 and 56 mg L⁻¹) and IAA production (15 and 3 mg L⁻¹) was observed at 100 mg Cr Kg⁻¹ (for strains 25b and 26b, respectively). The strains 25b and 26b were identified as *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. using Bergey's manual, respectively. The results showed that both the plants pose significant high Cr tolerant rhizobacteria which are capable to show high plant growth promoting (IAA and PS) attributes must needed for improving the nutrient content of soil and thus luxuriant plant growth. Cr tolerant plant based experiments are required to further check the efficiency of these isolates in clean-up of Cr contaminated soils.

The work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (agreement No 02.A03.21.0006).

Orchid seed germination in co-cultures with diverse orchid-associated and plant growth-promoting bacteria

Tsavkelova E.A., Leontieva M.R., Egorova M.A.
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
E-mail: tsavkelova@mail.ru

Orchidaceae Juss. is one of the largest and intriguing plant families. Many wild orchid populations are vulnerable and threatened, but the conservation of orchids is a challenging process due to their biotic relations and the tiniest by size (0.05–6 mm) or weight (0.31–24 µg) seeds. Orchids form strong mycorrhizal associations, but their interactions with bacteria are still poorly understood. In order to select the plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for orchid seed germination and to determine if there is any species-specific relations between the host-plant and orchid-associated bacteria (OAB), we studied two species, *Dendrobium moschatum* and *D. nobile*.

Among the isolated and identified OAB, colonizing the substrate and aerial roots of *D. moschatum*, several active producers of auxin (indole-3-acetic acid, IAA), were selected. To study the bacterial plant growth-promoting capacity, and to demonstrate the possibility of the application of OAB isolated from one orchid (*D. moschatum*) to promote germination of another one (*D. nobile*), we tested *Mycobacterium*, *Rhizobium* and *Bacillus*, isolated previously, and newly isolated *Azospirillum*, *Streptomyces*, *Sphingomonas* and *Agrococcus* strains by using Murashige and Skoog (MS) medium with no addition of any exogenous plant growth stimulators, but supplemented with L-tryptophan (Trp) for favoring bacterial IAA production.

Surprisingly, *Rhizobium*, *Azospirillum* and *Streptomyces* provoked obvious negative effect on the seed germination; *Streptomyces* suppressed it, and the abundant extracellular mucus, produced by *Azospirillum* and *Rhizobium* on the carbohydrate-rich MS medium, completely covered and drowned the seeds. The prominent positive influence was observed with *Sphingomonas*, *Agrococcus*, *Mycobacterium* and *Bacillus* cultures. The seed bacterization of *D. nobile* with OAB isolated from another host-orchid revealed that the tested orchids did not express any specificity in relations with favorable bacteria. Isolated from *D. moschatum*, they successfully promoted seed germination of *D. nobile*. However, the minute size of orchid seeds as well as the necessity of using carbohydrate-rich media, appear to narrow the application of the PGPR, particularly those producing abundant extracellular polysaccharides.

We showed that OAB actively colonized the rhizoids of the germinating seeds, followed by populating the roots of the plantlets. The extracellular matrix helps the bacterial cells to stick on the plant surface and to form microcolonies. The endophytic localization of *Sphingomonas* and *Agrococcus* was also confirmed by SEM and TEM. By using gfp-tagged *Pseudomonas fluorescens* and *Klebsiella oxytoca*, we studied the strategies of bacterial colonization on the roots, seeds and seedlings of *D. nobile*. These endophytic PGPR, initially isolated from the crop plants, also rapidly colonized velamen and core parenchyma of the roots of the adult plant. However, at the early stages of seed development, they stayed restricted to the surface and the outer layers of the protocorms. Bacterization of *D. nobile* seeds resulted in the significant promotion of their *in vitro* germination. The plants showed no species-specificity to the tested strains.

We provide new evidence regarding the orchid-bacterial interactions. The inoculation of *D. moschatum* and *D. nobile* seeds with diverse selected IAA-producing bacteria significantly promoted *in vitro* orchid seed germination (number of the germinated seeds, the length of the plantlets) thus, highlighting the successful application of OAB and PGPR strains in biotechnology and conservation of the endangered and cultivated orchids.

The orchid-associated bacterial communities of *Dendrobium moschatum* (Buch.-Ham.) Sw. rhizoplane and phylloplane

Tsavkelova E.A., Volynchikova E.A., Krinitsina A.S., Konorov E.A., Egorova M.A.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

E-mail: tsavkelova@mail.ru

Orchidaceae comprises over 27000 species and thousands of hybrids, and constitutes one of the most diverse families, where most of species possess medicinal and ornamental properties. The orchids are among the most evolutionarily and ecologically significant plants, colonizing almost every habitat on earth, although epiphytes are most widespread and impressive. They are essential for the ecosystems, though currently considered more vulnerable to climate change and anthropogenic disturbance. They are extreme specialized in their strong biotic interactions, pollination strategy and symbiotic seed germination, which makes the orchid propagation and conservation quite challenging both in natural and artificial environments. Orchids form mycorrhizae, but no less important in the host-plant successful growth and adaptation might be performed by orchid-associated bacteria, both epiphytic and endophytic. Our previous studies were the first to describe the localization, diversity and the functional role of phototrophic and heterotrophic orchid-associated bacteria, colonizing wild-grown and greenhouse orchids.

Velamen (a structure, typical only for orchid aerial roots) is a comfortable econiche for bacteria and diazotrophic cyanobacteria (*Anabaena*, *Nostoc*, *Scytonema*, *Calothrix*). Among cultivable heterotrophic bacteria isolated from diverse orchids (*Calanthe*, *Dendrobium*, *Acampe*, *Pholidota*, *Paphiopedilum*), the most typical were *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Caulobacter*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas*. Within one tested orchid (*D. moschatum*), the bacterial diversity varied: the substrate roots (SR) were colonized by *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Caulobacter*, *Enterobacter*, *Jeongeupia*, *Mitsuaria*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pedobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Streptomyces*, *Variovorax*, *Xenophilus*, whereas the strains of *Aeromicrobium*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Caulobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Roseomonas*, *Sphingomonas* and *Xanthomonas* were isolated from the aerial roots (AR). Among the endophytes, *Caulobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* and *Rhizobium* were isolated from SR, and *Agrococcus*, *Brevundimonas*, *Caulobacter*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* and *Sphingomonas* – from AR.

For better understanding of the bacterial community structure in the rhizoplane of *D. moschatum*, culture-independent techniques were carried out. Among the dominating endophytic bacterial populations, DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) analysis revealed the presence of *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Herbaspirillum*, *Methylibium*, *Methylobacterium*, *Phaeospirillum*, and *Ralstonia*, as well as not identified earlier *Erythrobacter*, *Dokdonella*, *Telluria* and *Dyella* species. Methagenomic analysis by Illumina high-throughput sequencing showed the prevalence of *Microbacterium*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Chryseobacterium*, *Paenibacillus* and *Aeromonas* in the AR rhizoplane, and the dominance of the *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Rhizobium*, *Phaeospirillum*, *Flavobacterium*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Paenibacillus*, and *Acinetobacter* strains in the SR rhizoplane. Our results also indicate an active microbial colonization of the *Dendrobium* leaves with the bacterial diversity similar to that of its aerial roots, including a number of species of *Microbacterium*, *Sphingomonas* and *Paenibacillus*.

The bacterial communities vary within one tested plant, depending on the econiche and localization (epiphytic vs endophytic bacteria). Among the identified bacteria, PGPR strains have been isolated. The better understanding of the bacterial diversity and their role provides new features in orchid biotechnology, both for the *in vitro* seed germination approaches, and for the formation of the orchid-bacterial consortium that enables a better adaptation of the plants during replanting and reintroduction in nature.

Biopolymeric composites of fungal origin against bacterial phytopathogens¹Tsivileva O.M., ²Perfileva A.I., ¹Kofterin O.V.¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia²Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia*E-mail: tsivileva@ibppm.ru*

Contemporary biotechnological applications of Se are undoubtedly broad. Elemental selenium and chemically synthesized Se-conjugates are known to possess antimicrobial properties. However, more ecologically safe and beneficial approaches to manufacture the Se-based antibacterial agents are current challenge. In this relation, of especial interest are the selenium-enriched preparations of higher-fungal origin owing to their availability, biocompatibility, and proved biological activity.

The novel aspects concerned with the essential nutrient and antioxidant Se properties discovered in the 2nd half of XX century and more recently, have changed the views on selenocompounds. Different chemical forms of selenium possess excellent biochemical properties and have been implicated for use in biotechnology.

Wood-decaying higher fungi attract attention as the possible participants of the plant wastes biodestruction processes, as well as the producers of unique complex of biologically active substances. The approach developed in our works recently would allow the bioproduction of submicrostructured elemental selenium-based composites using the edible mushrooms cultures to be put into practice.

We demonstrated the occurrence of bacteriostatic and bactericidal effects of the agents under study, and the results favor the supposition on advisability of further research into the selenium bionanocomposites as the agents for agricultural recovery from the bacterial pathogens.

The importance and possibilities for increasing the Se pool of mushroom culture at submerged cultivation, a fate of organoselenium xenobiotics in macrobasidiomycetes for elaborating upon the "green" techniques of submicrostructured Se-containing biomaterials production and evaluating their antimicrobial potentialities are discussed. The favorable profile of newly synthesized organoselenium compounds including those explored in our research warrants their recognition as a promising option for fortification purposes. Further thorough investigation should be focused on the mechanism of Se-containing compounds' toxicity to take that into account when using the various Se sources in biotechnological fields, including the production of ecologically safe antibacterial agents.

Further thorough investigation should be focused on the mechanism of Se-containing compounds' toxicity to take that into account when using the various Se sources in biotechnological fields, including the production of ecologically safe antibacterial agents.

As for the future perspectives of research in this area the following should be noted. Mushrooms are recognized to be promising ecologically pure raw material for developing the medicinal preparations for care and prophylaxis with wide spectrum of action. Contemporary biomedical applications of selenium are undoubtedly broad. In this relation, of especial interest are the selenium-enriched preparations of higher-fungal origin owing to their availability, biocompatibility, and the proved biological activity.

The development of elemental selenium should be based on natural edible and medicinal products, e.g., mushroom isolates, and considered to be appropriate "green" method. As being originated from the biotransformed organoselenium compound, the selenium submicroparticles incorporated in or separated from the submerged mycelium possess the benefit of their non-toxic source and provide the potential multipurpose use. The approach developed in perspective research should allow the bioproduction of submicrostructured elemental selenium using the edible mushrooms cultures to be put into practice.

Structural peculiarities and biological properties of *Herbaspirillum seropedicae* Z78 lipopolysaccharide¹Velichko N.S., ¹Surkina A.K. ²Fedonenko Y.P., ³Zdorovenko E.L., ¹Konnova S.A.¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Science, Saratov, Russia²Chernyshevsky Saratov State University, Saratov, Russia³N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*E-mail: velichko_n@ibppm.ru*

Herbaspirillum spp. is an endophytic diazotroph found in roots, stems and leaves of wide range plants such as maize, sugarcane, sorghum, rice, and wheat. *H. seropedicae* may stimulate plant growth by supplying fixed nitrogen to the plant, producing and secreting phytohormones or protecting the host against pathogenic microorganisms. *Herbaspirillum seropedicae* is a useful model to study such group of bacteria, since this organism is easily cultivated, has its genome sequenced and genetic manipulation techniques were developed.

A number of symbiotic bacteria with antagonistic activity toward phytopathogens can also cause opportunistic infections in humans. Many soil bacteria and also *Herbaspirillum* can engage in bivalent interactions with plant and human hosts. Although the ability of *Herbaspirillum* to colonize human body is now proven, the role of these bacteria in the pathogenesis of the diseases referred to above remains unclear.

It is of great importance that *Herbaspirillum* is actively used as an effective component of complex biofertilizers recommended for valuable agricultural crops. This enriches the environment with various biologically active molecules, the effect of which on humans and animals has not yet been investigated. It is well known that realization of toxigenic effects and triggering of inflammatory reactions during infections caused by Gram-negative bacteria are preferentially evoked by bacterial lipopolysaccharides (LPSs). O antigens are biologically active molecules that play an important role in serotyping of some bacterial species, contain receptors to many bacteriophages, and appear to be the endotoxins of Gram-negative microorganisms. Since bacteria from this genus have been claimed to be potential opportunistic pathogens, the study of the toxicity of their LPSs and their influence on the nonspecific resistance factors of humans and animals would become necessary, and the results would also help to assess the potential risk for the use of these bacteria for biotechnological applications.

Understanding the mechanisms responsible for the realization of interactions between bacteria and macroorganisms is impossible without data on the chemical structure and composition of the biopolymers involved in these processes. Furthermore, detailed knowledge of the structural peculiarities of the LPSs is of great importance for the investigation of the global functions of these molecules as virulence factors during the infection of eukaryotic cells by Gram-negative bacteria. In this work, we studied the structure, antigenic composition, toxicity, and biological activity of LPS *H. seropedicae* Z78 and we analyzed its structural-functional properties.

Lipopolysaccharide was isolated by phenol extraction from the surface membrane. The lipopolysaccharide's lipid A contained 3-hydroxydecanoic, 3-hydroxydodecanoic, dodecanoic, tetradecanoic, and hexadecanoic acids. The 3-hydroxydodecanoic acid was amide linked to the sugar backbone of the lipid A. The structure of the O polysaccharide from *H. seropedicae* Z78 was established for the first time. It is characterized by heterogeneity and by the presence of glycerol, a component rarely found in Gram-negative bacteria. The O polysaccharide of *H. seropedicae* Z78 was found to consist of two types of repeating units: one represented by glycerol-1-phosphate and the other by the glycerol-1-phosphate of the backbone, which is substituted at the 2-position by N-acetyl-D-glucosamine. The lipopolysaccharide of the *H. seropedicae* Z78 was weakly toxic to warm-blooded animals and moderately and dose-dependently induced interleukin synthesis by human whole blood cells and NO synthesis by mouse splenocytes. This may indicate that the *H. seropedicae* lipopolysaccharide is a promising antagonist of classical endotoxins.

Nanoparticle synthesis by saprotrophic basidial fungi of different ecological groups

Vetchinkina E.P., Loshchinina E.A., Kupryashina M.A., Burov A.M., Pylaev T.E., Nikitina V.E.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, Russia

E-mail: elenavetrus@yandex.ru

Saprotrophic fungi of different ecological groups are active soil builders that can degrade various organic and inorganic substrates, secreting hydrolytic enzymes and organic acids into their surroundings. The effective enzymatic systems allow them to degrade complex nonprotein polymers and transform heavy metal ions and other trace elements into less toxic forms. This ability of saprotrophic fungi can be used to recover ions metals and metalloids to the elemental state with nanoparticle formation. Recently, the use of living organisms for the environmentally- and human-friendly “green” synthesis of nanoparticles has gained increased popularity. Edible saprotrophic basidiomycetes are promising for the biotechnological preparation of nanoparticles, because they are grown in pure culture, are not toxic or pathogenic, and produce a broad range of active protein molecules.

We showed the ability of humus basidiomycetes (*Agaricus bisporus*, *A. arvensis*) and xylotrophic basidiomycetes (*Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*) to recover gold, silver, and selenium, to the elemental state with nanoparticle formation. We examined the effect of these metals and metalloids compounds on the growth and accumulation of biomass; the optimal cultivation conditions and concentrations of the ion-containing compounds used for nanoparticle recovery have been identified. Extra- and intracellular extracts from the basidial fungi reduced HAuCl_4 , AgNO_3 , and Na_2SeO_3 , to nanoparticles of Au_0 , Ag_0 , and Se_0/SeO_2 , and also formed nanoparticles from Na_2SiO_3 . The shape, size, and aggregation of the particles depended both on the fungal species and on the extract type. Transmission electron microscopy, dynamic light scattering, X-ray fluorescence, and X-ray phase analysis were used to find the degrees of oxidation of the bioreduced elements, the ζ -potential of colloidal solutions, and the size, shape, and location of the nanoparticles in the culture fluid, of on the surface of, and inside the hyphae. The reduction of HAuCl_4 with extracellular extracts yielded sufficiently homogeneous, mostly spherical particles of 2 to 30 nm diameter. The Au particles produced with intracellular extracts were sevenfold larger than those obtained with extracellular extracts; some particles of hexagonal, tetragonal, and triangular shape were even larger. The reverse was observed with the bioreduction of AgNO_3 . With extracellular extracts, large and irregularly shaped particles formed that were stuck together in aggregates. With mycelial extracts, very small and homogeneous particles formed that had diameters of 1 to 5 nm. The ζ -potentials of colloidal Au and Ag ranged from -15 to -27 mV with different fungi, this indicated that solutions were electrostatically stabilized and were not prone to coagulation or flocculation. The Se and Si particles formed by the fungal extracts had a more or less regular spherical shape; the particle diameter ranged from 50 to 500 nm. We showed by TEM and by SAED analysis that the Au and Ag particles were of crystalline structure, as indicated by their ring diffraction patterns. The Se and Si particles had a noncrystalline nature, in addition, nanoparticles formed from Na_2SiO_3 were of crystalline structure. The study found the part played by chromatographically pure, homogeneous fungal phenol-oxidizing enzymes (laccases, tyrosinases, and Mn-peroxidases) in the recovery mechanism with the formation of electrostatically stabilized of metals colloidal solutions. The cytotoxicity of the formed Au_0 nanoparticles was negligible in a broad concentration range (1 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), while the Ag_0 nanoparticles were nontoxic only from 1 to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Biological synthesis of nanoparticles with the aid of cultivated xylotrophic and soil basidiomycetes holds much promise because it is simple, accessible, and environmentally benign and because it yields nanoparticles of required chemical makeup, shape, and size.

Bacteria of the genus *Bacillus* associative with rice plants

Yakubovskaya A.I., Gritchik M.V.

Federal State Budget Scientific Institution "Research Institute of Agriculture of Crimea" Simferopol, Russia

E-mail: yakubovskaya_alla@mail.ru

Rhizospheric bacteria play an important role in activation the resistance to biotic and abiotic factors in plants due to the ability to convert mineral and organic compounds into a form available to plants, synthesize biologically active substances, and change physical and chemical properties of the soil. Taxonomically, these bacteria are extremely diverse (genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*) and, as a rule, are determined by the quantitative and qualitative composition of root secretions, depending on the species, age and growing conditions of the plant. Bacteria of the genus *Bacillus* are of great scientific and practical interest as they are widespread, multifunctional, and the stability of their spores to the chemical and physical factors of the environment makes them promising bioagents of microbial preparations.

The aim of the research was to isolate strains of bacteria of the genus *Bacillus*, associative with rice plants, and study their biotechnological properties.

The search and isolation of bacterial strains were carried out in the apical part of the root using a methodological system approach. Thirteen morphotypes of bacteria were isolated from the microbial soil cenosis formed in rice monoculture. Four types of colonies dominated, the number of which was more than 10% of the total number of counted bacteria, and the frequency of occurrence did not exceed 3.6%. Morphological features of the isolated strains are the following: colonies of rhizoid or round form 3-5 mm in diameter, matte, flat, cream colored, with a rough (folded) surface. From the obtained isolates, strains of aerobic spore-forming bacteria *Bacillus* sp. № 71, 710, 92, 10 were isolated. Their generic assignment was confirmed by studies of morphological and cultural-biochemical properties.

One of the important mechanisms of the positive influence of associative rhizobacteria on the vital activity of plants is the improvement of nitrogen nutrition due to the ability of bacteria to fix nitrogen from the atmosphere. In the isolated strains of the genus *Bacillus*, acetylene reduction showed a high nitrogenase activity, which ranged from 326.6 to 509.9 C₂H₄nM/ml/hr. Screening showed that the most active nitrogen fixers are *Bacillus* sp.710 and *Bacillus* sp. 92.

Another important mechanism of interaction of plant-associating bacteria is the synthesis of substances that stimulate growth (auxins, cytokinins, gibberellins). Biotest on wheat seeds showed positive effect of seed bacterization with new strains of *Bacillus*. Stimulation of coleoptile growth during seed treatment with a suspension of *Bacillus* sp. 10 was 11%, which may indicate the synthesis of phytohormones of cytokinin nature. Treatment with *Bacillus* sp 92 promoted stimulation of root growth by 10%. The germination of wheat seeds was increased by 30% when treated with a suspension of the strain *Bacillus* sp.92.

For a comprehensive assessment of the economically useful properties of new strains of the genus *Bacillus*, their fungistatic activity was studied influencing the phytopathogenic micromycetes *Fusarium glumarum*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*. Strains *Bacillus* sp. 71, *Bacillus* sp. 710, *Bacillus* sp. 10 showed antifungal activity to *F. glumarum*. The zone of phytopathogenic suppression was 5-7 mm.

Thus, strains of bacteria associative with rice plant were isolated and identified as *Bacillus*. It has been established that the isolated strains have a set of useful properties for plants (nitrogen fixation, antagonism to phytopathogenic fungi, production of phytohormones), which allows the formation of a stable plant-microbial system and contributes to better development of *Oryza sativa* plants. As a result of screening, the most promising strain is *Bacillus* sp.92.

Stimulation of the cellular mechanisms of virus resistance of potatoes by the action of the drug based on the *Bacillus subtilis* bacteria

¹Yanchevskaya T.G., ²Yarullina L.G., ¹Grits A.N., ³Kolomiets E.I., ³Romanovskaya T.V., ⁴Ibragimov R.I., ⁴Tsvetkov V.O.

¹Institute of experimental botany of NAS of Belarus, Minsk, Belarus republic

²Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

³Institute of Microbiology of NAS of Belarus, Minsk, Belarus

⁴Bashkir state University, Ufa, Russia

E-mail: yarullina@bk.ru

In the launch of protective mechanisms in response to the introduction of the pathogen is important plant perception of the signal of a pathogenic attack and its spread through the tissues of the plant. Currently, to protect plants from phytophagous agents widely used bacteria-based products of the genus *Bacillus*, inhibiting the growth and development of pathogens, as well as stimulating plant growth and resistance to adverse environmental factors. Increased resistance of plants to pathogens under the influence of such drugs is associated with the ability of *B. subtilis* bacteria to production of various metabolites possessing antiviral, antibacterial, antifungal action. Thus, bacteria-produced lipopeptides, like signaling molecules, contribute to the development of systemic induced stability. For purposeful search and selection of *B. subtilis* strains with economically valuable features knowledge about the mechanisms of formation of plant resistance under their influence is necessary.

The object of research was the plants of potato. The biological product was obtained on the basis of bacteria *B. subtilis* strain 47 (from the collection of the Institute of Microbiology of NAS of Belarus), which was used for spraying and watering plants. The plant material infected by Y-virus of potato was carried out by injecting 100 µl of cell solution with the virus in the apical part of the 20-day plants. Detection of viruses in potato tissues was carried out by the method of enzyme immunoassay. To assess the inducing effect of the preparation on the protective potential of plants, the activity and molecular heterogeneity of oxide reductase, the molecular basis of plant signaling systems, were measured.

The results of the study showed that the pretreatment of plants with a biological product completely protected plants from infection with the virus. Anti-virus activity of the drug was accompanied by growth of stimulating effect and increase in the content of dry matter in tubers. Under the influence of drug treatment increased the total activity of peroxidase in the leaves of plants of both varieties. The increase in total enzymatic activity was due to the activation of various isozymes.

It was revealed that infection with the virus and potato plant treatment with the preparation did not affect the molecular heterogeneity of superoxide dismutase, but had a significant effect on the activity of individual isoforms, and accordingly, on the level of total activity of the enzyme. The greatest contribution to the increase in the total activity of superoxide dismutase under the influence of the virus and the drug was made by isoforms with medium molecular weight.

Thus, as a result of the drug increased the activity of enzymes in the leaves of plants due to changes in the relative activity of their isoforms. At the same time, the drug based on *B. subtilis* increased the activity of superoxide dismutase in the application of both uninfected and infected plants. It is assumed that the change in the activity of individual isoforms of redox enzymes that regulate the level of ROS in the treatment of bacterial preparations is one of the mechanisms to increase plant resistance to viral infection.

Адаптационный потенциал лектинов азоспирилл, связанный с функционированием системы антиоксидантной системы защиты

Аленькина С.А., Никитина В.Е.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, г. Саратов, Россия

E-mail: alenkina_s@ibppm.ru

Ассоциативные азотфиксирующие бактерии рода *Azospirillum* – PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) микроорганизмы, стимулирующие рост растений за счет ряда положительных эффектов на растения. В настоящее время, одним из перспективных направлений по повышению устойчивости растений к действию различных стрессовых факторов является использование экологически чистых технологий, основанных на применении эпифитных и эндофитных штаммов *Azospirillum*. Штаммы *A. brasilense* Sp7 и Sp245 относятся к наиболее изученному виду азоспирилл и отличаются стратегией поведения в процессе формирования симбиотических отношений. Образование азотфиксирующих систем, подобно как и любых других биологических межклеточных взаимодействий включает функционирование углеводсвязывающих белков – лектинов. С поверхности бактерий - *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 были выделены лектины, являющиеся гликопротеинами с различными молекулярными массами и углеводной специфичностью. Было показано, что лектины азоспирилл являются полифункциональными молекулами. Экстремальные температуры и засоление являются одними из важнейших факторов внешней среды, воздействующих на растения, поэтому изучение механизмов адаптации высших растений имеет большое научное и практическое значение. При этом показано, что одним из самых ранних эффектов является окислительный стресс, обусловленный накоплением активных форм кислорода. Для защиты от него в растениях существует антиоксидантная система, состоящая из ферментов - супероксиддисмутазы, каталазы, некоторых пероксидаз.

Изучали влияние лектинов *Azospirillum brasilense* Sp7 (эпифит) и *Azospirillum brasilense* Sp245 (эндофит) на активность ферментов антиоксидантного комплекса корней четырехдневных проростков пшеницы при кратковременном (2 ч) гипо-, гипертермическом воздействии и засолении. Показано, что оба лектина вызывали увеличение активности пероксидазы, супероксиддисмутазы и уменьшение активности каталазы при действии стрессовых факторов, но временная и концентрационная зависимости были различными. Вероятной причиной различной функциональной активности лектинов может быть различная углеводная специфичность, структурные различия белков. Результаты настоящей работы свидетельствуют об участии лектинов азоспирилл в адаптационных изменениях в корнях проростков пшеницы, что способствует нормальному ходу метаболических процессов и обеспечивает регуляцию взаимодействия растений с азоспириллами при абиотических воздействиях.

Adaptation potential of *Azospirillum* lectins linked to the functioning of the plant antioxidant defense system

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

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

Associative N₂ fixers of the genus *Azospirillum* are plant-growth-promoting rhizo-bacteria (PGPR), which stimulate plant growth through a range of positive effects. A promising current method to increase the resistance of plants to stress is the use of environmentally benign technologies based on the use of epiphytic and endophytic strains of *Azospirillum*. *A. brasilense* strains Sp7 and 245 belong to the best studied *Azospirillum* species and have a distinct strategy of behavior during the establishment of symbiosis. The formation of N₂-fixing systems, like that of any other intercellular biological interactions, implicates the functioning of carbohydrate-binding proteins (lectins). We had previously isolated surface lectins from *A. brasilense* Sp7 and Sp245 that were glycoproteins with differing molecular masses and carbohydrate specificities. The lectins had been found to be polyfunctional. Extreme temperatures and saline conditions are some of the most important environmental factors affecting plants. Therefore, study of the mechanisms governing adaptation in higher plants is of great scientific and practical significance. One of the earliest effects is oxidative stress caused by the accumulation of reactive oxygen species. To protect themselves from this stress, plants have developed enzymatic antioxidative systems consisting of superoxide dismutase, catalase, and peroxidases. We examined the effect of the lectins from *A. brasilense* Sp7 (epiphytic strain) and *A. brasilense* Sp245 on the activities of antioxidant enzymes in roots of 4-day-old seedlings of wheat under short-term (2 h) hypothermic, hyperthermic and salt stress. Under all stresses, both lectins increased peroxidase and superoxide dismutase activities and decreased catalase activity, but the periods of effect and the concentrations involved were different. The differences in functional activity between the lectins could be due to the differences in carbohydrate specificity and in structure between them. Our results indicate that the *Azospirillum* lectins are implicated in adaptational changes in wheat seedling roots. This promotes the normal course of metabolism and ensures regulation of the plant-*Azospirillum* interaction under abiotic stress.

Протекторное действие препарата гуми на растения пшеницы в условиях солевого стресса

Авальбаев А.М., Аллагулова Ч.Р., Масленникова Д.Р., Безрукова М.В., Лубянова А.Р., Юлдашев Р.А., Кузнецов В.И., Шакирова Ф.М.

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

E-mail: avalbaev@yahoo.com

Гуминовые кислоты являются одним из важных компонентов гумуса почв, с которыми связаны функции поддержания жизнедеятельности почвенных микроорганизмов, растений, животных, стабилизация структуры почвы и плодородия. К настоящему времени накопилось много сведений об эффективности применения гуминовых кислот и препаратов, созданных на их основе, для стимуляции роста и повышения устойчивости и продуктивности разных видов растений. В настоящей работе исследовали влияние предпосевной обработки семян пшеницы (*Triticum aestivum* L.) препаратом Гуми на устойчивость растений к воздействию 2%-ного NaCl. Засоление вызвало существенное торможение роста проростков, о чем судили по их линейным размерам и митотическому индексу клеток апикальной меристемы корней. Предобработка проростков препаратом Гуми способствовала заметному уменьшению степени повреждающего действия солевого стресса на показатели их роста. Вместе с тем, солевой стресс приводил к существенному возрастанию концентрации аминокислоты пролина, малонового диальдегида и уровня экзоосмоса электролитов из тканей проростков, что указывает на испытываемый растениями стресс. О защитном действии предобработки Гуми на проростки в условиях солевого стресса свидетельствовало существенное уменьшение уровня перекисного окисления липидов, экзоосмоса электролитов и пролина. Таким образом, полученные результаты иллюстрируют явный защитный эффект препарата Гуми на растения пшеницы к засолению при предпосевном способе обработки.

Protective action of humi preparation on wheat plants under the action of salt stress

Avalbaev A.M., Allagulova Ch.R., Maslennikova D.R., Bezrukova M.V., Lubyanova A.R., Yuldashev R.A., Kuznetsov V.I., Shakirova F.M.

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

Humic acids are an important component of soil humus which being related to maintenance of vital activity of soil microorganisms, plants, animals, soil water-holding capacity and stabilization of soil structure and fertility. At present a lot of information accumulated about the effectiveness of humic acids and preparations created on their basis to stimulate growth and improve resistance and productivity of different plant species. In the present work, we studied the effect of presowing treatment of wheat seeds (*Triticum aestivum* L.) with HUMI preparation on plant resistance in response to 2% NaCl. Salinity caused a significant growth inhibition of seedlings which was evidenced by measurement of their linear sizes and the mitotic index of cells in the apical root meristem. Pretreatment of seedlings with HUMI preparation contributed to a marked decrease of damaging effect of salt stress on their growth indices. At the same time, salt stress led to a significant increase in the concentration of the amino acid proline, malonic dialdehyde and electrolyte leakage from seedling tissues which indicated that plants experienced stress. The significant reduction of stress-induced lipid peroxidation, electrolyte leakage and proline accumulation in HUMI-pretreated seedlings points towards the protective effect of HUMI on wheat seedlings under conditions of salt stress. Thus, the obtained results demonstrated the protective effect of presowing treatment of wheat seeds with HUMI preparation on wheat plants in response to salinity.

Изучение фунгицидных свойств суспензии водоросли *Chlorella vulgaris* (Beijerinck) (Chlorophyta)

Аллагуватова Р.З., Мясина Ю.Б., Кунсбаева Д.Ф., Горшкова О.В., Суханова Н.В., Гайсина Л.А.

ФГБОУ ВО "БГПУ им. М. Акмуллы", Уфа, Россия

E-mail: allaguvatova@yandex.ru

Способность водорослей рода *Chlorella* к подавлению развития патогенных микроорганизмов была доказана в целом ряде публикаций. В то же время, фунгицидное действие суспензии водоросли исследовано недостаточно и требует дальнейшего изучения.

Целью работы был анализ фунгицидного влияния суспензии хлореллы на развитие гриба *Mucor* sp. При проведении экспериментов грибы выращивали в чашках Петри с картофельным агаром в течение 7 суток. Затем поверхность чашек заливали суспензией хлореллы возрастом 7-10 суток. Чашки выращивали на осветительной установке при комнатной температуре при чередовании световой и темновой фаз 12:12 ч. Повторность эксперимента была равна 10. Просмотр чашек проводили через 14 и 21 сутки. Контрольные чашки заливали жидкой питательной средой Болда (Bischoff, Bold, 1963).

Установлено, что суспензия хлореллы угнетает развитие колоний *Mucor* sp., причем с увеличением времени воздействия наблюдается усиление ингибирующего воздействия. Через 14 суток инкубирования площади колоний грибов уменьшалась на 7-20%, через 21 сутки - на 33-100%. Кроме того, суспензия *Chlorella vulgaris* влияла и на морфологию колоний *Mucor* sp. В контрольных чашках грибы имели темно-коричневые спорангии с большим количеством спор. Через 14 суток воздействия суспензии хлореллы отмечалось побледнение спорангиев и появление бесцветных спор. Через 21 сутки влияния суспензии эти изменения усиливались.

Таким образом, эксперименты по изучению влияния суспензии *Chlorella vulgaris* на развитие гриба *Mucor* sp. доказали ее фунгицидное воздействие, что позволяет рекомендовать хлореллу для более широкого использования при создании экологически безопасных биофунгицидов.

Study of fungicidal properties of *Chlorella vulgaris* (Beijerinck) (Chlorophyta) suspension

Allaguvatova R. Z., Myasina Y.B., Kunsbaeva D.F., Gorschkova O.V., Sukhanova N.V., Gaysina L.A.

FSBEI "M.Akmullah Bashkir State Pedagogical University", Ufa, Russia

The ability of algae from genus *Chlorella* to suppress the development of pathogenic microorganisms has been proved in a number of publications. At the same time fungicidal action of the suspension has not been studied enough and requires further research.

The aim of research was analysis of fungicidal effect of the suspension of *Chlorella* on development of fungus *Mucor* sp. Fungus were grown in Petri dishes with potato during 7 days. Then suspension of *Chlorella* of age 7-10 days were added into these dishes. Petri dishes were incubated on an illuminated shelf with 12h:12h light:dark regime. Repetition of the experiment was 10. Growth of *Mucor* sp. were analyzed after 14 and 21 days. Control dishes were poured with liquid Bold's medium.

It was found that the suspension of *Chlorella* inhibits the development of colonies of *Mucor* sp., with an intensification of the inhibitory effect with increasing exposure time. After 14 days of incubation, the area of the fungal colonies decreased on 7-20%, after 21 days - 33-100%. In addition, the suspension of *Chlorella vulgaris* influenced the morphology of colonies of *Mucor* sp. In the control dishes, the fungi had dark brown sporangia with a large number of spores. After 14 days of exposure to the *Chlorella* suspension, sporangia blanching and the appearance of colorless spores were noted. After 21 days of cultivation these changes were enhanced.

Thus, experiments on the influence of *Chlorella vulgaris* suspension on the development of the fungus *Mucor* sp. proved its fungicidal effect. It allows to recommend *Chlorella* for wider use for the creation of ecologically safe biofungicides.

Влияние растительных экстрактов *Withania somnifera* L. на грибы рода *Fusarium* L.

Алрашиди А.А., Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н.

Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва

E-mail: kalash0407@mail.ru

Лекарственные растения применяются человеком еще с давних времен и имеют многовековую историю. Применяются они как самостоятельные средства, а также используются в качестве первичного сырья, из которых получают препараты для различного направления. Природный препарат способен вызвать положительный эффект в том направлении, где другие отдельные соединения, также выделенные из этого же растения, оказались малоэффективными. Это обуславливается наличием в растительных экстрактах комплексов, которые могут состоять из десятков и более отдельных химических соединений, которые могут проявлять разную биологическую активность. Ранее проведенные исследования на кафедре генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева показали, что наиболее эффективным растворителем для получения растительных экстрактов является спирт, а для введения его в культуру *in vitro* диметилсульфоксид (DMSO). Поэтому в нашей работе именно этот растворитель был взят за основу при изучении антифунгицидной активности экстрактов, полученных из микрорастений и каллусной ткани ашваганды (*Withania somnifera* L.) *in vitro*. В нашей работе растительные экстракты, полученные из микрорастений ашваганды ранее культивируемых на питательной среде МС в сочетании с препаратом Дроп 0,05 мг/л и каллусной культуры, полученной из листовых эксплантов на питательной среде МС, содержащей 2,4-Д 1 мг/л, были апробированы на чистой культуре грибов *Fusarium culmorum* (штамм, М -10-1) и *Fusarium sporotrichioides* Sherd (штамм ОР -14-1) в концентрациях 30, 60, 100 мг/л. Контролем служила среда без экстракта, а так же чистый растворитель (DMSO). Исследования показали, что изучаемые экстракты обладают в той или иной степени антифунгицидной активностью, которая зависит от источника получения экстракта, его концентрации, а также от исследуемого штамма фитопатогена. Установлено, что исследуемые экстракты оказали различное токсическое действие на рост мицелия гриба *Fusarium culmorum* и *Fusarium sporotrichioides* Sherd. Причем это действие явно проявлялось на грибах *Fusarium sporotrichioides* Sherd и практически отсутствовало на грибах *Fusarium culmorum*. Следует отметить, что экстракты, полученные из каллусной ткани, обладали меньшей антифунгицидной активностью, по сравнению с экстрактами, полученными из растений-регенерантов. Причем данная ответная реакция изучаемых фитопатогенов (*Fusarium sporotrichioides* Sherd, *Fusarium culmorum*) на действие двух различных экстрактов была одинаковой.

Effect of plant extracts of *Withania somnifera* L. on fungi of the *Fusarium* L.

Alrashidi A. A., Kalashnikova E. A., Kirakosyan R. N.

Russian state agrarian University-MTAA named after K. A. Timiryazev, Moscow, Russia

Medicinal plants used by man since ancient times and have a long history. They are used as an independent means, and are also used as primary raw materials, from which drugs are obtained for various directions. The natural preparation is able to cause a positive effect in the direction where other individual compounds, also isolated from the same plants, were ineffective. This is due to the presence of complexes in plant extracts, which may consist of dozens or more separate chemical compounds that may exhibit different biological activity.

Earlier studies at the Department of genetics, biotechnology, breeding and seed production of rsau-MSHA named after K. A. Timiryazev showed that the most effective solvent for obtaining plant extracts is alcohol, and for its introduction into the culture *in vitro* dimethyl sulfoxide (DMSO). Therefore, in our work, this solvent was taken as a basis in the study of antifungal activity of extracts obtained from micrograms and callus tissue of ashwagandha (*Withania somnifera* L.) *in vitro*.

In our work plant extracts obtained from micro plants of Ashwaganda previously cultivated on nutrient MS medium in combination with the drug, Drop 0.05 mg/l and the callus culture obtained from leaf explants on a nutrient MS medium MC, containing 2,4-D 1 mg/l, was tested on a pure culture of *Fusarium culmorum* (strain M-10-1) and *Fusarium sporotrichioides* Sherd (strain OP-14-1) at concentrations of 30, 60, 100 mg/l were used as the Control medium without extract and pure solvent (DMSO).

Studies have shown that the studied extracts have a varying degree of antifungal activity, which depends on the source of the extract, its concentration, as well as the studied strain of the phytopathogen. It is established that the investigated extracts had different toxic effects on the growth of mycelium of the fungus *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium culmorum* Sherd. Moreover, this effect is clearly manifested in the fungi *Fusarium sporotrichioides* Sherd and virtually absent in the fungi *Fusarium culmorum*. It should be noted that the extracts obtained from callus tissue had less antifungal activity, compared with extracts obtained from regenerated plants. Moreover, this response of the studied phytopathogens (*Fusarium sporotrichioides* Sherd, *Fusarium culmorum*) the effect of two different extracts were the same.

Некоторые проблемы разнообразия микробных сообществ

Андронов Е.Е.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург,
Пушкин, Россия*E-mail: eeandr@gmail.com*

На довольно простой вопрос о том, какое из двух микробных сообществ более разнообразно, нет простого ответа. Актуальность данного вопроса стала очевидной особенно в эпоху метагеномики, где оценка разнообразия – таксономического и функционального стала одной из базовых процедур анализа данных. Для того, чтобы сравнить разнообразия, сначала нужно договориться о том, что такое «разнообразие». В этом небольшом докладе будут рассмотрены основные тренды в оценке разнообразия: альфа-, бета- и гамма-разнообразия; соотношения evenness- richness, взвешенных и невзвешенных метрик, введению в индексы разнообразия филогенетической компоненты, а также методы статистической поддержки различий в уровнях разнообразия. Наконец, будет продемонстрирован новый тип разнообразия – топологическое разнообразие, анализ которого важен для понимания процессов коэволюции симбиотических систем.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Геномики, протеомики и клеточной биологии» ФГБНУ ВНИИСХМ и поддержана грантом РФФИ 18-16-00073.

Some problems of the diversity of microbial communities

Andronov E.E.

All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Pushkin, Russia

A simple question about which of the two microbial communities is more diverse has no simple answer. The relevance of this issue has become evident especially in the era of metagenomics, where the estimation of taxonomic and functional diversity has become one of the basic procedures in data analysis. In order to compare diversities, you first need to agree on what "diversity" is. In this short report, the main trends in the assessment of diversity will be considered: alpha, beta and gamma diversities; the evenness-richness components of diversity, weighted and unweighted metrics, introduction of phylogenetic component diversity into diversity indices, as well as methods of statistical support of differences in diversity levels. Finally, a new type of diversity will be demonstrated so called "topological" diversity, the analysis of which is important for understanding the processes of co-evolution of symbiotic systems.

The work is supported by the grant of the RNF 18-16-00073.

Некоторые методические аспекты культивирования *in vitro* зрелых зародышей местных сортов ячменя

¹Асадова С.Ш., ²Гамбарова П.И

¹Институт молекулярной биологии и биотехнологий национальной академии наук Азербайджана, Научно-исследовательский институт земледелия МСХ Азербайджана, Баку, Азербайджан

²Азербайджанский государственный аграрный университет, Гянджа, Азербайджан

E-mail: biotexnoloqaz@mail.ru

Успехи в экономике сельского хозяйства Азербайджана во многом связаны с созданием новых высокоурожайных сортов зерновых культур. До недавнего времени в республике при создании перспективных сортов ячменя использовались традиционные методы селекции. Для применения клеточной селекции необходимо разработать методические подходы получения пролиферирующих тканей и стабильной регенерации. Решение данной проблемы предполагает подбор оптимальных эксплантов, питательных сред и условий культивирования, таких как температура и освещение. Все три условия взаимосвязаны и оказывают непосредственное влияние на ход морфогенеза и получение растений-регенерантов. В представленной работе приведены данные, полученные в экспериментах, где объектами исследования служили местные сорта ячменя: Гудратли - 48, Джалилабад - 19, Нахчевандани, Бахарлы, Даянатли. Сорта отличались по урожайности, числу рядов, устойчивости к ряду заболеваний и почвенно-климатическим условиям. В качестве эксплантов использовались зрелые зародыши, которые после извлечения высаживались на питательные среды Мурасиге-Скуга, содержащие различные соотношения и концентрации 2,4-Д, БАП и кинетина. Культивирование осуществлялось в темноте и на свету при температуре 26°C. Индукция морфогенеза осуществлялась в условиях освещенности. Для предотвращения прорастания зародышей в среды для каллусогенеза добавляли гидролизат казеина. Также учитывалось влияние на прорастание зародышей вариантов стерилизации, с применением и без применения концентрированной серной кислоты, композиции фитогормонов и условий культивирования в темноте и на свету. Отмечено, что питательная среда, в которую в качестве фитогормонов добавляли 2,4-Д и кинетин имела определенное преимущество, поскольку при культивировании эксплантов в одинаковых условиях освещенности и температуры, в этом варианте опыта случаев прорастания было меньше, а число зародышей, на которых стали появляться каллусные клетки – больше. Несмотря на прорастание, на зародышах начинала образовываться каллусная ткань, которая пролиферировала при последующем усечении проростка. Световое и темновое культивирование эксплантов визуальное значительного влияния на пролиферацию и образование морфогенного каллуса не оказало. Разница наблюдалась лишь в окраске каллуса, который из-за культивирования на свету имел зеленый оттенок.

Some methodic aspects of *in vitro* cultivation of mature embryos of local barley varieties

¹Asadova S.Sh., ²Gambarova P.I.

¹Institute of Molecular Biology and Biotechnology of Azerbaijan National Academy of Sciences, Research Institute of Crop Husbandry, Ministry of Agriculture of Azerbaijan, Baku, Azerbaijan

²Azerbaijan State Agricultural University, Ganja, Azerbaijan

Success in the agricultural industry of Azerbaijan is largely related to the creation of new high-yield, stress tolerant and disease resistant varieties of grain crops, including barley. Until recently, country-wide only traditional methods of selection have been used in the development of promising barley varieties, and cell culture methods haven't been applied. In order to carry out cell selection in *in vitro* conditions, it is necessary to develop methodological approaches for obtaining proliferating cell cultures and stable regeneration. Solution of the issue involves selection of optimal explants, nutrient media and cultivation conditions, such as temperature and lighting. All these conditions are interrelated and have a direct impact on both the course of morphogenesis and the obtaining of regenerating plants. Data obtained from the experiments where Gudratly – 48, Jalilabad - 19, Nakhichevandany, Bakharly, Dayanatly barley varieties were used is given in the presented work. Varieties differed in terms of yield, number of rows, resistance to disease, soil and climatic conditions. Mature embryos were used as explants and after extraction they were planted on the Murashige-Skoog nutrient media containing various ratios and concentrations of 2,4-D, BAP and kinetin. Cultivation was carried out in the darkness and in the light at a temperature of 26° C. Induction of morphogenesis was conducted on nutrient media of the same hormonal composition and was carried out in the light at a temperature of 26° C. Hydrolysate of casein was added in the medium for callusogenesis to prevent germination of embryos. The effects of sterilization both with and without use of concentrated sulfuric acid, phytohormones composition and cultivation conditions in the darkness and in the light on germination of embryos was taken into account. Observations revealed that the nutrient medium in which the fixed ratio of 2.4-D and kinetin was added as phytohormones had a definite advantage, since in explant cultivation under the same conditions of illumination and temperature, the incidence of germination was less and the number of embryos on which callus cells began to appear raised. Despite the germination, callus tissue began to form on the embryos, which proliferated during the subsequent truncation of the sprout. Regarding the conditions of explants cultivation, light and dark cultivation conditions did not significantly effect the induction of callusogenesis and the formation of morphogenic callus. The difference was observed only in the color of callus, which due to cultivation in the light had a green tinge. Both light and dark cultivation was carried out in an artificial climate chamber under the conditions of the same air temperature reaching 26°C. Probably, a positive result is possible with a impermanent cultivation of explants under high temperature conditions.

Биологическая эффективность бактериального агента рода *Bacillus* в отношении *Drechslera teres* на озимом ячмене на стадии проростков

Асатурова А.М., Астапчук И.Л., Жевнова Н.А., Волкова Г.В.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений», Краснодар, Россия
E-mail: irina_astapchuk@mail.ru

Гемибиотрофный гриб, *Drechslera teres* (Sacc.) Shoemaker вызывает сетчатую пятнистость листьев ячменя. Гриб космополит и по данным литературы в природе имеет много «хозяев» среди злаков, может паразитировать на пшенице, овсе, ржи и злаковых травах. На Северном Кавказе эпифитотии болезни возникали 4-6 раз за 10 лет, при этом снижение урожайности достигало 45 %, уменьшение количества колосьев – до 15 %, количества зерен в колосе – до 20 %. Защита посевов от данного патогена предполагает, помимо селекционных и агротехнических мероприятий, использование химических пестицидов. Однако, их токсическое действие негативно сказывается на состоянии агроценозов. Альтернативой химическим пестицидам являются биопрепараты на основе живых культур микроорганизмов. Экологичность биопрепаратов способствует их активному внедрению в сельскохозяйственную практику. Цель наших исследований: определение биологической эффективности бактериального агента *Bacillus subtilis* BZR 336 г в отношении *D. teres*. Искусственное заражение *D. teres* на восприимчивом к патогену сорте озимого ячменя Лазарь проводили по общепринятым методикам. Использовали следующие варианты: 1) предпосевную обработку семян и обработку растений по вегетации; 2) только обработку растений по вегетации. Норма расхода жидкой культуры (ЖК) биоагента составила 3,0 л/га. Химические эталоны - Кинто Дуо, КС, Амистар Экстра, КС, биологический эталон - Алирин Б, Ж использовали в установленных нормах. Характер защитного действия был оценен путем подсчета площади поражения листа по шкале Бабаянц и др. (1989). Биологическая эффективность рассчитана по формуле Эббота. В результате установлено, что максимальная биологическая эффективность – 66,4 % была отмечена в варианте с применением предпосевной обработки семян и вегетирующих растений химическими эталонами. Без предпосевной обработки этот показатель составил 45,9 %. Предпосевная обработка зерна ЖК *B. subtilis* BZR 336 г в сочетании с обработкой по вегетации обеспечивала защиту на уровне 49,4 %. В то время как эффективность обработки только вегетирующих растений составила 40,9 %, что выше биологического эталона. Полученные данные подтверждают способность бактериального агента *Bacillus subtilis* BZR 336 г ингибировать *D. teres* на озимом ячмене на стадии проростков. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ и администрации Краснодарского края 16-44-230308 р_а.

Biological efficacy of the bacterial agent of the *Bacillus* genus against *Drechslera teres* on winter barley in the seedling stage

Asaturova A. M., Astapchuk I. L., Zhevnova N. A., Volkova G. V.

FGBICU «All-Russian Scientific Research Institute of Biological Plant Protection», Krasnodar, Russia

The hemibiotrophic fungus, *Drechslera teres* (Sacc.) Shoemaker causes barley net blotch. According to the data of special literature cosmopolitan fungus having many "hosts" among crops in natural environment, can parasitize on wheat, oats, rye and crop grasses. In the North Caucasus, the epiphytosis of the disease were observed 4-6 times in 10 years, while a decrease in yield reached 45%, a decrease in the number of ears - up to 15%, the number of grains in the ear - up to 20%. Crop protection against this pathogen suggests, in addition to selection and agrotechnical measures, the use of chemical pesticides. However, their toxic characteristics negatively affect the agrocenoses conditions. An alternative to chemical pesticides are biopreparations based on living cultures of microorganisms. Ecological compatibility of biopreparations promotes their active introduction into agricultural practice. The purpose of our research was to determine the biological efficacy of the bacterial agent *Bacillus subtilis* BZR 336 g for *D. teres*. Artificial infection of *D. teres* on the susceptible to the pathogen winter barley variety Lazar was carried out according to generally accepted methods. The following variants were used: 1) presowing seed treatment and treatment of plants during vegetation; 2) just plant treatment during vegetation. The consumption rate of liquid culture (LC) of the bioagent was 3.0 l / ha. Chemical standards - Kinto Duo, KS, Amistar Extra, KS, biological standard - Alirin B, F were used in established rates. The protective effect was assessed by counting the area of the leaf damage on the scale of Babayants et al. (1989). Biological efficacy is calculated according to Abbott formula. As a result, the maximum biological efficacy - 66.4% - was noted in a variant with presowing treatment of seeds and vegetative plants with chemical standards. Without presowing treatment, this indicator was 45.9%. Presowing treatment of seeds with *B. subtilis* BZR 336 g LC in combination with vegetation treatment provided protection at the level of 49.4%. While the efficacy of treatment of only vegetative plants was 40.9%, which is higher than the biological standard. The obtained data confirm the ability of bacterial agent *Bacillus subtilis* BZR 336 g to inhibit *D. teres* on winter barley in the seedling stage. The work was supported by a grant from the RFBR and the administration of the Krasnodar Territory 16-44-230308 r_a.

Генетические особенности бактерий, определяющие штаммовую специфичность взаимодействия мутантной линии P61 гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с *Rhizobium leguminosarum*

¹Афонин А.М., ¹Сулима А.С., ^{1,2}Васильева Е.Н., ^{1,2}Масликова Т.И., ¹Жуков В.А., ^{1,2}Тихонович И.А.

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский Государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: aafonin@arriam.ru

Способность многоклеточных организмов образовывать азотфиксирующие симбиозы с микроорганизмами возникла во многих ветвях эволюции. Растения семейства бобовые обладают способностью образовывать азотфиксирующие клубеньки - особые структуры, обеспечивающие эффективную фиксацию атмосферного азота микросимбиотом. Развитие клубенькового симбиоза контролируется взаимодействием между растительной и бактериальной генетическими программами.

В 1993 году Sagan с коллегами удалось получить Линию гороха посевного P61, обладающую так называемым fix-фенотипом (клубеньки не способные к фиксации азота). В дальнейшем они обнаружили, что данный фенотип был штаммоспецифичным, то есть проявлялся только при взаимодействии с некоторыми штаммами. Однако все совместимые штаммы были утеряны. В рамках работы лаборатории при изучении мутанта P61 была обнаружена способность типового штамма RCAM1026 подавлять мутантный фенотип данной линии. На данный момент причина такой повышенной эффективности штамма остается неизвестной. Целью работы было определение генетических особенностей штамма RCAM1026, позволяющих ему эффективно взаимодействовать с линией P61. Для определения точного генома штамма RCAM1026 было проведено геномное секвенирование с использованием секвенатора MinION, позволившее получить полный сиквенс всех репликонов. Для изучения совместных транскриптомных профилей бактерий эффективного штамма RCAM1026 и неэффективного штамма 3841 при взаимодействии с растением дикого типа и мутантом была использована технология 5' MACE.

Использование этой технологии позволило найти значимо дифференциально экспрессирующиеся группы генов в обоих штаммах. У штамма RCAM1026 оказалось значительно большее количество up-регулируемых генов при взаимодействии с линией P61 чем у штамма 3841. Таким образом мы обнаружили ряд бактериальных генов, потенциально ответственных за преодоление fix- фенотипа линии P61.

Данная работа была поддержана грантом РФФИ 18-34-00844 и грантом РНФ 17-76-30016.

Bacterial genetic features determining the strain specificity of *Pisum sativum* line P61 interaction with *Rhizobium leguminosarum*

¹Afonin A.M., ¹Sulima A.S., ^{1,2}Vasilieva E.N., ^{1,2}Maslikova T.I., ¹Zhukov V.A., ^{1,2}Tikhonovich I.A.

¹ All-Russia research institute for agricultural microbiology, Saint-Petersburg, Russia

² Saint Petersburg state university, Saint-Petersburg, Russia

The ability to assimilate nitrogen by forming symbioses with nitrogen-fixing bacteria developed in various plants. Fabaceae possess the ability to form nodules, specialised structures that house the symbiotic bacteria supplying the plant with fixed nitrogen. The development of this highly specialised organ is controlled both by plant and bacterial genetic programmes. In 1993 Sagan et al. produced the P61 pea line, mutant in the sym25, exhibiting the so-called fixphenotype (nodules incapable of fixing nitrogen).

They later discovered that phenotype to be strain-specific, but the strains were subsequently lost. Recently in our laboratory the ability of strain *Rhizobium leguminosarum* bv viciae RCAM1026 to suppress the mutant phenotype of P61 line was discovered. The exact cause of the increased symbiotic prowess of RCAM1026 remained a mystery. The aim of this study was to uncover the genetic traits granting the strain RCAM1026 increased affinity to the line P61. In order to determine the exact genomic composition of the RCAM1026 it was sequenced using the MiniON sequencing platform. Using 5'MACE RNAseq the gene expression levels in the developed nodules of line P61 inoculated with the effective RCAM1026 and the ineffective 3841 strains were compared.

The transcriptome profiles of effective and ineffective nodules varied drastically, with RCAM1026 showing higher levels of up-regulated genes when interacting with the mutant. Thus, we determined the set of unique genetic features probably involved in the process of mutant phenotype suppression.

The work was supported by RFBR grant 18-34-00844 and RFS grant 17-76- 30016.

Искусственные ассоциации растений и микроорганизмов

Баймиев Ал.Х., Вершинина З.Р., Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Садыкова Л.Р.

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

E-mail: baymiev@mail.ru

Перспективным направлением развития экологически ориентированного сельского хозяйства, является разработка и использование биоудобрений на основе штаммов PGPR-микроорганизмов с синтезом новых или искусственным увеличением продукции полезных для растений веществ. Однако, процессы синтеза всегда связаны с большими затратами энергии и поэтому бактерии-суперпродуценты эффективны только в промышленных условиях и быстро элиминируются из почвы в условиях конкуренции со стороны диких штаммов бактерий. Выходом из данной ситуации может оказаться применение регулируемого включения целевых (своих или искусственно введенных) генов ризобактерий, экспрессия которых будет индуцироваться веществами, выделяемыми корнями растений, например, так, как это происходит с генами вирулентности и клубенькообразования у агробактерий и ризобий, соответственно. В этом случае целевые гены включатся только в богатой питательными веществами зоне, непосредственно прилегающей к корням, что, кроме прочего, будет способствовать эффективной утилизации «полезных» микробных метаболитов растениями.

Стратегия индуцируемого включения целевых генов PGPR-микроорганизмов в ризосфере растений вкуче с разработанным нами ранее 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.

Artificial associations of plants and microorganisms

Baymiev Al.Kh., Vershina Z.R., Lavina A.M., Khakimova L.R., Sadykova L.R.

Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, Ufa, Russia

One of the most perspective directions of ecologically oriented agriculture is the development and use of bio-fertilizers based on PGPR strains (PGPR - plant growth promoting rhizobacteria). These strains produce increased amounts of new or already known substances that are beneficial for plants. However, the synthesis is always associated with high energy consumption and therefore Superproducer bacteria are effective only in industrial settings and are rapidly eliminated from the soil by wild strains of bacteria. Adjustable inclusion of the target genes by the substances, secreted in the plant roots, can be the potential way of solving this problem, as is the case with the virulence and nodulation genes in *Agrobacterium* and *Rhizobium*, respectively. In this case, the target genes activated only in the nutrient-rich plant rhizosphere, would be facilitate efficient utilization of "useful" microbial metabolites by plants. The proposed strategy of activation of PGPR genes by plant exudates in the rhizosphere of plants can be successfully used to create stable and effective associations between of non-symbiotic economically important plants with microorganisms, carrying enhanced and controlled growth promoting and/or nitrogen-fixing activity.

Горизонтальный перенос генов и нетипичные клубеньковые бактерии

Баймиев Ан.Х., Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Баймиев Ал.Х.

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

E-mail: baymiev@anrb.ru

Ризобии – симбионты бобовых растений - имеют две формы существования, первая -сапрофитная, в которой микроорганизмы являются свободноживущими почвенными микроорганизмами, и вторая - симбиотическая, в которой бактерии клонально размножаются в клубеньках растений. Для успешного симбиотического взаимодействия клубеньковые бактерии в составе генома должны содержать симбиотические гены, продукты которых участвуют в различных стадиях взаимоотношения бактерии и растения.

В сапрофитном состоянии бактерий симбиотические гены являются своего рода генетическим «балластом», потеря которых лишь увеличивает конкурентоспособность бактериальных клеток. Напротив, для образования симбиоза наличие их является обязательным условием. Поэтому для клубеньковых бактерий характерно постоянное потеря/приобретение симбиотических генов, Постоянные процессы потери и приобретения *sym*-генов, сопряженные с «инфекцией и освобождением» (ИО-циклы), требуют от клубеньковых бактерий высокой активности горизонтального переноса генов, что, в свою очередь, является одной из причин высокого полиморфизма популяций данных микроорганизмов.

Высокая активность горизонтального переноса симбиотических генов зачастую приводит к появлению нетипичных клубеньковых бактерий - ризобий с измененной специфичностью. В некоторых случаях микроорганизмы, не относящиеся к группе клубеньковых бактерий, приобретают свойства к образованию клубеньков на корнях бобовых растений. В работе рассмотрены причины появления подобных бактерий, их стабильность и возможные функции в системе симбиотической азотфиксации. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-44-020201 p_a.

Horizontal gene transfer and atypical nodule bacteria

Baimiev An.K., Gumenko R.S., Vladimirova A.A., Baimiev Al.K.

Institute of Biochemistry and Genetics IBG UFRC RAS, Ufa, Russia

Rizobia is symbionts of leguminous plants. They have two forms of existence, the first is the saprophytic, in which microorganisms are free-living soil microorganisms, and the second is symbiotic, in which bacteria clonally reproduce in plant nodules. For successful symbiotic interaction, nodule bacteria in the genome should contain symbiotic genes, the products of which are involved in various stages of the relationship between bacteria and plants.

In the saprophytic state of bacteria, symbiotic genes are a kind of genetic "ballast", the loss of which only increases the competitiveness of bacterial cells. On the contrary, for the formation of a symbiosis, their presence is necessary condition. Therefore, the constant loss/acquisition of symbiotic genes is typical for nodule bacteria. The constant processes of loss and acquisition of *sym*-genes associated with "infection and release" (IR-cycles) require a high activity of horizontal transfer genes the nodule bacteria. It is one of the reasons for the high polymorphism of populations of these microorganisms.

The high activity of horizontal transfer of symbiotic genes often leads to the appearance of atypical nodule bacteria - rhizobia with a changed specificity. In some cases, microorganisms that do not belong to the group of nodule bacteria acquire properties for the formation of nodules on the roots of leguminous plants. The reasons for the appearance of such bacteria, their stability and possible functions in the system of symbiotic nitrogen fixation are considered in this work. The work was supported by the grant of the Russian Foundation for Basic Research №17-44-020201 p_a.

Биологический метод снижения заболеваемости культур семейства Пасленовых альтернариозом

Баубекова Д.Г.

Астраханский государственный технический университет, Астрахань, Россия

E-mail: suslig.zenia@mail.ru

Альтернариозы – это заболевания сельскохозяйственных культур, вызываемые фитопатогенными микромицетами рода *Alternaria*. Альтернариозы поражают многие сельскохозяйственные культуры и проявляются в виде пятнистостей, гнилей и налетов. Вредоносность этих заболеваний обусловлена снижением фотосинтетической поверхности листьев, плесневением плодов и семян, уменьшением урожая и загрязнением сельскохозяйственной продукции микотоксинами и аллергенами. Целью исследования являлось изучение влияния лабораторного образца биофунгицида на основе *Bacillus* sp. на снижение заболеваемости культур семейства Пасленовых альтернариозом. Для достижения поставленной в работе цели проведен ряд лабораторных и полевых исследований. В лабораторных экспериментах исследована миколитическая активность лабораторного образца по отношению к тест-объектам фитопатогенных микромицетов рода *Alternaria*. В полевых условиях изучено влияние лабораторного образца на зараженность томатов сорта «Подарочный» фитопатогенными микромицетами в открытом грунте. 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 фунгицидной активности по отношению к фитопатогенным микромицетам рода *Alternaria*. Зона ингибирования роста микромицетов в проведенном эксперименте составляла 21–33 мм. Исследуемый лабораторный образец оказывает миколитическое действие на микромицеты рода *Alternaria*. При исследовании миколитической активности образца определено, что мицелий микромицетов набухает и ослизняется, данное воздействие усиливается в последующие время экспозиции. В ходе месячной инкубации мицелий распадается на волокна, формирующийся мицелий отличался выраженными морфологическими видоизменениями. В контроле мицелий визуально не изменяется и его видоизменения не наблюдались. Использование исследуемого лабораторного образца в полевых экспериментах на томате сдерживало развитие альтернариоза на протяжении всего периода эксперимента. Наиболее высокий показатель биологической эффективности применения изучаемого образца биофунгицида против альтернариоза (72,4 %) наблюдался во время цветения 2-й кисти. Применение образца повысило урожайность на 27,5 % по отношению к контролю, при этом содержание больных плодов значительно снизилось (до 1,1 %).

Biological method of reducing the mobility of Solanaceae of alternariosis

Baubekova D.G.

FSEI HE «Astrakhan State Technical University», Astrakhan, Russia

Alternaria are diseases of agricultural crops caused by phytopathogenic micromycetes of the genus *Alternaria*. Alternariosis affect many crops and are manifested in the form of patches, rot and raids. The harmfulness of these diseases is caused by a decrease in the photosynthetic surface of the leaves, molding of fruits and seeds, a decrease in yield and contamination of agricultural products with mycotoxins and allergens. The aim of the study was to study the effect of a laboratory sample of a biofungicide based on *Bacillus* sp. on the reduction in the incidence of cultures of the Solanaceae by alternariosis. To achieve the goal set in the work a number of laboratory and field studies were carried out. In laboratory experiments the mycolic activity of a laboratory sample was studied with respect to test objects of phytopathogenic micromycetes of the genus *Alternaria*. In the field, the effect of a laboratory sample on the contamination of tomato with phytopathogenic micromycetes in the open field was studied. The germinated shoots were sprayed with a laboratory sample prior to planting into the open ground. The first strait under the root of the plants was carried out in the budding phase, the second strait was during flowering. Vegetation experience lasted 5 months. As a result of preliminary studies, the test laboratory sample showed a pronounced fungicidal activity with respect to the phytopathogenic micromycetes of the genus *Alternaria*. The zone of inhibition of growth of micromycetes in the experiment was 21-33 mm. The test laboratory sample has a mycotic effect on the micromycetes of the genus *Alternaria*. In the study of the mycoliotic activity of the sample, it was determined that the mycelium of micromycetes swells and becomes mucilaginous, this effect is enhanced in the subsequent exposure time. During a month incubation, the mycelium disintegrates into fibers, the forming mycelium differed by pronounced morphological modifications. In control, the mycelium does not visually change and its modification has not been observed. The use of the tested laboratory sample in field experiments on tomato inhibited the development of alternaria throughout the entire experiment. The highest indicator of the biological effectiveness of the study of the biofungicide sample against alternariosis (72.4 %) was observed during flowering of the 2nd brush. Application of the sample increased the yield by 27.5 % in relation to the control, while the content of diseased fruit significantly decreased (1.1 %).

Полезные свойства аборигенных штаммов микроорганизмов чернозема выщелоченного

Безлер Н.В., Колесникова М.В., Черепухина И.В., Петюренко М.Ю., Сумская М.А., Кислинская Е.Г.
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»,
Воронеж, Россия
E-mail: bezler@list.ru

В последние десятилетия на территории Центрального Черноземного региона наблюдается значительное повышение суммы эффективных температур. При этом увеличилось количество лет с пониженным количеством осадков. В результате в регионе участились засухи. Одновременно в почве отмечено закономерное снижение численности основных таксономических, эколого-трофических и физиологических групп микроорганизмов. Наблюдения за состоянием микробного сообщества почвы в зернопаропропашном севообороте в агроценозе сахарной свеклы показали, что использование пестицидов подавляет развитие микроорганизмов, принимающих участие в круговороте азота, формировании эффективного и потенциального плодородия. В почве в естественных условиях развиваются эффективные микроорганизмы, которые способны при увеличении их численности восстанавливать закономерный ход почвообразовательных процессов. Учитывая это, в лаборатории эколого-микробиологических исследований почвы ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова собрана коллекция эффективных микроорганизмов. Прежде всего, это целлюлозолитические микромицеты, diaзотрофы рода *Azotobacter*, представители рода *Pseudomonas* и *Azospirillum*, антагонисты фитопатогенов рода *Bacillus* и др. Наиболее изучен целлюлозолитический микромицет *Humicola fuscoatra*, который находится на патентном депонировании в ВКПМ ФГУП ГосНИИ Генетики с индексом *Humicola fuscoatra* ВНИИСС 016. Запашка соломы зерновых культур совместно с этим микромицетом увеличивает численность diaзотрофов, аммонификаторов, нитрификаторов и фосфобактерий в почве. Создана коллекция diaзотрофов, в которую входят свободноживущие diaзотрофы видов *Azotobacter chroococcum* и *Pseudomonas fluorescens*, родов *Pseudomonas* и *Azospirillum*. В формировании фосфорного фонда почвы принимают участие фосфобактерии, которые трансформируют органофосфаты и трех замещенный фосфат кальция до ортофосфорной кислоты. Значительный интерес представляют естественные почвенные антагонисты фитопатогенов видов *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, которые подавляют у растений развитие болезней грибной этиологии. Таким образом, пополняя микробное сообщество почвы эффективными микроорганизмами можно восстанавливать его функции и способность к саморегулированию в агроценозах.

Useful properties of indigenous strains of microorganisms in leached black earth

Bezler N.V., Kolesnikova M.V., Cherepuhina I.V., Petyurenko M.Yu., Sumsкая M.A., Kislinskaya E.G.
Voronezh Federal State Budgetary Scientific Institution "The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar", Voronezh, Russia

Last decades, substantial increase in sum of effective temperatures is observed in territory of the Central Black-Earth region. In addition, years with the lowered rainfall has increased in number. As a result, droughts have become frequent in the region. At the same time, appropriate decrease in the number of basic taxonomic, ecological-trophic and physiological microorganism groups has been noted in soil. Observations of the soil microbial community condition in grain-fallow crop rotation in sugar beet agrocenosis have shown that use of pesticides suppresses development of the micro-organisms taking part in nitrogen cycle and formation of effective and potential fertility. In soil, effective microorganisms are developed under natural conditions. When increased in number, they are able to restore a natural course of soil formation processes. Taking this into account, collection of efficient microorganisms has been established by the laboratory of soil ecological-microbiological studies, the A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar. First of all, they are cellulolytic micromycete, nitrogen-fixing microorganisms of the *Azotobacter* genus, representatives of the *Pseudomonas* and *Azospirillum* genera, phytopathogen antagonists of the *Bacillus* genus, etc. Strains *Humicola fuscoatra* are deposited to All-Russian collection of industrial microorganisms on patent deposit with the index *Humicola fuscoatra* VNIISS 016. Plowing straw of grain-crops in soil together with this micromycete increases numbers of nitrogen-fixing microorganisms, ammonifiers, nitrifiers and phosphobacteria in soil. The collection of nitrogen-fixing microorganisms that includes free living nitrogen-fixing microorganisms of the *Azotobacter chroococcum* and *Pseudomonas fluorescens* genera, and the *Pseudomonas* and *Azospirillum* species has been created. The phosphobacteria that transform organophosphates and calcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) into orthophosphoric acid take part in formation of soil phosphoric reserve. Natural soil phytopathogen antagonists of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus mesentericus* species suppressing development of fungi etiology diseases in plants are of great interest. Thus, by replenishing microbial community of soil with effective microorganisms, it is possible to restore its functions and self-regulation ability in agrocenoses.

Перспективы метаболической инженерии представителей рода *Lavandula* L.

Белова М.М., Чередниченко М.Ю.

ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

E-mail: belova.pavla2015@yandex.ru

Существует большой интерес к повышению качества и «урожайности» эфирных масел лаванды. Для генетического подхода к пониманию регулирования моно- и сесквитерпенового синтеза *Lavandula angustifolia* Lane et al. (2010) были созданы две библиотеки кДНК из цветков и листьев и получена информация о последовательностях около 15 000 EST. Авторы подтвердили, что экспрессия генов, ответственных за биосинтез эфирного масла, практически ограничивается железистыми трихомами, которые преимущественно используют MEP-путь для производства компонентов эфирных масел. Munõz-Bertomeu et al. (2006) использовали ген DSX *Arabidopsis thaliana* под контролем конститутивного промотора CaMV 35S и обнаружили, что гиперэкспрессия DSX усиливает синтез масла в растениях *Lavandula latifolia*. В последующей работе Munõz-Bertomeu et al. (2007) исследовали возможный вклад MVA-пути в биосинтез эфирных масел лаванды. Были созданы трансгенные растения *L. latifolia* с геном HMG1 кДНК резуховидки Таля, кодирующим HMGR1S, ключевой фермент, участвующий в первом этапе MVA-пути. Результаты показали, что сверхэкспрессия HMGR1S повышает выход эфирного масла (в частности, сесквитерпенов) и стероидов, что подтверждает вовлечение MVA-пути в биосинтез этих соединений. Результаты Lane et al. (2010) указывают на то, что синтез предшественников может играть небольшую роль в биосинтезе сесквитерпенов, что оправдывает очень малую долю сесквитерпенов в эфирном масле лаванды.

Получение трансгенных растений с гиперэкспрессией монотерпеновых синтаз также является подходом метаболической инженерии, доступным для модификации состава и увеличения выхода эфирного масла в ароматических видах лаванды. Munõz-Bertomeu et al. (2008) трансформировали *L. latifolia* геном MsLS *Mentha spicata*, который преобразует геранилдифосфат в лимонен, при регулировании CaMV 35S. Авторы обнаружили количественные и качественные изменения в профилях терпеноидов, в частности, повышенное количество лимонена, у трансгенных растений с гиперэкспрессией гена MsLS.

Метаболическая инженерия может быть также применена для модификации производства других вторичных метаболитов, не только главных компонентов масла, продуцируемых лавандой.

Perspectives of metabolic engineering of the genus *Lavandula* L. representatives

Belova M.M., Cherednichenko M.Yu.

FSBEI HE Russian Timirjazev State Agrarian University, Moscow, Russia

There is a great interest in improving the quality and "yield" of lavender essential oils. Two cDNA libraries were created Lane et al. (2010) from flowers and leaves and information was obtained on the sequences of about 15,000 EST for a genetic approach to understand the regulation of *Lavandula angustifolia* mono- and sesquiterpene synthesis. The authors confirmed that the expression of genes responsible for the biosynthesis of essential oil is practically limited to glandular trichomes, which predominantly use the MEP pathway for the production of essential oils components. Munõz-Bertomeu et al. (2006) used the *Arabidopsis thaliana* DSX gene under the control of the constitutive promoter CaMV 35S and found that the overexpression of DSX enhances oil synthesis in the *Lavandula latifolia* plants.

In the subsequent work Munõz-Bertomeu et al. (2007) investigated the possible contribution of the MVA pathway in the biosynthesis of lavender essential oils. The transgenic plants of *L. latifolia* were created with the *A. thaliana* HMG1 gene that encoding HMGR1S, the key enzyme involved in the first phase of the MVA pathway. The results showed that HMGR1S overexpression increases the yield of essential oil (in particular, sesquiterpenes) and sterols. It confirms the involvement of the MVA pathway in the biosynthesis of these compounds. The results of Lane et al. (2010) indicate that synthesis of precursors can play a small role in the biosynthesis of sesquiterpenes, which justifies its very small fraction in lavender essential oil.

The production of transgenic plants with the overexpression of monoterpene synthases is a metabolic engineering approach available to modify the composition and increase the yield of the essential oil in aromatic lavender species. Munõz-Bertomeu et al. (2008) transformed *L. latifolia* with the *Mentha spicata* MsLS gene, which converts geranyldiphosphate to limonene, by regulating the CaMV 35S. The authors found quantitative and qualitative changes in the profiles of terpenoids, in particular, an increased amount of limonene, in transgenic plants with overexpression of the MsLS gene.

Metabolic engineering can also be used to modify the production of other secondary metabolites, not only the major components of lavender oil.

Влияние биопрепаратов ризобактерий на устойчивость к фитопатогенам и товарные качества картофеля при различных уровнях минерального питания

¹Береговая Ю.В., ¹Кротиков А.А., ²Шапкин В.М., ²Белимов А.А.

¹Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина, Орел, Россия

²ФГБНУ Всероссийский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: juliemons@yandex.ru

Потери урожая картофеля от заболеваний составляют от 10 до 25%, а в годы эпифитотий могут достигать 80%. В решении данной проблемы важнейшая роль отводится разработке инновационных технологий возделывания культуры, направленных на повышение урожайности и товарных качеств продукции. Использование биологических препаратов является одним из перспективных приемов стимуляции иммунной системы растений и борьбы с патогенными микроорганизмами.

Объектом исследований являлся сорт картофеля Гала, районированный по 3 региону, селекции NORIKA GMBH. В условиях производственного опыта 2017 года изучалось влияние биопрепаратов на основе штаммов ростстимулирующих ризосферных бактерий *Pseudomonas fluorescens* SPB2137, *Sphingomonas* sp. K1B и *Arthrobacter myosorens* 7 (биопрепарат Мизорин) на устойчивость к фитопатогенам и товарные качества картофеля в зависимости от дозы применения жидкого азотного удобрения КАС-32 (270, 200 и 160 л/га). В вариантах с использованием биопрепаратов дозы протравителей Престиж и Максим были снижены в два раза по сравнению с контролем, где данные фунгициды применялись согласно установленному регламенту (3 и 1,2 л/га, соответственно). Штамм *Ps. fluorescens* SPB2137 и Мизорин способствовали снижению заболеваемости растений, и их эффективность варьировала в зависимости от возбудителя болезни и минерального фона. Наиболее эффективными данные биопрепараты были против фитофтороза. Максимальный биологический эффект обеспечил штамм *Ps. fluorescens* SPB2137, позволивший уменьшить процент пораженных фитофторой растений в среднем в 3,5 раза по сравнению с контролем. Мизорин в большей степени повысил устойчивость картофеля к альтернариозу, уменьшив количество пораженных растений на 16%. Как правило, при внесении высоких доз удобрения КАС-32 растения были менее подвержены заболеваниям. Также благодаря использованию биопрепаратов улучшились товарные качества клубней картофеля. Наибольший хозяйственный эффект оказал штамм *Ps. fluorescens* SPB2137 при максимальном уровне азотного питания растений, который уменьшил количество нестандартных клубней в 2 раза относительно контроля.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 17-76-10039).

Influence of biopreparations of rhizobacteria on resistance to phytopathogens and commercial qualities of potato at various mineral nutrition levels

¹Beregovaya Yu.V., ¹Krotikov A.A., ²Shapkin V.M., ²Belimov A.A.

¹Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhin, Orel, Russia

²All-Russian Institute of Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia

Potato yield losses caused by diseases range from 10% to 25%, and in the epiphytoty years they can reach 80% (Safenkova et al., 2014). For solving this problem, the development of innovative cultivation technologies aimed at increasing the yield and improving commercial quality of products are the most important. The use of biological preparations is one of the promising methods for stimulating the immune system of plants and fighting pathogenic microorganisms.

The object of the research was the potato variety Gala, selected by the NORIKA GMBH and regionally distributed in the 3-rd region. Under the conditions of a field experiment in 2017, the influence of biological preparations based on plant growth-promoting rhizosphere bacteria *Pseudomonas fluorescens* SPB2137, *Sphingomonas* sp. K1B and *Arthrobacter myosorens* 7 (commercial biopreparation Mizorin) on the resistance to phytopathogens and commercial quality of potato depending on the dose of applied liquid nitrogen fertilizer KAS-32 (270, 200 and 160 l / ha) was studied. In all inoculation treatments the doses of fungicides Prestige and Maxim were reduced by a half as compared to the control. Strain *Ps. fluorescens* SPB2137 and Mizorin contributed to a decrease in the incidence of plants, and their effectiveness varied depending on the causative disease agent and mineral background. The biopreparations were the most effective against late blight. The maximum biological effect was provided by the strain *Ps. fluorescens* SPB2137, which reduced the percentage of plants affected by phytophthora by an average of 3,5 times in comparison with the control. Mizorin increased the resistance of potatoes to an alternaria, reducing the number of affected plants by 16%. As a rule, when applying high doses of fertilizer KAS-32, the plants were less susceptible to diseases. The commercial quality of potato tubers was improved after application of biopreparations. The greatest economic effect was obtained by the strain *Ps. fluorescens* SPB2137 at a high level of the plant nitrogen nutrition leading to the reduction in the number of non-standard tubers by 2 times with respect to control.

The work is supported by the Russian Science Foundation (project № 17-76-10039).

**Продуктивность и стрессоустойчивость трансгенных растений табака
с конститутивной экспрессией гена *ARGOS-LIKE***

¹Бережнева З.А., ¹Князев А.В., ¹Михайлова Е.В., ²Ермошин А.А., ¹Кулуев Б.Р.

¹Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

²Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

E-mail: berezhneva-z@yandex.ru

Размеры органов растений контролируются двумя основными механизмами – регуляцией клеточного деления и клеточного растяжения, которые тесно связаны через различные сигнальные молекулы. Растяжение клеточных стенок находится под контролем большой группы генов, в том числе, кодирующих экспансины и ксилоглюканэндотрансгликозилазы, которые участвуют в разрыве связей между целлюлозными микрофибриллами и связующими гликанами. Ген *ARGOS-LIKE (ARL)*, выделенный из *A. thaliana*, также кодирует белковый фактор, контролирующий клеточное растяжение. Экспрессия данного гена стимулируется ауксинами, цитокининами и брассиностероидами, и его сверхэкспрессия стимулирует увеличение белкового продукта гена *TCH4*, кодирующий одну из ксилоглюканэндотрансгликозилаз.

Однако, в естественных условиях произрастания, растения никогда не находятся в оптимальных условиях влияния внешней среды, и постоянно испытывают действие стрессовых факторов разной силы и продолжительности. Роль гена *ARGOS-LIKE* в регуляции и обеспечении роста растений при действии таких стрессовых факторов как засуха, засоление и гипотермия остается малоизученной. Поэтому, с целью изучения продуктивности и стрессоустойчивости растений, нами были получены трансгенные растения табака с конститутивной экспрессией гена *ARGOS-LIKE A. thaliana*. Трансгенные растения характеризовались увеличением размеров листьев и стебля по сравнению с контрольными растениями табака, при этом конститутивная экспрессия данного гена оказывала влияние в большей степени на клеточное растяжение. Результаты нашего исследования показывают, что при помощи гена *ARGOS-LIKE A. thaliana* могут быть получены трансгенные растения с увеличенными размерами органов, что влияет на продуктивность и стрессоустойчивость растений. Например, данный ген может быть использован для увеличения длины стебля, корней и величины листьев, что может иметь практическое значение для повышения продуктивности растений при длительном действии стрессовых факторов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-04-00118.

**Productivity and stress resistance of transgenic tobacco plants with constitutive expression
of the *ARGOS-LIKE* gene**

¹Berezhneva Z.A., ¹Knyazev A.V., ¹Mikhaylova E.V., ²Ermoshin A.A., ¹Kuluev B.R.

¹Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, Ufa, Russia

²Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia

The sizes of plant organs are controlled by two basic mechanisms - the regulation of cell division and cell expansion, which are closely related through various signaling molecules. The expansion of the cell wall is under the control of a large group of genes, including those that encode expansins and xyloglucanendotransglycosylases, which participate in breaking of the bonds between cellulose microfibrils and binding glycans.

The *ARGOS-LIKE* gene (*ARL*), isolated from *A. thaliana*, also encodes a protein factor that controls cell expansion. Expression of this gene is stimulated by auxins, cytokinins and brassinosteroids, and its overexpression stimulates an increase in the protein product of the *TCH4* gene, encoding one of the xyloglucanendotransglycosylases.

However, in nature plants are not under optimal environmental conditions, and are constantly exposed to stress factors of various strength and duration. The role of the *ARGOS-LIKE* gene in regulating and promoting plant growth under such stress factors as drought, salinity and hypothermia remains poorly understood. Therefore, in order to study the productivity and stress tolerance of plants, we have obtained transgenic tobacco plants with constitutive expression of the *ARGOS-LIKE A. thaliana* gene. Transgenic plants were characterized by an increase in the size of leaves and stem compared to control plants of tobacco. The results of our study show that transgenic plants with increased size of organs can be obtained using *ARGOS-LIKE* gene of *A. thaliana*. It affects the productivity and stress tolerance of plants. For example, this gene can be used to increase the length of the stem, the roots and the size of the leaves, which can be of practical importance for increasing the productivity of plants with prolonged action of stress factors.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-04-00118.

Современные подходы к поиску метаболитов грибов для борьбы с вредными членистоногими

Берестецкий А.О.

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru

Биорациональные инсектициды (например, авермектины, неоникотиноиды и пиретроиды), являющиеся аналогами природных соединений, получили широкое применение в сельском хозяйстве. Однако в связи с появлением популяций вредных насекомых, резистентных к этим и другим инсектицидам, необходим поиск новых веществ для создания препаратов для борьбы с ними. В докладе будут рассмотрены современные подходы (экологические, геномные, метаболомные, биотехнологические), которые являются перспективными для поиска новых инсектицидных соединений, образуемых микромицетами. Несмотря на широкий набор вторичных метаболитов, выделенных из культур энтомопатогенных грибов, их инсектицидная активность и роль в патогенезе в большинстве случаев не доказаны; почвенные, эндофитные и фитопатогенные микромицеты, а также макромицеты могут служить источником поиска инсектицидных соединений; геномные методы полезны для предсказания образования грибами групп метаболитов *in silico*, но требуют верификации; биотехнологические и метаболомные подходы могут быть использованы для стимуляции и анализа образования грибами новых биологически активных веществ, в том числе, с инсектицидными свойствами. Исследование поддержано РФФИ (проект № 17-04-01445).

Modern approaches in searching fungal metabolites for control of insect pests

Berestetskiy A.O.

All-Russian Institute of Plant Protection, Saint-Petersburg, Russia

Biorational insecticides (for instance, avermectines, neonicotinoids, and pyrethroids) being analogues of natural compounds are widely used in agricultural practice. However with increasing resistance of pests to these and other conventional insecticides the development new biorationals is an actual problem. In the present review, different modern approaches (ecological, genomic, metabolomics and biotechnological) in mining new insecticidal molecules with insecticidal activity produced by fungi are discussed. Despite of isolation of huge number of metabolites from cultures of entomopathogenic fungi, the insecticidal activity was demonstrated just for several compounds; soil, endophytic, phytopathogenic fungi as well as macromycetes is an underexplored source for insecticidal substances; genomic methods are useful to predict *in silico* production of groups of metabolites by a particular fungus with a sequenced genome but the results require the verification; biotechnological and metabolomics approaches can be used for stimulation and analysis of production of fungal metabolites including compounds possessing insecticidal activity. The research is supported by RFBR (project N 17-04-01445).

Изучение функциональной роли $\Delta 9$ -десатуразы в зависимости от внутриклеточной локализации в растительной клетке с использованием транзientной экспрессии

Берестовой М.А., Павленко О.С., Тюрин А.А., Сидоров Р.А., Голденкова-Павлова И.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

E-mail: m.berestovoy1181@gmail.com

Клеточная локализация белков у всех живых организмов тесно взаимосвязана с их функциями. Получение экспериментальных данных о взаимосвязи локализации белка и его функциональной эффективности, может оказать неоценимую помощь в понимании регуляции ключевых биологических процессов на клеточном уровне. На сегодняшний день имеется недостаточно данных том, как локализация $\Delta 9$ -десатуразы в различных компартментах растительной клетки взаимосвязана с ее функциональной эффективностью, а именно, с процессом модуляции ненасыщенности жирных кислот (ЖК) мембранных липидов растений. Для прояснения этого вопроса, мы попытались оценить как состав и массовая доля ЖК изменяется при экспрессии десатуразы в разных компартментах растительной клетки. Используя унифицированные экспрессионные вектора для транзientной экспрессии в растениях, несущие последовательности нативного и рекомбинантного гена $\Delta 9$ -десатуразы и лидерные последовательности для разной локализации его белкового продукта в цитоплазме, хлоропластах и ЭР нами (1) доказано, что лидерные последовательности обеспечивают корректную локализацию белкового продукта рекомбинантного гена в соответствующих компартментах растительной клетки: в хлоропластах, в ЭР и в цитоплазме; (2) убедительно продемонстрирована региоспецифичность гетерологичной $\Delta 9$ -десатуразы в зависимости от ее локализации в растительной клетке; (3) оценен вклад $\Delta 9$ -десатуразы в состав и массовую долю насыщенных и ненасыщенных ЖК суммарных липидов, и установлено, что эти показатели при разной локализации $\Delta 9$ -десатуразы в растительной клетке различаются; (4) показано, что метод транзientной экспрессии может быть применен для изучения вклада десатураз в модуляцию жирнокислотного состава мембранных липидов растений; (5) предложена удобная, быстрая и надежная система транзientной экспрессии генов, перспективная для характеристики сигнальных последовательностей и оценки локализации целевых белков в растительной клетке, протокол которой включает агроинфильтрацию с последующим получением протопластов из агроинфильтрированных участков листьев. Таким образом, получены приоритетные результаты о составе и массовой доли ЖК, в зависимости от локализации гетерологичной $\Delta 9$ -десатуразы в растительной клетке.

Transient gene expression in the study of the functional role of $\Delta 9$ -desaturase for various intracellular localization in the plant cell

Berestovoy M.A., Pavlenko O.S., Tyurin A.A., Sidorov R.A., Goldenkova-Pavlova I.V.

Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Cellular protein localization in all living organisms closely correlated with their functions. Obtaining experimental data on the relationship between protein localization and its functional efficiency can help in understanding the regulation of crucial biological processes at the cellular level. To date, there is insufficient data on how the localization of $\Delta 9$ -desaturase, in various plant cell compartments, is interrelated with its functional efficiency, in particular, with the modulation of fatty acids (FA) unsaturation of plant membrane lipids.

To clarify this issue, we carried out a comparative study of estimation changes in FA composition and mass fraction when desaturase expressed in different compartments of the plant cell. Also, how amount and content of FA, depends on the localization of desaturase. We used unified expression vectors for transient expression in plants, carrying the sequences of the native and recombinant $\Delta 9$ -desaturase gene and leader sequences for different localization of its protein product in the cytoplasm, chloroplasts, and ER.

We have proved that the leader sequences ensure the correct localization of the protein product of the recombinant gene in the corresponding the plant cell compartments: in chloroplasts in ER and the cytoplasm. The results obtained that the regiospecificity of heterologous $\Delta 9$ -desaturase convincingly demonstrated dependence on its localization in the plant cell. We estimated the contribution of $\Delta 9$ -desaturase to the composition and the mass fraction of saturated and unsaturated FAs in different membrane fractions, and value of these indices differ from each other. We showed that the method of transient expression could be used to study the contribution of desaturases to the modulation of the fatty acid composition of membrane plant lipids. The proposed system of transient gene expression is convenient, fast and reliable. The system is promising for the characterization of signal sequences and estimation the location of target proteins in the plant cell. The protocol of the system includes agroinfiltration followed by the extraction of protoplasts from agroinfiltrated leaf areas.

Thus, we obtained priority results on the composition and mass fraction of the FA, depending on the localization of heterologous $\Delta 9$ -desaturase in the plant cell.

Начальные этапы клонального микроразмножения цитрусовых башкирской селекции

^{1,2}Билалова Э.Г., ¹Садыкова Ф.В., ²Ишмуратова М.М.

¹ГБПОУ «Уфимский лесотехнический техникум», Уфа, Россия

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа, Россия

E-mail: bilalova77@mail.ru

В теплице круглогодичного действия учебно-опытного хозяйства ГБПОУ «Уфимского лесотехнического техникума» (Уфимский лимонарий) выращиваются созданные здесь сорта лимона Урман, Салават, Лейсан и сорта цитрона Уралтау и Зиля, внесенные Госсортомиссией Российской Федерации в Госреестр. Эти сорта являются клонами сорта лимона Юбилейный. Оригинатором сортов является Ф.В. Садыкова. Собран большой фактический материал по особенностям биологии выращивания перечисленных сортов в условиях закрытого грунта. Начаты исследования по клональному микроразмножению *in vitro* этих сортов.

Цель работы - разработка протоколов клонального микроразмножения *in vitro* цитрусовых башкирской селекции. Объектами исследования являлись лимон - сорта Лейсан и Салават, а также цитрон - сорта Уралтау. Для введения в культуру *in vitro* использовали молодые побеги текущего года вегетации 27-ми летних растений. В качестве эксплантов использовали сегменты молодых побегов (узлы) размером 5-6 мм и семена из плодов разной степени зрелости. Дробная стерилизация растительного материала включала: промывку в мыльном растворе; обработку 1,0-% р-ром «бриллиант» с экспозицией 5-10 мин.; обработку 0,1-% р-ром диацида с экспозицией 25 мин.; обработку 0,05-% р-ром хлоргексидина с экспозицией 15 мин. После каждого этапа стерилизации экспланты трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Перед посадкой на питательную среду экспланты обрабатывали 10,0-% стерильным р-ром аскорбиновой кислоты в течение 5 мин. В некоторых вариантах опыта для стерилизации эксплантов использовали р-р «доместоса» и 96,0-% р-р этанола (экспозиция 10 – 30 с). В качестве питательной среды использовали модифицированную питательную среду Мурасиге-Скуга с гормональными добавками БАП и НУК в различных концентрациях (0,1 – 1,0 мг/л), рН 5,5-5,8 с добавлением 10 г/л агара, 25 г/л сахарозы. К настоящему времени отработаны этапы стерилизации эксплантов. Эффективным оказалось использование р-ра «бриллиант» с последующим применением р-ра этанола. Проведены сравнительные исследования развития эксплантов, роста и развития растений в условиях *in vitro*, изучено влияние трофических и гормональных факторов питательной среды на процессы мультпликации побегов. Исследованные сорта лимона и цитрона при культивировании в условиях *in vitro* сохраняют сортоспецифичные признаки (число побегов, число и размеры листьев, размеры корневой системы) и различаются по темпам развития.

Clonal micropropagation of citrus of bashkir selection initiation phases

^{1,2}Bilalova E.G., ¹Sadykova F.V., ²Ishmuratova M.M.

¹Ufa Forestry Technical School, Ufa, Russia

²Bashkir State University, Ufa, Russia

In all-year activity greenhouse of scientific-experimental farm of the "Ufa Forestry Technical College" (Ufa lemonarium) there are under cultivation the developed here and put into the State Register by the State Committee of the Russian Federation such lemon cultivars as Uрман, Salavat and Leysan and such citron cultivars as Uралтау and Zilya. Such cultivars are clones of the lemon cultivar Jubilee. The originator of cultivars is F.V. Sadykova. Many factual materials about cultivation particularities of mentioned cultivars in nursery conditions were collected. Investigations of clonal micropropagation *in vitro* of such cultivars were started. Work objective: development of clonal micropropagation protocols *in vitro* of the Bashkir selection citrus. The subjects of the study were lemon-varieties Leysan and Salavat, as well as citron - the variety of Uралтау. For introduction into culture *in vitro*, young shoots of the current year of vegetation of 27 summer plants were used. Segments of young shoots (knots) of 5-6 mm in size and seeds from fruits of different degree of maturity were used as explants. Fractional sterilization of plant material included: washing in soapy water; treatment with 1,0-% r-rum "diamond" with an exposure of 5-10 minutes; treatment with 0.1% r-ri of diacid with an exposure of 25 min.; treatment with 0.05% r-chlorhexidine with an exposure of 15 min. After each sterilization step, the explants were washed three times with sterile distilled water. Before planting on the nutrient medium, the explants were treated with 10.0% sterile ascorbic acid for 5 minutes. In some variants of the experiment, the "domestos" solution and 96.0% ethanol solution (exposure 10 - 30 s) were used to sterilize the explants. In the quality of nutriculture medium was used the modified nutriculture medium Murashige-Skuga with hormonal filling agent of BAP and NAA in various concentrations (0.1-1.0 mg / L), pH 5.5-5.8 with 10 g / l of agar, 25 g / l sucrose. To date, the stages of sterilization of explants have been worked out. Effective was the use of r-ra "diamond" followed by the application of ethanol. Comparative studies of the development of explants, growth and development of plants under *in vitro* conditions have been carried out, the influence of trophic and hormonal factors of the nutrient medium on shoot shoots has been studied. The studied varieties of lemon and citron during cultivation under *in vitro* conditions retain varietal characteristics (number of shoots, number and size of leaves, size of the root system) and differ in the rate of development.

Новый штамм *Bacillus subtilis* 26DCryChS с инсектицидной и фунгистатической активностью

Благова Д.К., Максимова Т.И., Сарварова Е.Р., Веселова С.В., Максимов И.В.

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

E-mail: maksimov@ufaras.ru

Получена и охарактеризована новая линия бактерии *Bacillus subtilis* 26DCryChS с интегрированным геном *BtcryIIa* из генома *Bacillus thuringiensis* ВКПМ В-5351, кодирующим инсектотоксичный белок CryIIa. Линия обладала фунгистатичностью по отношению к фитопатогенному грибу *Stagonospora nodorum* Berk. и способностью стимулировать экспрессию маркерных генов системной устойчивости (*Tapr1*, *TaPrx*, *TaPI*, и *TaChiI*) кодирующих патоген-индуцируемые белки (PR-белки) пшеницы, как PR-1 (маркер системной устойчивости), PR-9 (анионная пероксидаза) ингибиторы протеиназ и хитиназу. Интеграция гена *BtcryIIa* в хромосому *B. subtilis* 26Д дополнительно способствовала формированию инсектицидности по отношению к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* Rond. Эти результаты позволяют предложить линию *B. subtilis* 26DCryChS в качестве эффективной основы для создания биопрепаратов, обладающих биоцидной активностью по отношению к вредным организмам и иммуномодулирующей к растениям пшеницы.

The new strain of *Bacillus subtilis* 26DCryChS with combines insecticide and fungistatic activities

Blagova D.K., Maksimova T.I., Sarvarova E.R., Veselova S.V., Maksimov I.V.

Institute of Biochemistry and Genetics of UFRC RAS, Ufa, Russia

The novel strain of *Bacillus subtilis* 26DCryChS that produces the *Bacillus thuringiensis* B-5351 integrative *BtcryIIa* gene encoding CryIIa toxin was described. *B. subtilis* 26DCryChS inhibited growth of wheat pathogen *Stagonospora nodorum* Berk. and stimulated transcriptional activity of wheat genes *Tapr1*, *TaPrx*, *TaPI* and *TaChiI* encoding systemic acquired resistance marker gene PR1, anionic peroxidase PR-9 proteinase inhibitor and chitinase respectively. The toxicity of *B. subtilis* 26DCryChS against greenbug *Schizaphis graminum* Rond. was equivalent to *B. thuringiensis* B-5351. The results make it possible to offer strain *B. subtilis* 26DCryChS as a basis for further development of plant biopreparation against harmful organisms such as pathogens and pests.

Влияние концентрации ИМК на ризогенез растений винограда сорта Победа и Ризамат

¹Бободжанова Х.И., ²Кухарчик Н.В., ¹Хаитов А.Е.

¹Таджикский национальный университет, г. Душанбе, Таджикистан

²РУП "Плодоводства", Самохваловичи, Республика Беларусь

E-mail: bobojankh_7@bk.ru

Представлены данные по оценке влияния концентрации ИМК на ризогенез *in vitro* микропобегов винограда сорта Ризамат и Победа. Для ризогенеза использовали микропобеги длиной 1-2 см, прошедшие период покоя при пониженной положительной температуре. Оценено влияние ИМК (0,5 и 1,5 мг/л; контроль – 0 мг/л) на эффективность ризогенеза. Морфологические характеристики микропобегов фиксировали на 15, 30 и 45 сутки. Процент укоренившихся растений-регенерантов на 15 день развития низкий и составляет 20% на среде без ИМК для обоих исследованных сортов винограда. Значительную часть при этом составляют растения без роста не только корней, но и побегов, процент укорененных растений увеличивается в 45-му дню развития. Подобная закономерность наблюдается и при концентрации ИМК - 0,5 мг/л. Высокий процент неукорененных растений наблюдается в питательной среде без ИМК 66,7% – Ризамат; 73,3% - Победа. Этот показатель снижается к 45-дню развития и составляет 53,3 и 33,3% для сорта Победа и Ризамат соответственно. К 30-му дню развития растения достигают максимального ризогенеза – 93,3 % и 100% для сорта Ризамат и Победа, соответственно, при концентрации ИМК – 1,5 мг/л. Такая ситуация сохраняется и к 45-му дню развития, что определяет оптимальную длительность пассажа ризогенеза и срок пересадки на адаптацию – 30 дней. Морфологические показатели укорененных растений на разных концентрациях ИМК значительно отличаются. Количество корней отличается при всех трех исследованных концентрациях ИМК как для сорта Ризамат, так и для Победы. При этом максимальное их количество отмечается при концентрации 1,5 мг/л. Причем для сорта Ризамат тенденция увеличения количества корней сохраняется и по мере развития растения при всех концентрациях ИМК. Для сорта Победа увеличение количества корней также отмечается к 45 дню при концентрации 1,5 мг/л.

Таким образом, установлено влияние концентрации ИМК на ризогенез и морфологические показатели укорененных растений сортов винограда Ризамат и Победа, а также необходимость подбора индивидуальных концентраций ауксинов и длительности ризогенеза для сортов винограда.

Influence of the concentration of indolyl butyric acid on the rhizogenesis of grape varieties Pobeda and Rizamat

¹Bobodzhanova Kh.I., ²Kukharchyk N.V., ¹Khaitov A.E.

¹Tajik National University, Dushanbe, Tajikistan

²Institute for Fruit Growing, Samokhvalovichi, Belarus

The data on evaluation of the influence of concentration indolyl butyric acid on the *in vitro* rhizogenesis microshoots grapes Rizamat and Victory has been presented. Micropiles of 1-2 cm length which passed the rest period at a lower positive temperature were used for rhizogenesis. The effect of indolyl butyric acid (0.5 and 1.5 mg/l, control - 0 mg/l) on the efficacy of rhizogenesis was evaluated. Morphological characteristics of micro-races were noted on days 15, 30 and 45. The percentage of entrenched regenerating plants on the 15th day of development is low and is 20% in the environment without indolyl butyric acid for both investigated varieties of grapes. A significant part of this is made up of plants without the growth of not only the roots but also shoots, the percentage of rooted plants increases on the 45th day of development. A similar pattern is observed with the concentration of indolyl butyric acid - 0.5 mg/l. A high percentage of rootless plants is observed in a nutrient environment without indolyl butyric acid 66.7% - Rizamat; 73.3% - Pobeda. This indicator reduces to the 45th day of development and is 53.3 and 33.3% for Pobeda and Rizamat, respectively. By the 30th day of development, the plants reach the maximum rhizogenesis - 93.3% and 100% for the Rizamat and Pobeda varieties, respectively, at an indolyl butyric acid concentration of 1.5 mg / l. This situation is also preserved by the 45th day of development, which determines the optimal duration of the rhizogenesis passage and the period of transplantation for adaptation - 30 days. Morphological indices of rooted plants at different indolyl butyric acid concentrations are significantly different. The number of roots differs for all three concentrations indolyl butyric acid studied for both Rizamat and Pobeda varieties. At the same time, the maximum amount is observed at a concentration of 1.5 mg/l. Moreover, for the Rizamat variety, the tendency to increase the number of roots is persists as the plant develops at all concentrations of indolyl butyric acid. For the Зшиувф variety, the increase in the number of roots is also noted by day 45 at a concentration of 1.5 mg/l.

Thus, the influence of the concentration of indolyl butyric acid on the rhizogenesis and morphological indices of rooted plants of the Rizomat and Pobeda grapes has been established, as well as the need to select individual auxin concentrations and the duration of rhizogenesis for grape varieties.

Влияние NaCl-засоления на анатомо-морфологические характеристики клеток корня томата в условиях засоления *in vitro*

^{1,2}Богоутдинова Л. Р., ²Баранова Е.Н., ²Баранова Г. Б., ^{2,3}Смирнова Е.А., ^{1,2}Халилуев М. Р.

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

²ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: bogoutdinova_lr@rambler.ru

Одним из основных абиотических стрессов, ограничивающих производство сельскохозяйственных культур во всем мире, является засоление. Первым органом растения, который сталкивается с почвенным засолением, является корень. Целью исследования являлось изучение влияния хлоридного засоления *in vitro* на морфологию клеток корня двух генотипов томата (*Solanum lycopersicum* L.), различающихся по солеустойчивости. Объектом исследования служили проростки контрастных по устойчивости к засолению генотипов томата (линия ЯЛФ и сорт Рекордсмен). Проростки культивировали в течение 8 суток на питательной среде MS для индукции ризогенеза с добавлением различных концентраций хлорида натрия, после чего развившиеся корни фиксировали для проведения световой микроскопии. Длина клеток колумеллы и эпидермиса корней изменялась при добавлении NaCl в питательную среду. Так, при повышении концентрации NaCl в питательной среде у томата линии ЯЛФ установлено двухфазное изменение длины клеток с увеличением показателя при 25 и 150 мМ NaCl у эпидермальных клеток, и при 50 и 150 мМ NaCl у клеток колумеллы. Похожая тенденция отмечена у клеток колумеллы томата сорта Рекордсмен, у которого повышение длины клеток наблюдалось при содержании 50 и 150 мМ NaCl в питательной среде (как и у линии ЯЛФ). Увеличения длины клеток эпидермиса у сорта Рекордсмен по сравнению с контролем обнаружено не было. В результате исследования установлены различия по изменению площади клеток коры и центрального цилиндра между двумя генотипами. Так, уменьшение площади клеток коры у линии ЯЛФ отмечено при 50, 75 и 100 мМ NaCl, тогда как у сорта Рекордсмен - при 150 мМ NaCl. С дальнейшим повышением концентрации соли в среде площадь клеток коры у линии ЯЛФ увеличивалась, в то время как у сорта Рекордсмен данный показатель оставался на уровне контроля. Площадь клеток центрального цилиндра у линии ЯЛФ не менялась с добавлением хлорида натрия, тогда как у сорта Рекордсмен изученный показатель увеличивался при 75-150 мМ NaCl. Обнаруженные изменения могут быть обусловлены как положительной адаптивной реакцией клеток на стресс (снижение оводненности тканей с последующим понижением осмотического потенциала клеточного сока), так и ингибированием роста клеток. Таким образом, установлено, что структурная организация корня томата у исследуемых генотипов в условиях засоления *in vitro* имеет различия по ряду цитологических характеристик.

Effect of sodium chloride on the anatomical and morphological characteristics of tomato root cells under conditions of salinity *in vitro*

^{1,2}Bogoutdinova L.R., ²Baranova E.N., ²Baranova G.B., ^{2,3}Smirnova E.A., ^{1,2}Khaliluev M.R.

¹All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Federal Agency of Scientific Organizations, Moscow, Russia

²Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

³Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Salt stress - one of the main abiotic stresses that limit the production of agricultural crops around the world. The first organ of the plant that encounters soil salinity is the root. The aim of the research was to study the effect of sodium chloride *in vitro* on the morphology of the root cells of two tomato genotypes (*Solanum lycopersicum* L.), differing in salt tolerance. The object of the study was seedlings contrasting in resistance to salinity of the tomato genotypes (YALF line and Recordsman variety). The seedlings were cultured for 8 days on a MS nutrient medium to induce rhizogenesis with the addition of various concentrations (0-250 mM) of sodium chloride, after the developed roots were fixed for light microscopy. The length of the cells of the columella and the epidermis of the roots changed with the addition of NaCl to the nutrient medium. During the cytological study, a change in this indicator was determined in both genotypes. Thus, with increasing NaCl concentration in the nutrient medium, a two-phase cell length change was observed in YALF tomato cells with an increase in the index at 25 and 150 mM NaCl in epidermal cells, and at 50 and 150 mM NaCl in columella cells. A similar trend was observed in tomato columella cells of the Recordsman variety, in which an increase in cell length was observed at 50 and 150 mM NaCl in nutrient medium (as in the YALF line). The increase in the length of epidermal cells in the Recordsman variety with in relation to the control it was not found. As a result of the study, differences in the area of the cortical cells and the central cylinder between the two genotypes were revealed. Thus, a decrease in the area of cortical cells in the YALF line at 50, 75 and 100 mM NaCl, while in the Recordsman variety, at 150 mM NaCl. With the subsequent increase in the salt concentration in the medium, the area of the cortical cells in the YALF line increased, while in the Recordsman variety this indicator remained at the control level. The area of cells of the central cylinder near the YALF line did not change with the addition of sodium chloride, whereas in the Recordsman variety the studied index increased with 75-150 mM NaCl. The observed changes can be caused either by an adaptive response of cells to stress (or by a decrease in the osmotic potential of the cell sap as a result of reduced water content of tissues) or by inhibition of cell growth. Thus, it was established that the structural organization of tomato root in the studied genotypes under *in vitro* salinity conditions differs in a number of cytological characteristics.

Экобиотехнологии в регулируемой агроэкосистеме: поиск микроорганизмов эффективных продуцентов гидролитических и оксигеназных целлюлаз для приготовления биокомпостов

Борцова О.А., Галушко А.С., Панова Г.Г.

Агрофизический научно-исследовательский институт, г. Санкт-Петербург, Россия

E-mail: lirinaoa@gmail.com

В ФГБНУ Агрофизическом научно-исследовательском институте (Санкт-Петербург, РФ) разработан прототип регулируемой агроэкосистемы - физической модели достаточно совершенного агрофитоценоза в регулируемых условиях растениеводства защищенного грунта, функционирующего на основе бесперебойного снабжения растений источниками питания и энергии и обеспечивающего получение растительной продукции с заданными качественными и функциональными характеристиками. Для создания безотходного производства целевой продукции требуется решить вопрос переработки растительных остатков и отработанного субстрата-грунта, с целью их возврата в производство. Нами были проведены опыты компостирования растительных остатков, смешанных с отработанным грунтом, в течение которых исследовали динамику активности ферментных систем целлюлаз гидролитического действия, а также недавно открытых полисахаридмонооксигеназ (ПМО), осуществляющих окислительную деструкцию природных полисахаридов. Из литературных источников известно, что введение в целлюлазный комплекс нового компонента - ПМО - способно повысить эффективность гидролиза целлюлозосодержащих субстратов более чем на 50%. Нами был разработан способ получения накопительных культур целлюлозоразрушающих бактерий, потенциально обладающих ферментами ПМО, из природных источников. Было выявлено несколько чистых бактериальных культур, обладающих целлюлазами классического и оксигеназного типа, а также впервые был проведен анализ целлюлазной активности ПМО в компостных смесях. Целлюлазная активность ферментов классического и оксигеназного типа у выделенных микроорганизмов определялась аппликационными и фотометрическими методами (по количеству редуцирующих сахаров). Во втором случае в реакционную смесь вводили донор электронов (аскорбиновая или галловая кислоты). Оксигеназная активность была обнаружена во всех исследованных образцах, причем выход редуцирующих сахаров в присутствии галловой кислоты в качестве донора электронов был в 3 раза выше, чем при использовании аскорбиновой кислоты и в 5 раз выше по сравнению с вариантом с отсутствием в реакционной смеси доноров электронов. Показатели содержания глюкозы достоверно отличались от контроля. Микробные культуры, показавшие максимальную целлюлазную активность и потенциально обладающие ферментами ПМО, задействованы в дальнейших исследованиях для применения их в составе биодобавки-интенсификатора компостирования. Работа поддержана грантом Фонда содействия инновациям №10859ГУ/2016.

Environmental biotechnologies in regulated agroecosystem: search for the effective hydrolytic and oxidative cellulases-producers for biocompost preparation

Bortsova O.A., Galushko A.S., Panova G.G.

Agrophysical Research Institute, Saint-Petersburg, Russia

In Agrophysical research Institute (St. Petersburg, Russia) there was developed a prototype of adjustable agroecosystem – a physical model is fairly complete agrophytocenosis under controlled conditions of plants growing in greenhouses with uninterrupted supply of sources of nutrition and energy for plants, yielding plant products with specified quality and functional characteristics. The study deals with the development of optimization method for recycling non-food plant material. In particular, we performed screening of cellulose-digesting microorganisms for the presence of different types of cellulases aimed to create supplements to help to speed up the composting process. It is known from published sources that the addition of a new type cellulase – PMO – to a set of hydrolytic cellulases may strongly increase the efficiency of hydrolysis of cellulose – containing compounds for more than 50 %. We have developed a method for establishment of enrichment cultures of cellulose degrading bacteria that potentially possessed PMO enzymes using samples of natural environments as inocula. We isolated several pure cultures of bacteria that showed the presence of hydrolytic and oxidative types of cellulases and for the first time we also investigated the changes in activity of PMO cellulases in composting mixtures. Activity of cellulases of classical and oxidative types was determined with traditional and photometric methods (release of reducing sugars), correspondingly. In the second case the assay mixture was supplemented with donor electrons (ascorbate or gallate). Oxygenase – dependent cellulase activity was detected in all investigated samples. In the presence of gallate as the electron donor the production of reducing sugars was 3 times higher than in the presence of ascorbate as the electron donor and 5 times higher than in the variant without added electron donors. The values of reducing sugars formation were statistically different from control values. Pure cultures of bacteria with the highest cellulolytic activity and containing enzymes of PMO types will be used in further investigation in compost accelerators cocktail. The investigation was financially supported by Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises №10859ГУ/2016.

Влияние биомакромолекул клеточной поверхности ассоциативных ризобактерий на микрорастения картофеля в условиях *in vitro*

^{1,2}Бурьгин Г.Л., ²Каргаполова К.Ю., ³Парфирова О.И., ¹Авдеева Е.С., ¹Сигида Е.Н., ³Горшков В.Ю.

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

²Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов, Россия

³Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ «КазНЦ РАН», Казань, Россия

E-mail: burygingl@gmail.com

Растения в природе постоянно контактируют с ризосферными микроорганизмами, обеспечивающими успешное развитие макроорганизма. При этом почти неизбежно происходят взаимодействия поверхностных биомакромолекул бактерий с рецепторами фитоиммунитета, влияющие на метаболизм растений. Целью данной работы было исследование ответных реакций микрорастений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Кондор на инокуляцию бактериальными суспензиями и на воздействие препаратами флагеллинов и липополисахаридов ризосферных штаммов *Azospirillum brasilense* Sp7 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. Исследование проводили на 10-ти суточных микроклонах картофеля сорта Кондор, выращенных на жидкой питательной среде Мурасиге и Скуга без гормонов. Через сутки после воздействия у опытных растений оценивали уровень экспрессии 7 генов различных путей иммунного ответа растений и митотический индекс меристем корня. Через 20 дней проводили измерение морфометрических показателей микрорастений. В качестве контроля служили стерильные микрорастения. Методом ПЦР реального времени установлено разнонаправленное действие ЛПС и флагеллина штамма *A. brasilense* Sp7 на развитие фитоиммунных реакций микрорастений картофеля. Если присутствие ЛПС в среде культивирования приводило к повышению активности генов салицилат-регулируемого ответа растений (PR1), то действие флагеллина связано с активацией жасмонат- (LOX) и этилен-регулируемых (ERF1) путей фитоиммунного ответа. Клетки штамма *A. brasilense* Sp7 вызывают активацию всех трёх перечисленных путей. Инокуляция бактериями *O. cytisi* IPA7.2 приводила к незначительному снижению уровня экспрессии гена липоксигеназы LOX и повышению экспрессии гена ИУК-аминосинтазы GH3. При анализе морфометрических показателей выявлено стимулирование роста корневой системы в присутствии ЛПС штамма *A. brasilense* Sp7. Для флагеллинов обоих штаммов показано ингибирующее действие на рост побега и количество узлов микроклонов. В то же время, флагеллины (также как и бактериальные клетки) значительно повышали митотический индекс корневых меристем. Таким образом, показано, что несмотря на слабый ингибирующий эффект бактериальных флагеллинов на растения, бактериальная колонизация корней ризосферными бактериями происходит успешно и наблюдается суммарный рост-стимулирующий эффект инокуляции, частично опосредованный действием ЛПС. Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-01444).

Influence of cellular surface biomacromolecules of associative rhizobacteria on potato microplants *in vitro* conditions

^{1,2}Burygin G.L., ²Kargapolova K.Yu., ³Parfirova O.I., ¹Avdeeva E.S., ¹Sigida E.N., ³Gorshkov V.Yu.

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

²Vavilov Saratov State Agrarian University, Saratov, Russia

³Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Science Center of Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

Plants are constantly in contact with rhizospheric microorganisms that ensure the successful development of macroorganism. Almost inevitably there are interactions of bacterial surface biomacromolecules with innate immune receptors that affects plant metabolism. The aim of this work was to investigate the responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) to inoculation with bacterial suspensions and to exposure to the flagellin and lipopolysaccharide preparations of rhizospheric strains *Azospirillum brasilense* Sp7 and *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. The study was carried out by 10-day microclones of potato (cultivar Condor) that were grown on Murashige and Skoog medium without the gelling agent and hormones. The expression level of 7 genes of the different immune response pathways and the mitotic index of root meristems were evaluated in plants one day after exposure. After 20 days, measurements of the morphometric parameters of microplants were made. Sterile microplants were used as controls. We have established by real-time PCR that LPS and flagellin *A. brasilense* Sp7 have different effects on the phytoimmunity development in potato microplants. The presence of LPS in the culture medium led to an increase in the salicylate-regulated plant response gene (PR1) activity. The action of flagellin is associated with the activation of jasmonate- (LOX) and ethylene-regulated (ERF1) pathways of the phytoimmune response. *A. brasilense* Sp7 cells activate all three of these pathways. Inoculation by *O. cytisi* IPA7.2 resulted in a slight decrease in the expression level of the lipoxigenase gene (LOX) and an increase in the expression of the IAA-amino synthetase (GH3) gene. In the analysis of morphometric parameters, growth stimulation of the root system was revealed in the presence of LPS of *A. brasilense* Sp7. Flagellins of both strains had an inhibitory effect on shoot growth. At the same time, the flagellins (as well as bacterial cells) significantly increased the mitotic index of the root meristems. Thus, it is shown that, despite the weak inhibitory effect of bacterial flagellins on plant growth, colonization of the roots by rhizospheric bacteria is successful and a total growth-promoting effect of inoculation, partially mediated by LPS action, is observed. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 16-04-01444).

Исследование мажорных антигенов клеточной поверхности бактерий рода *Azospirillum* и их вклада в растительно-микробные взаимодействия

Бурьгин Г.Л., Матора Л.Ю., Евсеева Н.В., Широков А.А., Красов И.А., Филиппьева Ю.А., Буданова А.А., Попова И.А., Щеголев С.Ю.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

E-mail: burygingl@gmail.com

Структура и свойства поверхностных антигенов ризосферных бактерий составляют основной предмет исследований лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН. Их главным инструментом являются антитела к белковым и углеводным бактериальным структурам, выполняющим ключевую роль в растительно-микробных взаимодействиях на стадии формирования и функционирования ассоциативного симбиоза в ризосфере растений. Нами получены антитела к поверхностным структурам 27 штаммов 11 видов 7 родов ассоциативных бактерий. Для модельных штаммов *Azospirillum brasilense* продемонстрирована структурная и антигенная гетерогенность их О-антигена. Для ряда штаммов азоспирилл показано отсутствие индивидуального капсульного антигена. Разработана серологическая тест-система, позволившая провести серотипирование 74 штаммов данного рода. Структурные исследования гликозилированного флагеллина полярного жгутика типового штамма *Azospirillum brasilense* Sp7 показали наличие в его составе нескольких полисахаридных цепей, иммунохимически идентичных липополисахариду данных бактерий. На основе иммуноферментного анализа с использованием специфических антител разработаны приемы анализа распространенности азоспирилл в образцах почв, позволившие оценить динамику численности интродуцированных в почву бактерий и выявить наличие антигенов азоспирилл в течение вегетативного сезона в 6 типах почв Саратовской области.

Оценена способность разных штаммов к колонизации корней растений, выявлены стимулирующие эффекты бактерий и их изолированных поверхностных компонентов по морфометрическим и цитологическим показателям растений. Показана роль и оценён вклад липополисахарида, флагеллина и белковых пилеподобных структур азоспирилл в бактериальную колонизацию растений и в индукцию рост-стимулирующих эффектов. Проводятся работы по выделению и идентификации новых ризосферных бактериальных штаммов-симбионтов растений (представителей родов *Enterobacter*, *Ochrobactrum*, *Ensifer*, *Acinetobacter*, *Kocuria* и др.) с оценками их рост-стимулирующего потенциала.

Major antigens in the cell surface of *Azospirillum* bacteria and their contribution to plant-microbe interactions

Burygin G.L., Matora L.Yu., Evseeva N.V., Shirokov A.A., Krasov A.I., Filip'echeva Yu.A., Budanova A.A., Popova I.A., Shchyogolev S.Yu.

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

Most research conducted at the IBPPM RAS Laboratory of Immunochemistry is addressed to the structure and properties of the surface antigens of rhizosphere bacteria. The main tool used is antibodies raised to bacterial protein and carbohydrate structures that play a key part in associative plant-microbe interactions in the plant rhizosphere. We raised antigens to the surface structures of 27 strains belonging to 11 species of 7 genera of associative bacteria. We showed that the O antigens of the model strains of *Azospirillum brasilense* were structurally and antigenically heterogeneous. Several *Azospirillum* strains lacked an individual capsular antigen. We developed a serological test system that made it possible to serotype 74 *Azospirillum* strains. Structural studies of glycosylated flagellin of the polar flagellum from *A. brasilense* type strain Sp7 showed that it contains several polysaccharide chains that are immunochemically identical to the lipopolysaccharide of this bacterium.

Enzyme-linked immunosorbent assay with specific antibodies was used as the basis for analyzing the occurrence of *Azospirillum* in soil samples. This analysis allowed us to assess the population dynamics of soil-introduced bacteria and to detect *Azospirillum* antigens in six types of soil in Saratov Oblast during the vegetative season.

The strains' abilities to colonize plant roots were assessed. Plants' morphometric and cytological variables were used to detect promoting effect of bacteria and their isolated surface components. We showed the contribution of *Azospirillum* lipopolysaccharide, flagellin, and proteinaceous pilus-like structures to the bacterial colonization of plants and to the induction of growth promotion. We are now isolating and identifying new rhizospheric strains that engage in symbiosis with plants (members of the genera *Enterobacter*, *Ochrobactrum*, *Ensifer*, *Acinetobacter*, *Kocuria*, etc.), with assessment of their growth-promoting potential.

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

^{1,2}Васильева Е.Н., ²Афонин А.М., ²Ахтемова Г.А., ²Жуков В.А., ²Борисов А.Ю., ²Тихонович И.А.

¹Санкт-Петербургский государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

²ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург-Пушкин, Россия

E-mail: grayman616@gmail.com

Для эксперимента были выбраны три генотипа гороха посевного - (К-8274 – высокоэффективный и К-3358 – низкоэффективный при взаимодействии с полезной почвенной микрофлорой, а также коммерческий селекционный сорт «Триумф», созданный на базе ФГБНУ ВНИИЗБК и являющийся потомком К-8274, унаследовавшим признак высокой эффективности взаимодействия с почвенными микроорганизмами). Эндофитные бактерии выделяли из поверхностно стерилизованных растений в стадии цветения. Таксономическую принадлежность выделенных штаммов определяли с помощью секвенирования диагностического фрагмента гена 16S рРНК. Всего было выделено 230 морфологически различных культивируемых штаммов эндофитов и эпифитов, для 80 эндофитов удалось определить их таксономическую принадлежность. В листьях растений гороха генотипа К-8274 выявлены бактерии из родов *Serratia*, *Rahnella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus* (причем доминируют бактерии из рода *Serratia* и *Bacillus*). В стеблях данной линии обитают бактерии из родов *Bacillus*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum* и *Rahnella*. Эндосфера стеблей генотипа К-3358 населена бактериями из родов *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Luteibacter* и *Enterobacter* с доминированием рода *Rahnella*. Из листьев выделены бактерии из родов *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Bacillus*. Стебли гороха сорта «Триумф» населяют эндофитные бактерии из родов *Serratia*, *Staphylococcus*, *Rahnella*, *Sphingomonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*. В листьях гороха «Триумф» обнаружены эндофиты, относящиеся к родам *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Rahnella*, *Pseudomonas* и *Bacillus*. Восемь штаммов эндофитных бактерий, показали способность стимулировать рост корней кресс-салата при постановке теста на ростстимулирующую активность. Эти бактерии принадлежали к родам *Bacillus*, *Rahnella*, *Enterobacter*, *Serratia* и *Acinetobacter*. Наибольшее количество ростстимулирующих бактерий было обнаружено в растениях гороха низкоэффективной линии К-3358. Штаммы эндофитных бактерий, способствующих развитию растений, представили интерес для дальнейшего геномного секвенирования с целью установления общих генетических детерминант эндофитности. В результате работы описаны культивируемые бактерии, входящие в состав микробного сообщества (микробиома) растений гороха посевного (*Pisum sativum* L.).

Работа выполнена за счет средств Государственного задания Пункт X10.2. (№ 0664-2015-0020) за 2018 г. и грантами РНФ 17-76-30016.

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

^{1,2}Vasileva E., ²Afonin A., ²Akhtemova G., ²Zhukov V., ²Borisov A., ²Tikhonovich I.

¹Saint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia;

²All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia.

For the experiment three genotypes of garden pea seeds were selected: K-8274 which is highly effective in respect to the rhizosphere microflora, K-3358 – low-effective genotype and commercial selected sort «Triumph», created on VNIIZBK basis, which is the descendant of K-8274 and also a highly effective. Endophytic bacteria were isolated from surface sterilized plants at the flowering stage. Taxonomic status of isolated strains was determined via sequencing of the diagnostic (V3-V9) fragment of 16S rRNA.

In total 230 morphotypes of endophytes and epiphytes were isolated; for 80 of them taxonomic status was determined. Bacteria from genera *Serratia*, *Rahnella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus* were isolated from leaves of genotype K-8274, *Serratia* and *Bacillus* being the dominant genera. *Bacillus*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum* and *Rahnella* were isolated from stems. The endosphere of K-3358 stems was inhabited by bacteria from genera *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Luteibacter* and *Enterobacter* with *Rahnella* predominance. Leaves contained endophytes from genera *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Bacillus*. The stems of «Triumph» garden pea were colonized by endophytic bacteria from genera *Serratia*, *Staphylococcus*, *Rahnella*, *Sphingomonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*. Bacteria of the genus *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Rahnella*, *Pseudomonas* and *Bacillus* were found. Eight strains of endophytic bacteria have shown the ability to stimulate growth of watercress roots when testing for growth promoting activity. These bacteria were identified as *Bacillus* sp., *Rahnella* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp. and *Acinetobacter* sp. The greatest number of growth-promoting bacteria was found in low-effective garden pea genotype K-3358. Endophytic strains, which promote plants development, became of interest for further genomic sequencing in order to establish common genetic determinants of endophytism.

As a result of the work cultivated bacteria from the microbial community (microbioma) of garden pea plants (*Pisum sativum* L.) were described.

The work is funded by the State assignment X10.2. (№ 0664-2015-0020) and supported by RSF grants № 17-76-30016.

Биопленки ризобий в искусственных симбиотических системах

Вершинина З.Р., Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Иванова Т.А., Садыкова Л.Р., Баймиев Ал.Х.

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

E-mail: zilyaver@mail.ru

Ризобактерии синтезируют большое количество экзополисахаридов (ЭПС), необходимых для установления симбиотических отношений с бобовыми растениями, питания, защиты от вредных факторов окружающей среды и формирования биопленок. Чем больше ризобии синтезируют ЭПС, тем выше их конкурентоспособность по сравнению с другими штаммами. У ризобий образование ЭПС регулируется генами *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*. Ранее было показано, что увеличение копий генов *pssA* и *rosR* в бактериях *R. leguminosarum* bv. *trifolii* приводило к увеличению клубенок образующей активности данного микросимбионта и усиливало конкурентоспособность ризобий по сравнению с дикими штаммами. В данной работе была получена векторная конструкция на основе плазмиды pJB658, содержащая гены *gfp* и *pssA*. Полученным вектором были трансформированы штаммы *R. leguminosarum*: Pvu 5, VSy12, THy2, TPr4, VCr7, VSy3. Биопленки, которые образуют трансформированные и контрольные штаммы на инертных поверхностях, исследовали с применением 96-луночных пластиковых планшетов. Было показано, что полученные рекомбинантные штаммы ризобий формируют более сложные архитектурные структуры биопленок по сравнению с дикими штаммами.

С помощью флуоресцентной микроскопии был изучен характер колонизация корней растений рапса сорта «Ратник» рекомбинантными и контрольными штаммами. Количество клеток контрольных и трансформированных штаммов на поверхности корней растений отличалось незначительно. Однако на корнях растений, обработанных трансформированными штаммами, наблюдалось образование зрелых биопленок, в отличие от биопленок, которые образовались на корнях растений, обработанных контрольными штаммами, которые находились на начальных этапах развития.

Полученные данные не оставляют сомнений в том, что гены, регулирующие синтез экзополисахаридов у ризобий, возможно использовать в качестве инструмента для улучшения эффективности формирования ассоциативных симбиотических систем, так как образование биопленок является решающим фактором, определяющим конкурентоспособность интродуцированных штаммов ризобий в условиях агроценоза.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов РФФИ-Инициативный - № 16-04-00902 А и РФФИ №18-34-00033 мол_а.

Biofilms of rhizobia in the artificial symbiotic systems

Vershinina Z.R., Khakimova L.R., Lavina A.M., Ivanova T.A., Sadykova L.R., Baymiev Al.Kh.

Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, Ufa, Russia

Rizobacteria synthesize a large number of exopolysaccharides (EPS), necessary for establishing symbiotic relationships with leguminous plants, nutrition, protection from harmful environmental factors and the formation of biofilms. Rhizobia synthesizing a large number of EPS have higher competitiveness compared to other strains. The formation of EPS is regulated by the genes *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE* in *Rhizobium*. Previously, it was shown that an increase of copies of the genes *pssA* and *rosR* in the bacteria *R. leguminosarum* bv. *trifolii* resulted in an increase of nodule forming activity of this microsymbiont and increase of the competitiveness of rhizobia in comparison with wild strains. In this paper, a vector construct based on plasmid pJB658 containing the genes *gfp* and *pssA* was obtained. The resulting vector was embedded in the strains *R. leguminosarum*: Pvu 5, VSy12, THy2, TPr4, VCr7, VSy3. Biofilms that form transformed and control strains on inert surfaces were examined using 96-well plastic plates. It was shown that the obtained recombinant rhizobium strains form more complex architectural structures of biofilms in comparison with wild strains.

With the help of fluorescence microscopy, the character of colonization of the roots of oilseed rape plants of the "Ratnik" variety with recombinant and control strains was studied. The number of cells of control and transformed strains on the surface of plant roots was not significantly different. However, on the roots of plants treated with transformed strains, mature biofilms were formed, unlike biofilms, which were formed on the roots of plants treated with control strains. Latter biofilms were in the early stages of development.

The obtained data confirmed that the genes regulating the synthesis of EPS in rhizobia can be used as a tool for improving the formation of associative symbiotic systems, since the formation of biofilms is the decisive factor determining the competitiveness of introduced strains of rhizobia in agroecosis.

This work was performed with support from the Russian Foundation for Basic Research (projects № 16-04-00902 A and №18-34-00033).

Влияние этилена и активных форм кислорода на развитие патогена *Stagonospora nodorum* BERK. в тканях растений пшеницы

Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Румянцев С.Д., Максимов И.В.

Институт биохимии и генетики ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия
E-mail: veselova75@rambler.ru

Давно установлено, что растения реагируют на атаку патогенов интенсивной генерацией активных форм кислорода (АФК) – окислительным взрывом, и показано, что АФК играют центральную роль в иммунитете растений. В настоящее время основным местом синтеза АФК в растительно-микробном взаимодействии считается апопласт, где НАДФН-оксидаза генерирует супероксид радикал (O_2^-), дисмутирующий затем в перекись водорода (H_2O_2). В синтезе АФК участвуют и другие ферменты, например, оксалатоксидаза (ОО) и частично пероксидаза (ПО) – фермент также утилизирующий АФК. Про-/антиоксидантный статус растений находится под строгим контролем фитогормонов. Среди них этилен, роль которого при биотическом стрессе неоднозначна и зависит от типа патогена и вида растения. Ранее нами была показана отрицательная роль этилена в развитии устойчивости растений пшеницы к *Stagonospora nodorum*. Целью настоящей работы являлось изучение роли этилена в регуляции генерации АФК в растениях пшеницы, инфицированных грибом *S. nodorum*, а также исследование влияния этилена и АФК на развитие и рост патогена. Гистохимический анализ O_2^- и H_2O_2 показал, что обработка растений этефоном (химическим предшественником этилена) приводила к ингибированию накопления O_2^- и H_2O_2 в местах проникновения патогена и общему низкому содержанию H_2O_2 в инфицированных листьях, что способствовало интенсивному размножению мицелия гриба и обширному поражению растений. Так показано, что низкие концентрации АФК являются индукторами морфогенеза у грибов и способствуют их усиленному росту и развитию. Подавление генерации АФК, скорее всего, происходило за счет снижения активности ОО, уменьшения накопления мРНК гена *TaRboh*, кодирующего НАДФН-оксидазу, и увеличения активности каталазы при инфицировании. При ингибировании рецепции этилена с помощью 1-метилциклопропена (1-МЦП) наблюдали противоположный результат - интенсивная локальная генерация O_2^- и H_2O_2 и общая высокая генерация H_2O_2 в листьях приводили к ингибированию роста мицелия патогена, что происходило за счет активации прооксидантных ферментов. Таким образом, этиленовый сигнальный путь отрицательно влиял на генерацию АФК в инфицированных растениях пшеницы. Подавляя накопление O_2^- и H_2O_2 за счет влияния на ферменты про-/антиоксидантной системы, этилен обеспечивал тем самым благоприятные условия для развития патогена в тканях пшеницы. Работа выполнена в рамках госзадания № 0246-2018-0035 и при финансовой поддержке РФФИ № 18-04-00978.

Influence of ethylene and reactive oxygen species on the growth of the pathogen *Stagonospora nodorum* BERK. in wheat plant tissue

Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nujnaya T.V., Rumyantsev S.D., Maksimov I.V.

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Centre RAS, Ufa, Russia

It has long been established that plants respond to pathogen attacks with a transient burst of reactive oxygen species (ROS). So, ROS play a central role in plant immune responses. The major site of ROS production during plant-pathogen interactions is the apoplast. The apoplastic ROS are mainly produced by plasma membrane localized NADPH oxidases (respiratory burst oxidase homologs, RBOHs), which generate the superoxide radical (O_2^-). Other enzymes involving in the synthesis of ROS, for example, are oxalate oxidase (OO) and partially peroxidase (PO). PO is an enzyme also degrading ROS. The pro- and antioxidant status of plants is controlled by phytohormones. One of these agents is ethylene. Ethylene acts differently under biotic stress depending on the type of pathogen and plant species. Previously, we have shown the negative role of ethylene in the defense response of wheat plants against *Stagonospora nodorum*. The aim of this work was the investigation of ethylene role in regulation of ROS generation in wheat plants infected with the fungus *S. nodorum*, as well as the study of influence of ethylene and ROS on the growth of the pathogen. Histochemical analysis of O_2^- and H_2O_2 showed that the treatment of plants with ethephone (a chemical precursor of ethylene) led to inhibition of the accumulation of O_2^- and H_2O_2 at the sites of pathogen penetration and the decrease of content of H_2O_2 in the infected leaves. It promoted intensive proliferation of fungal infectious hyphae and large plant damage. It was showed that low concentrations of ROS were inducers of morphogenesis of fungi and enhanced growth and development of the fungus. When plants were treated by ethephone, suppression of ROS generation was most likely due to decreased activity of OO, reduced expression of gene *TaRboh* encoding NADPH-oxidase, and increased activity of catalase during infection. The inhibition of ethylene by 1-methylcyclopropene (1-MCP) resulted in the opposite outcome. Intensive local generation of O_2^- and H_2O_2 and high total content of H_2O_2 in the infected leaves treated with 1-MCP led to inhibition of the growth of the pathogen mycelium. The process was due to the activation of prooxidant enzymes. Thus, the ethylene signaling pathway negatively affected the ROS generation in wheat plants infected with *S. nodorum*. As a result of the ethylene influence on the enzymes of the pro- and antioxidant system, O_2^- and H_2O_2 generation was suppressed. Thereby ethylene provided appropriate conditions for the development of the pathogen in the wheat tissues. The work was supported by grant of RFBR № 18-04-00978.

Оценка конъюгативной активности у некоторых видов ризобий

Владимирова А.А., Гуменко Р.С., Кашапова Г.М., Баймиев Ан.Х.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

E-mail: baymiev@anrb.ru

Ризобии являются широко распространенными почвенными бактериями, способными преобразовывать атмосферный азот в усвояемую растением форму. Данный процесс контролируется генами, которые могут располагаться как на симбиотических плаزمиде (pSym), так и в хромосоме в составе геномных островов. У ризобий, как и у большинства бактерий, обмен генетическим материалом происходит за счет процесса конъюгации. Данный процесс играет важную роль в биологическом разнообразии и экологии микроорганизмов, способствуя их адаптации к окружающей среде и конкурентоспособности, за счет приобретения функционально полезных генов. Целью данного исследования являлась оценка конъюгативной активности клубеньковых бактерий с применением флуоресцентно меченых штаммов ризобий. Объектами исследования служили штаммы ризобий, принадлежащие к родам *Rhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*) и *Mesorhizobium*, взятые из коллекции микроорганизмов «Симбионт» ИБГ УФИЦ РАН. Рекомбинантные штаммы данных бактерий, меченные репортерными генами флуоресцентных белков TurboGFP и TurboRFP на основе плазмиды pJN105, были получены методом электропорации. Далее проводили совместное культивирование на агаризованной питательной среде JM (1% маннит, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,01% NaCl, 0,02% MgSO₄ и 0,5% K₂HPO₄) неокрашенных штаммов, штаммов, меченных зеленым флуоресцентным белком, и штаммов, меченных красным флуоресцентным белком, относящихся к одному или разным родам ризобий при 28°C в течение 4 недель. С использованием метода проточной цитометрии (Novocyte), при совместном выращивании нами были выявлены штаммы клубеньковых бактерий, содержащих оба флуоресцентных маркера. Наибольший процент ризобий, имеющих оба генетических маркера, был выявлен у штаммов рода *Rhizobium* (3,8%). У клубеньковых бактерий, принадлежащих роду *Ensifer*, данный результат был отмечен в 0,4% случаях, у штаммов *Mesorhizobium*, в 0,05%. Совместное культивирование меченых бактерий родов *Rhizobium* и *Ensifer* показало наименьшее (0,02%) количество бактериальных клеток, несущих оба генетических маркера. Данные различия в значениях могут быть обусловлены разной конъюгативной активностью клубеньковых бактерий, относящихся к разным родам. Конъюгация наиболее активно проходит между клубеньковыми бактериями внутри своего рода. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ: №18-34-00034мол_а (получение рекомбинантных штаммов и проточная цитофлуориметрия), №17-44-020201р_а (подбор штаммов для анализа).

Evaluation of conjugative activity in some Rhizobia species

Vladimirova A.A., Gumenko R.S., Kashapova G.M., Baymiev An.K.

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

Rhizobia are wide spread soil bacteria capable of converting atmospheric nitrogen into a form digestible plant. This process is controlled by genes that can be located on both the symbiotic plasmids (pSym) and the chromosome in the genomic islands. In rhizobia, as in most bacteria, the exchange of genetic material occurs due to the conjugation process. This process plays an important role in the biological diversity and ecology of microorganisms, contributing to their adaptation to the environment and competitiveness, through the acquisition of functionally useful genes. The aim of this study was to assess the conjugative activity of nodule bacteria using fluorescent labeled rhizobia strains. Subjects of the study were rhizobium strains belonging to the genera *Rhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*) and *Mesorhizobium*, taken from the collection of microorganisms "Symbiont" IBG UFRC RAS. Recombinant strains of these bacteria, labeled with reporter genes of fluorescent proteins TurboGFP and TurboRFP based on plasmid pJN105, were obtained by electroporation. Further, we carried out a joint cultivation on agar medium JM (1% mannitol, 0.5% yeast extract, 0.01% NaCl, 0.02% MgSO₄ and 0.5% K₂HPO₄) uncoloured strains, strains labeled with a green fluorescent protein, and strains labeled with a red fluorescent protein, belonging to one or different rhizobia genera at 28°C for 4 weeks. Using the method of flow cytometry (Novocyte), when co-cultivated, we have identified strains of nodule bacteria containing both fluorescent markers. The highest percentage of rhizobia that have both genetic markers were detected in strains of the genus *Rhizobium* (3.8%). In nodule bacteria belonging to the genus *Ensifer*, this result was noted in 0.4% of cases, in strains *Mesorhizobium* at 0.05%. The co-cultivation of labeled *Rhizobium* and *Ensifer* genera showed the smallest (0.02%) number of bacterial cells carrying both genetic markers. These differences in values may be due to the different conjugative activity of nodule bacteria belonging to different genera. Conjugation most actively occurs between nodule bacteria inside a genus. This work was supported by RFBR grants: №18-34-00034 (production of recombinant strains and flow cytometry), №17-44-020201 (selection of strains for analysis).

Полифункциональное действие микробной композиции при возделывании ячменя ярового

¹Войтка Д.В., ²Михайловская Н.А., ¹Юзефович Е.К.

¹Институт защиты растений, Прилуки, Республика Беларусь

²Институт почвоведения и агрохимия, Минск, Беларусь

E-mail: d.voitka@tut.by

В условиях эдафического стресса на эродированных и эрозионноопасных почвах необходимо снижение нагрузки химических удобрений и пестицидов. Наиболее перспективными средствами экологизации растениеводства считаются многокомпонентные полифункциональные микробные препараты, сочетающие свойства стимуляторов роста, биоудобрений и биофунгицидов. Разработана трехкомпонентная микробная композиция, включающая бактерии *Azospirillum brasilense* 2(в)3 с высоким азотфиксирующим потенциалом и способностью к растворению ортофосфата кальция, калиймобилизующие бактерии *Bacillus circulans* К-81, характеризующиеся способностью к мобилизации труднодоступных форм почвенного калия и мобилизации фосфора из нерастворимых фосфатов, а также гриб-антагонист *T. longibrachiatum* L-7, обладающий высокой антагонистической активностью по отношению к широкому спектру фитопатогенных микроорганизмов. В полевых условиях изучено влияние трехкомпонентного препарата, а также бинарной бактериальной композиции и монокультур отобранных штаммов на ростовые процессы и урожайность ячменя ярового сорта Стратус на эродированных дерново-подзолистых почвах на мощных лессовидных суглинках. Инокуляция микроорганизмов в фазе всходы – начало кущения способствовала стимуляции роста ячменя ярового. Анализ биометрических показателей свидетельствует о том, что увеличение к контролю линейных размеров стеблей растений составило 8–32%, длины колоса – 7-22%, числа зерен в колосе – 5-18%, увеличение массы корней – 7-31% в зависимости от степени эродированности почвы. Использование биологических агентов положительно сказалось на оптимизации фитопатологической ситуации и продуктивности культуры в условиях эдафического стресса. Применение бинарного бактериального инокулянта *A. brasilense* + *B. circulans* обеспечило прибавку урожайности 3,4-4,2 ц/га, моноинокулянта *T. longibrachiatum* – 1,8-3,0 ц/га. Наибольшие прибавки зерна ячменя ярового (4,9-5,2 ц/га) при урожайности в контроле 57,9-61,4 ц/га обеспечило применение трехкомпонентной микробной композиции на водоразделе и слабозероэродированной почве. Биологическая эффективность трехкомпонентной микробной композиции в защите ячменя ярового от корневой гнили варьировала от 45,9 до 69,5% в зависимости от степени эродированности почвы. Проведенные исследования свидетельствуют об эффективности микробной композиции, обеспечивающей улучшение минерального питания и защитностимулирующий эффект на растения в условиях эдафического стресса.

Multifunctional microbial composition action by spring barley cultivation

¹Voitka D.V., ²Mikhailovskaya N.A., ¹Yuzefovich E.K.

¹Institute of Plant Protection, Priluki, Republic of Belarus

²Institute of Soil Science and Agrochemistry, Minsk, Republic of Belarus

Under conditions of edaphic stress on eroded and erosion-prone soils, it is necessary to reduce the load of chemical fertilizers and pesticides. The most promising means of plant growing ecologization are multicomponent polyfunctional microbial preparations combining the properties of growth stimulators, biofertilizers and biofungicides. A three-component microbial composition comprising *Azospirillum brasilense* 2(c)3 bacteria with a high nitrogen fixing potential and the ability to dissolve calcium orthophosphate, potassium mobilizing bacteria *Bacillus circulans* K-81, characterized by the ability to mobilize hard-to-reach forms of soil potassium and mobilize phosphorus from insoluble phosphates, and a fungus-antagonist *T. longibrachiatum* L-7, rendering a high antagonistic activity with respect to a wide spectrum of phytopathogenic microorganisms is developed. In the field, the effect of a three-component preparation, as well as the binary bacterial composition and monocultures of selected strains on growth processes and spring barley cv Stratus yield on eroded sod-podzolic soils on powerful loess-like loams has been studied. The inoculation of microorganisms at seedlings - the beginning of tillering stage has promoted the stimulation of spring barley growth. The analysis of biometric parameters indicates that the increase of linear dimensions of plant stems in comparison with the control has made 8-32%, the ear length – 7-22%, grains number in the ear - 5-18%, root weight increase - 7-31% depending on the the degree of soil erosion. The use of biological agents has positively affected the optimization of the phytopathological situation and the crop productivity under the edaphic stress conditions. The application of a binary bacterial inoculum *A. brasilense* + *B. circulans* has provided with the productivity increase for 3.4-4.2 cwt/ ha, monoinoculant *T. longibrachiatum* - 1.8-3.0 cwt/ha. The highest spring barley grain yield increase (4.9-5.2 cwt/ha) with a yield in the control 57.9-61.4 cwt/ha has ensured the use of a three-component microbial composition at watershed and low-eroded soil. The biological effectiveness of a three-component microbial composition for spring barley protection against root rot has varied from 45.9 to 69.5%, depending on the degree of soil erosion. The carried out researches testify to the effectiveness of the microbial composition providing with the improvement of mineral nutrition and the protective-stimulating effect on plants under edaphic stress conditions.

Изменение ультраструктуры клубеньков растений сои под влиянием Ризоторфина и Эпина-экстра

Волобуева О.Г., Гуро П.В.

Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А.Тимирязева, Москва, Россия

E-mail: ovolobueva@list.ru

Формирование бобово-ризобияльного симбиоза обусловлено специфическими механизмами сигнальных взаимодействий и взаимной метаболической интеграцией микро- и макросимбионта. В последнее время для повышения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза используются биопрепараты и регуляторы роста. В условиях вегетационного опыта изучали влияние биопрепарата Ризоторфин (*Bradyrhizobium japonicum*), содержащий штамм 634, эффективный для сои и регулятора роста Эпин-экстра на азотфиксирующую активность и ультраструктуру клубеньков сои сортов Магева и Свапа. Установлена корреляция между симбиотической азотфиксацией и ультраструктурой клубеньков сои. Наибольшая азотфиксирующая активность отмечена в вариантах с большим количеством бактериоидов в симбиосомах, большим количеством и большей площадью гранул волютина и меньшим количеством гранул – поли-β-оксимасляной кислоты (ПОМ). ПОМ - запасное вещество, эндогенный накопитель энергии и углерода прокариот. Наличие этого эндогенного резерва определяет большую пластичность метаболизма ризобий. Обычно, при активной азотфиксации содержание ПОМ в клетках бактерий минимально, поскольку синтез и распад её при этом наиболее интенсивен. Роль ПОМ заключается в основном в регуляции использования фотоассимилятов, поступающих в бактериоиды и по содержанию полимера можно в определенной степени судить об обеспеченности бактериоидов углеводными субстратами. Показана сортовая реакция растений на обработку Эпином-экстра: наибольшей отзывчивостью характеризовался сорт сои Свапа. У растений сои сорта Магева в большей степени проявилось действие Ризоторфина.

Modification of ultrastructure of tubercles of soy plants under influence of Rizotorfin and Epin-extra

Volobueva O.G., Guro P.V.

Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

The formation of the legume-rhizobium symbiosis is caused by specific mechanisms of signal interactions and mutual metabolic integration of micro- and macro-symbionts. In recent times, biologies and growth regulators have been used to improve the efficiency of legume-rhizobium symbiosis. In the conditions of vegetative test was studied the influence of the biologies Rizotorfin (*Bradyrhizobium japonicum*), containing isolate 634 effective for soybean and the growth regulator of the Epin-extra on the nitrogen fixation activity and ultrastructure of the soybean nodules of the Magew and Swap varieties. Established between symbiotic nitrogen fixation and nodule ultrastructure of soybean. The highest nitrogen-fixing activity was noted in variants with the most number of bacterioides in symbiosomes, and with the most number and a larger area of the volute granules, and a less number of granules, poly-β-hydroxybutyric acid. Poly-β-hydroxybutyric acid is a storage compound, an endogenous hoarder of energy and carbon of prokaryotes. The presence of this endogenous reserve determines the greater plasticity of rhizobium metabolism. Usually, with active nitrogen fixation, the content of poly-β-hydroxybutyric acid in bacterial cells is minimal, since synthesis and cleavage of it are most intense. The role of poly-β-hydroxybutyric acid is basically in regulating the use of photoassimilates entering the bacterioides and the polymer content can be judged to a certain extent on the supply of bacterioides with carbohydrate substrates. The varietal reaction of plants to Epin-extra treatment is shown: the Svapa soybean variety was the most responsive. The effect of Rizotorfin was more pronounced in soya plants of the Magueva variety.

Изучение экспрессии генов метилирования ДНК у партеногенетической линии кукурузы

Волохина И.В., Гусев Ю.С., Моисеева Е.М., Гуторова О.В., Мазиллов С.И., Чумаков М.И.

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

E-mail: volokhina_i@ibppm.ru

Покрытосеменные растения размножаются половым и бесполом (апомиктичным) путем. Изучение механизма регуляции бесполого размножения (семенами, полученными без оплодотворения яйцеклетки) у растений является одним из важных направлений исследований, изучающей базовые процессы размножения и развития живых организмов. Одним из элементов апомиксиса является партеногенез (развитие зародыша из неоплодотворенной яйцеклетки), который наблюдается у кукурузы в норме с низкой частотой (до 0.01%), а у партеногенетической линии кукурузы может возрасти (до 0.1%).

Ранее установлено, что несколько генов, контролирующих метилирование ДНК (*dmt102*, *dmt103*, *dmt105*, *hdt104*, *chr106*, *hon101*) у кукурузы имеют качественные различия в экспрессии на трех стадиях развития (спорогенез, зрелый зародышевый мешок до оплодотворения, ранний эмбриогенез (3 дня после оплодотворения)). Нами представлены экспериментальные данные об экспрессии генов метилирования ДНК (*dmt102*, *dmt103*, *dmt105*, *hdt104*, *hon101*, *chr106*) в завязях и зародышевых мешках (ЗМ) при экспериментальной задержке опыления на 3 и 7 дней и в проэмбрио, зародышах и эндосперме партеногенетической (АТ-3) и контрольных линий кукурузы через 3 и 7 дней после опыления. Отличий в экспрессии всех исследованных генов (кроме *dmt102*) в завязях и ЗМ при искусственной задержке опыления на 3-7 дней у АТ-3 и контрольных линий не обнаружены. Через семь дней после опыления в зародышах АТ-3 и контрольных линиях экспрессия всех исследованных (кроме *chr106*) генов была подавлена. А в эндосперме партеногенетической линии АТ-3 спустя семь дней после опыления зарегистрирована экспрессия четырех (*dmt103*, *hdt104*, *hon101*, *chr106*) из 6 исследованных генов. В ЗМ и эндосперме партеногенетической линии АТ-3 через 3-7 дней после опыления наблюдается экспрессия гена *hdt104*, в то время как у контрольной линии его экспрессия подавлена. Работа выполнена по Программе фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы по теме «Исследование переноса ДНК-белковых комплексов в растительные и животные клетки» (№ гос. регистрации 01201359048) и при частичной поддержке гранта РФФИ № 18-016-00155.

Expression of DNA methylation genes in a parthenogenetic maize line

Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Moiseeva Ye.M., Gutorova O.V., Mazilov S.I., Chumakov M.I.

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

Angiosperms reproduce both sexually and asexually (apomictic reproduction). Study of the genetic mechanism regulating plant apomixis (seed reproduction without fertilization) and the application of this knowledge are a major trend in basic embryogenetics and an innovative to agricultural technology.

Parthenogenesis, development of the embryo from an unfertilized ovum, is an element of apomixis rarely observed in maize (frequency, as low as 0.01%). However, in some selected maize lines, this percentage may be higher (up to 0.05-0.1%), compared to normal lines. Several genes controlling DNA methylation in maize (*dmt102*, *dmt103*, *dmt105*, *hdt104*, *chr106*, and *hon101*) have qualitative differences at expression in three stages of development [sporogenesis, mature embryonic sac before fertilization, and early embryogenesis (3 days after fertilization)]. We obtained for the first time experimental data on the DNA methylation gene expression in the parthenogenetic proembryos of the AT-3 line. In particular, data were obtained on the expression of DNA methylation genes (*dmt102*, *dmt103*, *hdt104*, *hon101*, and *chr106*) in the maize female generative tissue (before and after fertilization) of the AT-3 and S-32 lines. We did not observe any differences in the expression of DNA methylation genes in the maize ovaries (except for the *dmt102* gene) three to seven days after fertilization either in the AT-3 line or in the control lines. The expression of all the genes (except *chr106*) in the embryos of the AT-3 and control lines was suppressed seven days after pollination. The expression of four (*dmt103*, *hdt104*, *hon101*, *chr106*) of the sex investigated genes in the endosperm of the AT-3 parthenogenetic line was recorded seven days after pollination. Expression of the *hdt104* gene was observed in the embryonic sacs and endosperm of the AT-3 line, while in the control line, its expression was suppressed three to seven days after pollination.

This work was carried out under the fundamental research program of the Russian Academy of Sciences (№ 01201359048, 2013-2020) and in part by RFBR grant (18-016-00155).

Микробно-растительный сигналинг в условиях магнитного облучения

¹Воробьев Н.И., ¹Пухальский Я.В., ¹Белимов А.А., ²Пищик В.Н., ¹Свиридова О.В., ³Толмачев С.Ю.

¹ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург-Пушкин, Россия

²ФГБНУ Агрофизический НИИ, Санкт-Петербург, Россия

³АННО «Международный институт ноосферных технологий», Москва, Россия

E-mail: Nik.IvanVorobyov@yandex.ru

Изучается блокировка магнитными полями межкомпонентной молекулярной сигнализации в биосистеме «бактерии *Sphingomonas* sp. K1b - растения гороха». Межкомпонентные каналы сигнализации в биосистеме защищаются конформационным тестом. В этих каналах сигналы проходят только тогда, когда пространственные структуры (конформации) химических реагентов совпадают в соответствии с схемой «ключ-замок». Магнитные поля могут оказывать резонансное воздействие на спины атомов сигнальных молекул и рецепторов, что может привести к изменению конформации этих молекул. Из-за конформационных изменений молекулярные сигналы могут не пройти рецепторный тест и заблокироваться, что прекращает растительно-бактериальные взаимодействия. Для подтверждения этого эффекта был проведен эксперимент с бактериями *Sphingomonas* sp. K1B и растениями гороха. Фитогормоны бактерий *Sphingomonas* sp. K1b влияют на синтез этилена в растениях и ингибируют развитие корневой системы этих растений. В проведенном исследовании растения гороха выращивались на гидропонике (5 сосудов по 4 растения в каждом варианте опыта). Химический состав стерилизованного питательного раствора: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; K_2HPO_4 ; MgSO_4 ; CaCl_2 ; KCl ; KNO_3 ; $\text{FeC}_4\text{H}_4\text{O}_6$; микроэлементы. В контрольном варианте №1 растения выращивались без внешних воздействий. В варианте №2 и №4 бактерии *Sphingomonas* sp. K1B вводятся в питательный раствор (10^5 кл/мл). В варианте №3 и №4 растения гороха вместе с сосудами помещались (на одну минуту в сутки) в магнитное поле, генерируемое специальным устройством (40-100 мТл). Эксперимент показал, что средние массы влажных корней гороха в вариантах №1, №3 и №4 близки (453, 539 и 510 мг/раст.; SE=10 мг/раст.), а в варианте №2 существенно меньше (202 мг/растение; SE=10 мг/раст.). Различие масс корней растений гороха в вариантах №2 и №4 доказывает, что магнитного поля могут блокировать ингибирующие процессы в растениях, инициированные бактериями. Таким образом, растительно-бактериальный сигналинг в микробно-растительных биосистемах оказывается чувствительным к внешним воздействиям, если при этом изменяется пространственная конформация бактериальных сигнальных молекул и растительных рецепторов.

Plant-microbial signaling in the conditions of the magnetic irradiation

Vorobyov N.I., Puhalsky Ya.V., Belimov A.A., Pishchik V.N., Sviridova O.V., Tolmachev S.Yu.

¹All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia

²Agrophysical Research Institute, Saint-Petersburg, Russia

³ANSO "International Institute of Noosphere Technologies", Moscow, Russia

The blocking by magnetic fields of intercomponent molecular signaling in the biosystem "bacteria *Sphingomonas* sp. K1b - pea plants" has studied. Intercomponent signaling channels in the biosystem are protect by a conformational test. In these channels signals pass only when the spatial structures (conformation) of chemical reagents coincide in accordance with the "key-castle" scheme. Magnetic fields can have a resonant effect on the atomic spins of signal molecules and receptors, which can lead to a change in the conformation of these molecules. Due to conformational changes molecular signals may not pass the receptor test and become blocked which stops the plant-bacterial interactions. To confirm this effect the experiment conducted with bacteria *Sphingomonas* sp. K1B and with pea plants. Phytohormones of bacteria *Sphingomonas* sp. K1b affect to the synthesis of ethylene in plants and inhibit the development of the root system of these plants. In this study, the pea plants on hydroponics were grown (5 vessels with 4 plants in each variant of the experiment). The chemical composition of the sterilized nutrient solution: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; K_2HPO_4 ; MgSO_4 ; CaCl_2 ; KCl ; KNO_3 ; $\text{FeC}_4\text{H}_4\text{O}_6$; microelements. In the control variant No. 1, the plants without external influences were grown. In variants No. 2 and No. 4, bacteria *Sphingomonas* sp. K1B introduce into the nutrient solution (10^5 cells / ml). In variant No. 3 and No. 4 pea plants along with the vessels were placed (for one minute per day) in a magnetic field generated by a special device (40-100 mT). The experiment was showed that the average masses of wet pea roots in variants No. 1, No. 3 and No. 4 are close (453, 539 and 510 mg / plant, SE = 10 mg / plant), and in variant No. 2 it is much smaller (202 mg / plant SE = 10 mg / plant). The difference in the mass of roots of pea plants in variants No. 2 and No. 4 proves that the magnetic field can block inhibitory processes in plants initiated by bacteria. Thus, plant-bacterial signaling in plant-microbial biosystems is sensitive to external influences, if the spatial conformation of bacterial signal molecules and plant receptors change.

Колонизация проростков пшеницы солетолерантными бактериями

Гильванова Е.А.

Уфимский институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, Россия

E-mail: gelena@anrb.ru

В работе была поставлена задача поиска микроорганизмов, способных колонизировать проростки пшеницы на ранних этапах развития, среди представителей умеренно галофильных бактерий. Четыре испытуемых штамма бактерий принадлежат к разным таксонам: IB-16 – к граммотрицательным обитателям соленых мест и озер – *Halomonas*; IB-256 и IB-B8 – к солелюбивым грамположительным бациллам *Virgibacillus* и *Oceanobacillus*, соответственно; культура IB-16C относится к нормафильным бактериям и является представителем денитрифицирующих псевдо-монад *Pseudomonas stutzeri* (встречающаяся в морских экосистемах и ризосфере, и способная к росту в присутствии 2% NaCl). Семена пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Омская 35 стерилизовали и обрабатывали суспензией клеток, создавая титр 10⁶ КОЕ/зерно для культур IB-16, IB-256 и IB-B8, и 10⁷ для IB-16C. Опыт был выполнен в двух вариантах: без внесения NaCl (S-), и на фоне 100 мМ NaCl (S+), (0,6%). Оценивали всхожесть, бактериальный титр (КОЕ) на обработанных семенах и титр на корнях (КОЕ/1 г сух. корня) на 4 сутки. Анализ плотности популяции IB-16 из гомогената корней выявил, что данная бактериальная культура увеличила свой титр на порядок в варианте S- (4,3*10⁷) и на два порядка (108) в варианте S+, что указывает на явное предпочтение условий с повышенным фоном засоленности для развития этой культуры. В случае инокуляции штаммом IB-16C наблюдали увеличение плотности популяции на корнях проростках более чем на порядок в обоих вариантах опыта S- и S+, что свидетельствует о более широком диапазоне роста культуры, не зависящем от присутствия NaCl, в отличие от IB-16. Титр галотолерантных бацилл IB-256 и IB-B8 к 4-м суткам мало изменился, и было зафиксировано лишь четырехкратное увеличение плотности популяции у штамма IB-256 в варианте S+. Возможную задержку роста у грамположительных инокулянтов можно объяснить низким содержанием соли в варианте опыта S+(0,6%), что не соответствует ее оптимальной концентрации для развития и достижения максимальной плотности культуры. Всхожесть семян, обработанных штаммом IB-B8, была сравнима с контролем в варианте S-, а на фоне засоления наблюдалось достоверное снижение всхожести на 10%. Во всех остальных вариантах обработки семян наблюдали увеличение всхожести на 4-6% и 8-10% для S- и S+ соответственно. Таким образом, определен характер развития трех умеренно галофильных и одного нормафильного штаммов на корнях пшеницы. Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ, проект №18-04-00577 А.

Colonization of wheat seedling with salt tolerant bacteria

Gilvanova E.A.

Ufa Institute of Biology UFRC RAS, Ufa, Russia

The task was to search moderately halophilic bacteria capable of colonizing wheat seedlings in the early stages of development. Four test strains of bacteria belong to different taxa: IB-16 - to Gram-negative inhabitants of saline places and lakes - *Halomonas*; IB-256 and IB-B8 - to the salt loving gram-positive bacilli *Virgibacillus* and *Oceanobacillus*, respectively; culture IB-16C is a representative of the denitrifying pseudomonads *Pseudomonas stutzeri*. Seeds of wheat *Triticum aestivum* L. cv Omskaya 35 were sterilized and treated with a cell suspension, creating a titer of 10⁶ CFU / grain for IB-16, IB-256 and IB-B8, and 10⁷ for IB-16C. The experiment was performed in two variants: without NaCl (S-), and on the background of 100 mM NaCl (S+). The germination capacity, bacterial titer (CFU) on the treated seeds and the titer on the roots (CFU/1g dry root) after 4 days were assessed. Analysis of the density of the IB-16 population from the root homogenate revealed that this bacterial culture increased its titer by 10 folds in the S- (4.3*10⁷) variant and by 100 folds (108) in the S+ variant, indicating a clear preference for the conditions with an increased salinity for the development of this culture. In the case of inoculation with strain IB-16C, the population density at the roots of seedlings was increased by more than an order of magnitude in both variants of the S- and S+ experiments, which indicates a wider range of culture growth, independent of the presence of NaCl, unlike IB-16. The titer of halotolerant IB-256 and IB-B8 bacilli on the 4th day has changed little, and only a four-fold increase in the population density of the strain IB-256 in the S+ variant was observed. Possible growth retardation of Gram-positive inoculants can be explained by the low salt content of the variant S+ (0.6%), which does not correspond to its optimum concentration for development and achieve maximum culture density. The germination of seeds treated with IB-B8 was comparable to the control in variant S-, while under salinity, a significant decrease in germination by 10% was observed. In all other variants of seed treatment, an increase in germination was observed at 4-6% and 8-10% for S- and S+, respectively. Thus, the character of the development of three moderately halophilic and one normaphilic strain on the roots of wheat was determined. The possibility of successful colonization of marine inhabitants of the genus *Halomonas* on the wheat roots with a preference for growth under conditions of salinity is shown for the first time. The study was carried out with the partial financial support of the RFBR in the framework of the scientific project No. 18-04-00577 A.

Изучение биологических свойств новых штаммов грибов Триходерма, выделенных из почвы Уфимского района

Гильмаева А.В.

ООО "НВП "БашИнком", Уфа, Россия

E-mail: saimonnord@yandex.ru

В настоящее время в развитии ресурсосберегающих технологий в сельском хозяйстве представители рода *Trichoderma* являются одними из наиболее перспективных. Грибы рода *Trichoderma* широко распространены в окружающей среде и являются продуцентами большого количества ферментов (целлюлаз, хитиназ и др.), используемых в различных отраслях промышленности, для компостирования отходов, получения кормовых препаратов, а также для разработки препаратов – биофунгицидов, которые контролируют болезни и стимулируют рост растений. В связи с вышесказанным огромный практический интерес представляет анализ распространенности и выделение грибов рода *Trichoderma* на территории Республики Башкортостан, а также возможности их использования в производстве биопрепаратов для сельскохозяйственной промышленности. Выделение грибов проводили методом почвенного разведения с последующим высевом на питательные среды: картофельно-глюкозный агар (КГА), среда Чапека и полусинтетическая среда (ПСС). При идентификации почвенных изолятов на основе культурально-морфологических и молекулярно-генетических методов нами выявлено 2 вида: *T. longibrachiatum* и *T. artroviride*. Была проведена оценка целлюлозолитической активности методом разложения целлюлозных фильтров при 37°C, антагонистическая активность в отношении фитопатогенных грибов *Fusarium oxysporum* и *Helminthosporium sativum* методом лунок. В связи с разным спектром антагонистической активности 2-х видов триходерм к фитопатогенам, была проанализирована их межштаммовая антагонистическая активность методом совместного культивирования на твердой питательной среде ПСС. Отсутствие межштаммового антагонизма важно при создании препаратов на основе нескольких штаммов. Для наработки производственной биомассы были опробованы два вида питательных сред: ПСС и КГА (агаризованные и жидкие). Культивирование проводилось как в условиях аэрации, так и в её отсутствии. В результате проведенных исследований получены чистые культуры штаммов *T. longibrachiatum* и *T. artroviride*, проведена их паспортизация в ВКПМ, установлено отсутствие межштаммового антагонизма и выявлен спектр антагонистической активности к фитопатогенным грибам. Подобраны оптимальные условия для наработки производственной биомассы штаммов. Получены экспериментальные серии биопрепарата на основе выделенных грибов *Trichoderma*, предназначенного для использования в качестве биофунгицида и разложения пожнивных остатков.

Study of biological properties of new *Trichoderma* fungus strains, recovered from soil in Ufimsky district

Gilmaeva A.V.

ООО "NVP" BashInkom" Ufa, Russia

At the present time, *Trichoderma* is one of the most prospective species in the development of agricultural resource-saving technologies. *Trichoderma* fungi are widely spread in the environment producing a large number of enzymes (cellulase, chitinase, etc.) which are used in different industrial fields for waste composting, new feed products, as well as for development of biofungicides which control illnesses and boost plant growth. With reference to the above-mentioned facts, the analysis of abundance and recovery of *Trichoderma* fungi in the Bashkortostan Republic, as well as opportunities to use them in agricultural biopreparation production are of great practical interest. Fungi were recovered through soil dilution with further seeding to culture media: potato-glucose agar, Czapek's medium and semisynthetic medium. In the process of identification of soil isolates based on culture morphological and molecular genetic methods we elicited two types: *T. longibrachiatum* and *T. artroviride*. We have assessed the cellulose lytic activity with the help of the method of cellulose filter decomposition under 37°C and antagonist activity in the relation to plant pathogenic fungi *Fusarium oxysporum* and *Helminthosporium sativum* with volume displacement method. In connection with the different spectrum of antagonistic activity of 2 trichoderm species to phytopathogens, their inter-strain antagonistic activity was analyzed by the method of co-cultivation on a solid nutrient medium of semisynthetic medium. The absence of inter-strain antagonism is important when creating preparations based on several strains. Two types of culture media were tested for the production of industrial biomass: culture media semisynthetic medium and potato-glucose agar (agar and liquid). The cultivation was carried out both under the conditions of aeration and in its absence. As a result of the conducted research we have received pure cultures of *T. longibrachiatum* and *T. artroviride* strains, which were certified in RNCIM (Russian National Collection of Industrial Microorganisms), defined absence of inter-strain antagonism and the antagonistic activity spectrum to plant pathogenic fungi as well as selected optimal conditions for industrial strain biomass run. We have also received experimental series of biopreparation based on recovered *Trichoderma* fungi which can be used as biofungicides and decomposition of residues.

Хозяйская специфичность микросимбионтов реликтового бобового *Vavilovia formosa*

¹Гладков Г.В., ¹Кимеклис А.К., ¹Онищук О.П., ¹Курчак О.Н., ¹Пухальский Я.В., ¹Сафронова В.И., ¹Белимов А.А.,
^{1,2,3}Андронов Е.Е., ¹Проворов Н.А.

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

²Почвенный институт имени В. В. Докучаева Российской академии наук, Москва, Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра Генетики и Биотехнологии, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: ruginodis@gmail.com

Вавиловия прекрасная (*Vavilovia formosa* (Stev.) An. Fed) произрастает в горных регионах Кавказа и Передней Азии является близким видом к анцестральным формам бобовых и реликтовым представителем трибы *Fabea*, обладающим набором специфических и малоизученных микросимбионтов. Нашей исследовательской группой была создана коллекция микросимбионтов вавиловии и проведен генетический анализ разнообразия их симбиотических генов. Было показано, что изученные быстрорастущие штаммы вавиловии формируют обособленный симбиотип внутри вида *Rhizobium leguminosarum*. Четыре штамма вавиловии были исследованы нами по хозяйской специфичности относительно двух контрольных широкоспецифичных штаммов микросимбионтов гороха. Для этого, в условиях стерильного микровегетационного опыта штаммами были инокулированы десять видов бобовых растений из трибы *Fabea* (*Pisum sativum* cv. Afghanistan, *Pisum sativum* SGE, *Vicia alpestris*, *Vicia sativa*, *Vicia villosa*, *Lathyrus sylvestris*, *Lathyrus pratensis*, *Lens nigricans*, *Lens culinaris*, *Vavilovia formosa*). Несмотря на то, что микросимбионты вавиловии формировали клубеньки на широком спектре исследованных растений, как и контрольные штаммы гороха, оценка эффективности их азотфиксации методом ацетиленредукции показала, что у трех штаммов концентрация этилена для большинства растений была значительно ниже, чем для контроля (разница в концентрации этилена в некоторых случаях составляла больше порядка). В то же время для некоторых растений (*V. formosa*, *V. alpestris*) ацетиленредукция происходила так же активно, как и для микросимбионтов гороха. Таким образом, эффективный симбиоз наблюдался только с отдельными видами бобовых растений трибы *Fabia*. Полученные результаты показывают, что микросимбионты вавиловии обладают значительно более узкой хозяйской специфичностью, чем микросимбионты гороха, которые способны образовывать эффективный симбиоз с большей частью изученных нами растений. Эти данные будут использованы для выявления взаимосвязи между специфичностью бобово-ризобияльного симбиоза Вавиловии прекрасной и результатами геномного сиквенирования изученных штаммов вавиловии. Данное исследование поддержано грантом РФФИ 18-316-00124.

Host specificities of microsymbionts relic legumes *Vavilovia formosa*

¹Gladkov G.V., ¹Kimeklis A.K., ¹Onishchuk O.P., ¹Kurchak O.N., ¹Puhalsky Ya.V., ¹Safronova V.I., ¹Belimov A.A.,
^{1,2,3}Andronov E.E., ¹Provorov N.A.

¹All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia

²V.V. Dokuchaev Soil Science Institute of Russian Academy of Science, Moscow, Russia

³Saint-Petersburg State University, department of Genetics and Biotechnology, St. Petersburg, Russia

Vavilovia formosa (Stev.) An. Fed grows in the mountain regions of the Caucasus and the Near East and it is close to the ancestral forms of legumes of the tribe *Fabeae*. *Vavilovia* has a set of specific and poorly studied microsymbionts. Our research team created a collection of microsymbionts of *vavilovia* and carried out a genetic analysis of the diversity of their symbiotic genes. It was shown that the studied fast-growing strains of *vavilovia* form an isolated symbiovar inside the species *Rhizobium leguminosarum*. Host specificity of four strains of *vavilovia* were investigated with respect to two control broadly specific strains of pea microsymbionts. Ten species of leguminous plants from the tribe *Fabea* (*Pisum sativum* cf. Afghanistan, *Pisum sativum* SGE, *Vicia alpestris*, *Vicia sativa*, *Vicia villosa*, *Lathyrus sylvestris*, *Lathyrus pratensis*, *Lens nigricans*, *Lens culinaris*, *Vavilovia formosa*) were inoculated in the tube-test. *Vavilovia* microsymbionts formed nodules on a wide range of investigated plants, the same as control pea strains. Herewith, the evaluation of their nitrogen fixation efficiency by acetylene reduction showed that for three strains the concentration of ethylene produced by nodules was much lower than for the control (difference in ethylene concentration in some cases was more than tenfold). At the same time, for some plants (*V. formosa*, *V. alpestris*), acetylene reduction as high as microsymbionts of peas. Thus, an effective symbiosis was observed only with individual species of legume plants of the tribe *Fabeae*. The obtained results show that the microsymbionts of *vavilovia* have narrower host specificity than the microsymbionts of peas, which are able to form an effective symbiosis with most of the plants we studied. This data will be used to reveal the relationship between the specificity of *Vavilovia*'s legume-rhizobia symbiosis and the results of genome sequencing of the studied strains of *vavilovia*. This study was supported by the RFBR grant 18-316-00124.

Некодирующие РНК, как регуляторы экспрессии генов

¹Гоголев Ю.В., ²Миронычева А.А., ¹Осипова Е.В., ¹Ковтунов Е.А., ²Ермекалиев Т.С., ²Исмаилов Т.Т., ¹Гоголева Н.Е.

¹Казанский институт биохимии и биофизики - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр Российской академии наук", Казань, Россия

²Казанский федеральный университет, Казань, Россия

E-mail: gogolev.yuri@gmail.com

Высокопроизводительное секвенирование РНК выявило гораздо большую сложность спектра РНК у широкого ряда организмов, чем предполагалось ранее. В частности, анализ транскриптомов нескольких видов бактерий показал, что количество малых РНК и антисмысловых транскриптов было в значительной степени недооценено. В то же время, одним из наиболее обсуждаемых вопросов в области транскриптомики является функциональность некодирующих транскриптов (нкРНК). Согласно одной из точек зрения, эта РНК является транскрипционным шумом и побочным продуктом, возникающим вследствие «протекания» репрессии неспецифической транскрипции. Однако многие исследования показали, что нкРНК в значительной степени способствуют посттранскрипционному контролю экспрессии генов. Бактериальные регуляторные РНК в основном контролируют трансляцию или распад мРНК, но некоторые также связывают белки и тем самым изменяют функцию белка. Большинство бактериальных регуляторных РНК кодируются в геномных локусах, удаленных от их генов-мишеней, и при этом проявляют только частичную комплементарность к своим мРНК-мишеням. Однако небольшое количество нкРНК транскрибируется с обратной комплементарной цепи аннотированного гена и, следовательно, полностью или частично перекрывается с потенциальными мишенями.

Нами был использован новый метод Cappable-Seq для анализа сайтов старта транскрипции (TSS) фитопатогенной бактерии *Pectobacterium atrosepticum*. Как и ожидалось, значительная часть транскрипционной активности соответствовала предсказаниям на основании аннотации генома. Вместе с тем, была показана транскрипционная активность в областях генома, несовпадающих с аннотацией. Важно отметить, что изменения профилей транскрипции мРНК и эпигенетического состояния генома, особенно промоторных областях, могут быть связаны с изменениями транскрипции некодирующей РНК, определенной путем количественного анализа активности TSS. Также мы определили, что у *P. atrosepticum* конвергентная транскрипция является механизмом регулирования системы кворум-сенсинга.

Биоинформатическая часть работы поддержана грантом РФФ 17-14-01363. Исследования *P. atrosepticum* поддержаны грантом РФФИ 17-04-01908.

Noncoding RNAs as regulators of gene expression

¹Gogolev Y.V., ²Mironycheva A.A., ¹Osipova E.V., ¹Kovtunov E.A., ²Ermekkaliev T.S., ²Ismailov T.T., ¹Gogoleva N.E.

¹Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia

Kazan Federal University, Kazan, Russia

High-throughput sequencing of RNA in a wide array of organisms have revealed a far more complex network of RNAs than previously appreciated. In particular transcriptome analyses of several bacterial species have uncovered a hitherto unappreciated amount of small RNAs and antisense transcripts. However, one of the most highly debated questions in the field of transcriptomics is the functionality of non-coding transcripts. According to one viewpoint, these transcripts are merely transcriptional noise and a byproduct of the leakiness of transcriptional repression. However, many studies have shown that ncRNAs crucially contribute to post-transcriptional control of gene expression. Bacterial regulatory RNAs mainly control mRNA translation or decay, but some also bind proteins and thereby modify protein function. The majority of bacterial regulatory RNAs are encoded at genomic locations far away from their target genes and exhibit only partial base complementarity to their mRNA targets. However, a small number ones are transcribed from the reverse complementary strand of an annotated gene and hence these fully or partially overlap with their potential targets. We applied a new Cappable-seq method for analyzing transcription start sites (TSS) in a phytopathogenic bacterium *Pectobacterium atrosepticum*. As expected, most transcriptional activity was consistent with predictions from the genome annotation. At the same time, we identified transcriptional activity in areas of the genome inconsistent with the annotation. It is important to note that changes in mRNAs transcription profiles and epigenetic genome states, notably at promoters, can be associated with changes in transcription of non-coding RNA by quantifying TSS activity. Also we have determined that in *P. atrosepticum* the convergent transcription is the mechanism of quorum sensing regulation. The bioinformatic part of the work is supported by the Russian Science Foundation (project No. 17-14-01363). Studies of *P. atrosepticum* are supported by a grant 17-04-01908 from the RFBR.

Растительно-микробный диалог при построении патосистем

¹Гоголев Ю.В., ¹Горшков В.Ю., ¹Петрова О.Е., ¹Даминова А.Г., ¹Осипова Е.В., ¹Губаев Р.Ф., ¹Тарасова Н.Б.,
²Ермекалиев Т.С., ²Миropyчева А.А., ¹Гоголева Н.Е.

¹КИББ ФИЦ КазРЦ РАН, г. Казань

²Казанский Федеральный университет, Казань, Россия

E-mail: gogolev.yuri@gmail.com

Изучение растительно-микробных сообществ в последние десятилетия выявило высокую степень взаимозависимости микро- и макроорганизмов. Значительно изменилось наше представление о формах их совместного существования и способах кооперации. Глубокое изучение бобово-ризобияльного симбиоза и других специализированных систем было дополнено исследованием эпифитов, эндофитов и ризосферной микробиоты, выполняющих разнообразные функции и, в совокупности, играющих ключевую роль в адаптации и продуктивности растений. В результате сложилось представление о полезной микрофлоре. Эта микрофлора с одной стороны улучшает минеральное питание растений и обеспечивает биопротекторные свойства, а с другой, пользуется программами поддержки, такими как корневая экссудация. Загадкой остаются сведения о том, что часто вирулентные формы так же пользуются поддержкой растений. Это относится к биотрофным эндофитным грибам, микоплазмам, ралстониям, оомицетам, некоторым нематодам. Более того, эти механизмы могут быть задействованы при построении растительно-микробных патосистем с некротрофными патогенами. По крайней мере некоторые из них формируются в результате физиологической интеграции растений и микроорганизмов, основанной на взаимной адаптации партнеров к длительному сосуществованию. Так, в геноме возбудителей мокрых гнилей были выявлены гены, характерные для биотрофных патогенов, что свидетельствует о способности этих бактерий к кросс-толку с растениями. Результатом какого взаимодействия служит латентная инфекция, а соответствующее ей состояние макроорганизма представляет собой носительство. Вероятно, именно носительство является наиболее распространенной формой инфекции и служит естественным резервуаром патогенов и полигоном для выработки и распространения у них новых факторов вирулентности и устойчивости, в том числе, устойчивости к антибиотикам. Явление носительства уже долгое время является предметом пристального изучения. Показана его роль в развитии и поддержании иммунного статуса макроорганизма. Однако, некоторые новые аспекты, выявленные в последнее время, позволяют рассматривать патосистемы как неотъемлемую часть сложных сообществ и указывают на их возможное более существенное эволюционное и экологическое значение. Работа поддержана грантом РФФ №17-14-01363 (биоинформатический анализ). Изучение мокрых гнилей проводилось при поддержке грантом РФФИ №17-04-01908.

Plant-microbial dialogue in the formation of pathosystems

¹Gogolev Y., ¹Gorshkov V., ¹Petrova O., ¹Daminova A., ¹Osipova E., ¹Gubaev R., ¹Tarasova N., ²Ermekkaliev T., ²Mironycheva A., ¹Gogoileva N.

¹Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics Federal Research Center "Kazan Scientific Center" Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

²Kazan Federal University, Kazan, Russia

The study of plant-microbial communities in recent decades has revealed a high degree of interdependence between micro- and macroorganisms. Our idea of the forms of their joint existence and ways of cooperation has been significantly changed. A detailed investigation of the legume-rhizobia symbiosis and other specialized systems was supplemented by the study of epiphytes, endophytes and rhizosphere microbiota, which performing various functions and, in total, playing a key role in the adaptation and productivity of plants. As a result, the idea of a useful microflora was developed. This microflora on one hand improves the mineral nutrition of plants and provides bioprotective properties, and on the other hand, it uses support programs, such as a root exudation. The riddle is the information that virulent forms often have support too. This applies to biotrophic endophytic fungi, mycoplasmas, ralstonias, oomycetes, and some nematodes. Moreover, these mechanisms can be involved in the formation of plant-microbial pathosystems with necrotrophic pathogens. At least some of them are formed as a result of physiological integration of plants and microorganisms based on mutual adaptation of partners to long-term coexistence. The presence of genes characteristic of biotrophic pathogens in the genome of pathogens of soft rot has been revealed, which indicates the ability of these bacteria to cross-talk with plants. The result of which interaction is a latent infection and the corresponding state of the macroorganism is a carriage. It is likely that carriage is the most common form of infection and serves as a natural reservoir of pathogens and a shooting range for the development and spread of new virulence and resistance factors, including resistance to antibiotics. The phenomenon of carriage has long been the subject of close study. The role of carriage in the development and maintenance of the immune status of the macroorganism has been shown. However, some new aspects recently revealed allow to consider pathosystems as an integral part of complex communities and point to their possible more important evolutionary and ecological significance. This study was supported by the Russian Science Foundation, project no. 17-14-01363 (bioinformatic analysis). The study of soft rot was carried out with the support of the Russian Foundation for Basic Research, project no. 17-04-01908.

Эффективная экспрессия гетерологичных генов в растениях: проблемы и современные подходы их решения

Голденкова-Павлова И. В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева
РАН, Москва, Россия*E-mail: irengold58@gmail.com*

Создание экспериментальных моделей трансгенных растений для функциональной геномики, как и успех в создании новых форм растений с заданными свойствами или использовании их в качестве перспективных продуцентов, зависят от эффективности работы перенесенных генов. Эффективность экспрессии генов регулируется на разных этапах: транскрипции, трансляции, и стабильности белкового продукта переносимого гена, каждый из которых может стать лимитирующим звеном его эффективной экспрессии. Таким образом, основная задача исследователя – обеспечить контроль за экспрессией гетерологичного гена на всех этапах реализации генетической информации. Уровнем транскрипции гетерологичного гена исследователь может управлять за счет промоторных и энхансерных последовательностей. Помимо этого, эффективность транскрипции может быть точно оценена разнообразными методами ПЦР, ставшими уже классическими. Однако крайне непросто контролировать эффективность трансляции мРНК и стабильность белкового продукта гетерологичного гена, поскольку о регуляции на уровне трансляции и стабильности белка известно значительно меньше. Согласно текущему мнению, основанному на экспериментальных данных – корреляция между уровнями мРНК и белка более, чем скромная, т.е. изменение уровня мРНК конкретного гена не обязательно приводит к ожидаемому изменению уровня соответствующего белка.

Несмотря на сложность трансляционного контроля индивидуальных мРНК, в ходе выполнения транскриптомных и протеомных проектов достигнуты несомненные успехи в прояснении тонкой регуляции эффективности трансляции мРНК и стабильности белков. Современные подходы обеспечения эффективной экспрессии гетерологичных генов в растениях на всех этапах реализации генетической информации будут освещены в докладе. Кратко, такие подходы основаны на поиске, *in silico* анализе, конструировании и апробировании генетических детерминант, которые обуславливали бы не только эффективную, но и оптимальную экспрессию целевых генов в растениях, а также стабильность их белковых продуктов. И поскольку белковые продукты имеют критическое значение для жизнедеятельности организма в целом, использование знаний о механизмах регуляции эффективности трансляции мРНК и стабильности белкового продукта является исключительно важным для их практического применения при создании трансгенных растений для фундаментальных и прикладных исследований.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-04-00783_a.

Effective expression of heterologous genes in plants: problems and modern approaches to their solution

Goldenkova-Pavlova I.V.

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia

The creation of experimental models of transgenic plants for functional genomics, as well as the success in creating new plant forms with given properties or using them as promising producers, depend on the efficiency of the transferred genes. The efficiency of gene expression is regulated at different stages: transcription, translation, and stability of the protein product of the heterologous gene, each of which can become a limiting stage of its effective expression. Thus, the main task of the researcher is to control the expression of the heterologous gene at all stages of the genetic information realization. The level of transcription of the heterologous gene can be controlled by the promoter and enhancer sequences. In addition, the effectiveness of transcription can be accurately assessed by a variety of PCR techniques that have become classic. However, it is extremely difficult to control the efficiency of mRNA translation and the stability of the protein product of the heterologous gene, since much less is known about regulation at the translation level and protein stability. According to the current opinion, based on experimental data - the correlation between mRNA and protein levels is more than modest, i.e. a change in mRNA level of a particular gene does not necessarily lead to the expected change in the level of the corresponding protein.

Despite the complexity of the translational control of individual mRNAs, during the implementation of transcriptomic and proteomic projects, undoubted progress has been made in elucidating the fine regulation of mRNA translation efficiency and protein stability. Modern approaches to ensure effective expression of heterologous genes in plants at all stages of the implementation of genetic information will be covered in the report. Briefly, such approaches are based on the search for, *in silico* analysis, the design and verification of genetic determinants that would not only lead to an effective but also optimal expression of target genes in plants, as well as the stability of its protein products. And since protein products are of critical importance for the life of the organism as a whole, the use of knowledge about the mechanisms of regulating the efficiency of mRNA translation and the stability of the protein product is extremely important for their practical application in the creation of transgenic plants for basic and applied research. The work was supported by the RFBR grant No. 17-04-00783_a.

Укоренение смородины черной (*Ribes nigrum* L.) в культуре *in vitro*¹Головина Л.А.,²Ишмуратова М.М.¹ФГБНУ Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Уфа, Россия²Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

E-mail: ludmilab2010@mail.ru

На сегодняшний день клональное микроразмножение является перспективным способом получения посадочного материала смородины черной (*Ribes nigrum* L.). Одним из важных моментов в клональном микроразмножении является этап укоренения растений, полученных в условиях *in vitro*. Цель наших исследований - подобрать оптимальные условия для укоренения микропобегов смородины черной полученных в результате клонального микроразмножения *in vitro*. Объекты исследования – сорта смородины черной башкирской селекции Караидель и Чишма (включены в Госреестр по IX региону РФ), в качестве контроля использовали сорт Сеянец Голубки (выведен в НИИ Сибири им. М.А. Лисавенко), включенный в Госреестр по I-V, VII, IX, X, XI регионам РФ. Укоренение микропобегов (размеры 1,0 - 1,5 см) мультиплицированных *in vitro* и получение растений-регенерантов проводили в начале июня. В качестве питательной среды для укоренения использовали модифицированную питательную среду Мурасиге-Скуга (МС), pH 5,5-5,8. В качестве регулятора роста использовали индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) в концентрации 0,1 - 1,0 мг/л. Длительность пассирования микропобегов на питательной среде составила 21 день. Подобраны оптимальные концентрации ИУК в питательной среде культивирования на этапе укоренения микропобегов. Отмечено, что для укоренения микропобегов сортов смородины черной Сеянец Голубки и Чишма наиболее благоприятной является концентрация ИУК 0,75 мг/л, а для сорта Караидель предпочтительны низкие концентрации ИУК 0,1 - 0,25 мг/л. На развитие корневой системы растений-регенерантов положительно влияет концентрация ИУК 0,25 мг/л на всех изучаемых нами сортах. В вариантах с повышенной в питательной среде концентрацией ИУК от 0,5 мг/л до 1,0 мг/л отмечены максимальные приросты длины побега и максимальное число листьев у сортов смородины башкирской селекции. При этом на рост побега у сорта Сеянец Голубки позитивно влияют концентрации ИУК 0,1 - 0,25 мг/л. Оптимальные размеры микропобегов смородины черной башкирской селекции, используемые для укоренения в культуре *in vitro*, являются микрочеренки с длиной 1,0-1,5 см.

Rooting of black currant (*Ribes nigrum* L.) *in vitro*¹Golovina L.A.,²Ishmuratova M. M.¹FSBSI Ufa Federal Research Center of Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia²Bashkir state University, Ufa, Russia

To date, clonal micropropagation is a promising method of producing planting material of black currant (*Ribes nigrum* L.). One of the important points in the clonal micro-multiplication is the stage of rooting plants obtained *in vitro*. The purpose of our research is to find the optimal conditions for rooting black currant microbreeds obtained as a result of clonal micro - multiplication *in vitro*. Objects of research – varieties of black currant breeding Bashkir Karaidel and Chishma (included in the state register on the IX region of the Russian Federation) was used, as control variety is a Seedling of the Dove (bred in research Institute of Siberia to them. M. A. Lisavenko) included in the state register on the I-V, VII, IX, X, XI regions of the Russian Federation. Rooting of microbreeds (size 1,0 - 1,5 cm) multiplied *in vitro* and obtaining regenerative plants was carried out in early June. As a nutrient medium for rooting was used a modified nutrient Murashige-Skoog medium (MS), pH 5.5-5.8. As growth regulators used were indole-3-acetic acid (IAA) at a concentration of 0.1 - 1.0 mg/L. The duration of the passage of micropolygon on a nutrient medium was 21 days. The optimal concentration of IAA in the culture nutrient medium at the stage of rooting of micro-shoots is selected. It is noted that for rooting of micropolygon varieties of black currant Seedling Lovebirds and Chishma the most favourable is the IAA concentration 0.75 mg/l and for grades Karaidel the preferred low concentration of IAA 0.1 - 0.25 mg/L. The development of the root system of regenerant plants is positively influenced by the concentration of IAA of 0.25 mg/l on all the varieties studied by us. In variants with increased concentration of IAA in the nutrient medium from 0.5 mg/l to 1.0 mg/l, the maximum increments in the escape length and the maximum number of leaves in the varieties of the Bashkir currant breeding were noted. While on shoot growth in the variety, Seedling Lovebirds have a positive effect of IAA concentrations of 0.1 - 0.25 mg/L. The optimal sizes of microbreeds of black Bashkir currant breeding, used for rooting in culture *in vitro*, are micro-gears with a length of 1.0-1.5 cm.

Локализация пероксида водорода в клубеньках гороха

Горшков А.П., Цыганова А.В., Цыганов В.Е.

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: artemius1993@yandex.ru

Функционирование нитрогеназы – основного фермента азотфиксации – в симбиотических клубеньках происходит в микроаэробных условиях. Однако в результате физиологических процессов в клетках образуются многочисленные активные формы кислорода (АФК). Одной из наиболее распространенных АФК является пероксид водорода (H_2O_2), который, кроме того, играет важную роль в узнавании, сигналинге и иммунных ответах. Однако большинство исследований посвящены ранним стадиям инфекционного процесса, до формирования зрелого клубенька. Поэтому большой интерес представляет локализация H_2O_2 на поздних стадиях развития клубенька. При проведении цитохимического исследования было изучено распределение H_2O_2 в клубеньках гороха генотипов дикого типа Sparkle и Sprint-2, а также полученных на их основе мутантов E135F(sym13), формирующего клубеньки, в которых наблюдается преждевременная деградация симбиотических структур, Sprint-2Fix-(sym31), характеризующегося клубеньками с недифференцированными бактериоидами, двойной мутантной линии RBT(sym13,sym31), также формирующей клубеньки с недифференцированными бактериоидами.

В клубеньках гороха сорта Sparkle и линии Sprint-2 перекись водорода наблюдалась в клеточных стенках, стенках и матрике зрелых инфекционных нитей. Характер отложений пергидроксида церия зависел от зоны симбиотического клубенька. В клубеньках мутантов характер распределения перекиси водорода был аналогичен таковому у дикого типа, однако количество преципитатов пергидроксида церия было больше. Для мутанта Sprint-2Fix-(sym31) было характерно наличие преципитатов пергидроксида церия в ядрах, однако они отсутствовали у двойного мутанта RBT(sym13,sym31). Проведенный анализ позволяет предположить, что перекись водорода участвует в развитии инфекционной нити и дифференцировке бактериоидов. Заметное увеличение преципитатов пергидроксида церия в клубеньках мутантных линий указывает на преждевременную деградацию симбиотических структур при неэффективном симбиозе. Работа поддержана РНФ17-76-30016.

Localization of hydrogen peroxide in pea nodules

Gorshkov A.P., Tsyganova A.V. Tsyganov V.E.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia

Functioning of nitrogenase, which is the basic enzyme of nitrogen fixation in symbiotic nodules occurs in microaerobic conditions. However, as a result of physiological processes, numerous active oxygen species (ROS) are formed in the cells. One of the most common ROS is hydrogen peroxide (H_2O_2), which, in addition, plays an important role in recognition, signaling and immune responses. However, most studies focus on the early stages of infection, before the formation of the mature nodule. Therefore, localization of H_2O_2 at the late stages of nodule development is of great interest. During the cytochemical study, the distribution of H_2O_2 was studied in the nodules of pea wild type genotypes Sparkle and Sprint-2, as well as in the corresponding mutants E135F(sym13), forming nodules with a premature degradation of symbiotic structures, Sprint-2Fix-(sym31), characterized with nodules contained undifferentiated bacteroids, double mutant line RBT(sym13,sym31), also forming nodules with undifferentiated bacteroids. In the nodules of pea cultivar Sparkle and line Sprint-2 hydrogen peroxide was observed in the cell walls, walls and matrix of mature infection threads. The pattern of cerium peroxide depositions was dependent on the zone of the symbiotic nodule. In the nodule of mutants, the pattern of the hydrogen peroxide distribution was similar to wild type, but the amount of cerium peroxide precipitates was increased. The mutant Sprint-2Fix-(sym31) was characterized by the presence of cerium peroxide precipitates in nuclei; however, they were absent in the double mutant RBT(sym13, sym31). The performed analyses allow suggesting that hydrogen peroxide participates in the development of infection threads and the bacteroid differentiation. A noticeable increase in cerium peroxide precipitates in nodules of the mutant lines indicates a premature degradation of symbiotic structures during ineffective symbiosis. The study was supported by RSF 17-76-30016.

Влияние суспензии водорослей родов *Coelastrella/Scotiellopsis* на биологические свойства семян *Lepidium sativum* L.

Гостев Е.Ф., Аллагуватова Р.З., Кунсбаева Д.Ф., Губайдуллина Г.М., Ильчибаева К.В., Вильданова Г.И., Ломадзе С.В., Гайсина Л.А.

Башкирский государственный педагогический университет им.М.Акмоллы, Уфа, Россия

E-mail: lira.gaisina@mail.ru

Водоросли семейства *Scenedesmaceae* могут использоваться в качестве стимуляторов роста сельскохозяйственных растений, что подтверждается целым рядом публикаций. Целью исследования было изучение влияния суспензии штамма водоросли *Coelastrella/Scotiellopsis*, выделенного из почвы на территории Южно-Уральского региона. Штамм культивировали на жидкой питательной среде Болда. В опытах использовали 10-суточную суспензию водоросли. Для оценки воздействия культуральной жидкости на всхожесть семян *Lepidium sativum* L.- кресс-салата – проводили согласно стандартной методике с модификациями. В чашки Петри помещали по два слоя фильтровальной бумаги, после чего в них раскладывали по 20 семян и наливали по 10 мл суспензии водоросли. В каждой повторности эксперимента испытывали по 100 семян. Контролем служили семена, замоченные в жидкой среде Болда. Длительность эксперимента составляла 7 суток. Анализировали влияние суспензии на длину корешков, проростков и всхожесть семян. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica. Установлено, что в результате воздействия суспензии штамма *Coelastrella/Scotiellopsis* на семена кресс-салата всхожесть семян возросла с 59 до 82%. Использование суспензии водоросли приводило к достоверному по критерию Стьюдента увеличению средней длины корешков с 11,2 до 22,8 мм ($t=6,75$). В то же время, суспензия не оказала влияния на длину проростков. В контроле и опыте этот показатель был равен 16,7 мм. Таким образом, суспензия исследуемого штамма *Coelastrella/Scotiellopsis* оказала стимулирующее действие на всхожесть и длину корешков кресс-салата посевного, что доказывает перспективность использования этой водоросли как стимулятора роста сельскохозяйственных растений.

Influence of a suspension of algae *Coelastrella/Scotiellopsis* on the biological properties of the seeds of *Lepidium sativum* L.

Gostev E.F., Allaguvatova R. Z., Kunsbaeva D.F., Gubaidullina G.M., Ilchibaeva K.V., Vildanova G.I., Lomadze S.V., Gaysina L.A.

M. Akmullah Bashkir State Pedagogical University, Ufa, Russia

Algae of family *Scenedesmaceae* can be used as growth stimulants for agricultural plants, as evidenced by a number of publications. The aim of the study was to research the effect of a suspension of the *Coelastrella / Scotiellopsis* strain isolated from the soil in the South Ural region. The strain was cultured on Bold's basal liquid medium. Suspension of age of 10 days was used in the experiments. To assess the effect of the suspension on the germination capacity of *Lepidium sativum* L. seeds standard procedure with modifications were used. Two layers of filter paper were placed in Petri dishes, after that 20 seeds were spread on the paper and 10 ml of suspension were poured into them. In each replication of the experiment 100 seeds were tested. The control experiment seeds were poured by Bold's liquid medium. The duration of the experiment was 7 days. The effect of the suspension on the length of rootlets, seedlings and seed germination was analyzed. The statistical analysis of the results was carried out using Statistica program. It was found, that suspension of the *Coelastrella / Scotiellopsis* caused increase the cress-salad seeds germination from 59 to 82%. The use of a suspension of algae resulted in a significant increase in the mean length of rootlets by t-test from 11.2 to 22.8 mm ($t = 6.75$). At the same time, the suspension had no effect on the length of the seedlings. In control and experiment this indicator was equal to 16.7 mm. Thus, the suspension of the investigated *Coelastrella / Scotiellopsis* strain had a stimulating effect on the germination and rootlet length of the watercress seedlings, which proves the prospect this alga as a growth stimulator for agricultural plants.

Скрининг изолятов *Bacillus thuringiensis* (Bt) для создания экологически безопасных биологических инсектицидов

Гришечкина С.Д., Ермолова В.П., Романова Т.А., Антоненц К.С., Нижников А.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург, Россия

E-mail: svetagrishechkina@mail.ru

В настоящее время бактерии *Bacillus thuringiensis* (Bt) рассматриваются в качестве основы для производства биологических инсектицидных препаратов. Такие препараты обладают селективностью действия, безопасностью для человека, теплокровных животных, полезных насекомых и окружающей среды, в целом. Целью настоящего исследования явился скрининг новых эффективных изолятов Bt. Для проведения скрининга были собраны образцы почвы, листьев картофельной ботвы, больных и погибших насекомых, а также другие естественные субстраты, на которых может встречаться Bt. Методом истощающегося мазка был проведен рассев образцов из разных субстратов на рыбный агар. После анализа свыше 3500 выросших колоний по морфологическим признакам отобрали 86 индивидуальных клонов (изолятов), 12 из которых, наряду со спорами, формировали кристаллические эндотоксины разной формы. Выделенные микроорганизмы отбирали по признакам энтомоцидности и идентифицировали. Данное исследование позволило классифицировать выделенные бактерии как *B. thuringiensis* и объединить их в два сероварианта: H1 (var. *thuringiensis* клоны 5, 17, 28, 46, 82) и H10 (var. *darmstadiensis*, клоны 12, 15, 32, 35, 39, 48, 56). По биологическим характеристикам полученные изоляты оказались близкими к типовым штаммам. Титры отобранных изолятов серовариантов BtH1 и BtH10 варьировали в пределах $1,3 \times 10^9$ - $2,5 \times 10^9$ и $1,5 \times 10^9$ - $2,4 \times 10^9$ КОЕ/мл, соответственно. После селекции титр у изолятов № 17 BtH1 и № 56 BtH10 увеличились в 1,32 и 1,5, а содержание экзотоксина в 1,52 и 1,7 раза. Важной особенностью изолятов, отнесенных нами к сероварианту BtH10, была их полифункциональная (энтомоцидная и антифунгальная) активность. В целом, проведенные нами исследования показали возможность выделения эффективных изолятов Bt из различных природных субстратов. Были выделены изоляты двух серотипов *B. thuringiensis* (BtH1 и BtH10), обладающих энтомоцидной активностью. У полученных изолятов BtH10 было показано наличие полифункциональных свойств. Селекция позволила добиться существенного усиления этих хозяйственно значимых свойств. Работа поддержана проектом прикладных научных исследований и экспериментальных разработок (ПНИЭР) по лоту шифр 2017-14-579-0030 по теме: «Создание микробиологических препаратов для расширения адаптационного потенциала сельскохозяйственных культур по питанию, устойчивости к стрессам и фитопатогенам» (шифр заявки 2017-14-579-0030-013), соглашение № 14.607.21.0178, уникальный идентификатор работ (проекта) RFMEFI60717X0178.

Screening of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) isolates for developing of environmentally friendly biological insecticides

Grishechkina S.D., Ermolova V.P., Romanova T.A., Antonets K.S., Nizhnikov A.A.

Federal State Budget Scientific Institution "All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology", St. Petersburg, Russia

Currently, *Bacillus thuringiensis* (Bt) bacteria are considered to be promising for the development of biological insecticides. These agents have selectivity of action and are safe for humans, warm-blooded animals, beneficial insects and the environment. The goal of this study was to screen for new effective Bt isolates. For the screening, soil samples, leaves of potato, sick and dead insects, as well as other natural substrates on which Bt can be found, were collected. Samples were colony-purified on the plates with fish agar. After analysis of more than 3,500 colonies, 86 individual clones (isolates) were selected by their morphological features. 12 out of those 86 isolates, along with spores, formed crystalline endotoxins of different shapes. The isolates were selected by their entomocidal activity and identified. This study allowed to classify selected bacteria as *B. thuringiensis* and set them into two serovariants: H1 (var. *thuringiensis*, clones 5, 17, 28, 46, 82) and H10 (var. *darmstadiensis*, clones 12, 15, 32, 35, 39, 48, 56). According to their biological characteristics, the isolates obtained were close to typical strains. The titers of the selected isolates of the BtH1 and BtH10 serovariants varied between 1.3×10^9 - 2.5×10^9 and 1.5×10^9 - 2.4×10^9 CFU / ml, respectively. After selection, the titer of the 17 BtH1 and 56 BtH10 isolates increased by 1.32 and 1.5, and exotoxin content by 1.52 and 1.7 times. An important feature of the isolates classified as the BtH10 serovariant, was their polyfunctional (entomocidal and antifungal) activity.

Overall, this study demonstrated the possibility of isolating the effective Bt clones from various natural substrates. Isolates of two *B. thuringiensis* serotypes (BtH1 and BtH10) with entomocidal activity were selected. The obtained BtH10 isolates exhibited polyfunctional activity. Selection provided a significant increase in these agriculturally important properties. This work was supported by the project of applied research and experimental development (PNER) batch 2017-14-579-0030 on the topic: "Creation of microbiological preparations for expanding the adaptive capacity of agricultural crops for nutrition, resistance to stress and pathogens" (code of the application 2017-14-579-0030-013), Agreement No. 14.607.21.0178, a unique identifier (project) RFMEFI60717X0178.

Экспресс-анализ *azospirillum* при их инфекции бактериофагами в проводящих суспензиях акустическим датчиком

¹Гулий О.И., ²Зайцев Б.Д., ²Бородина И.А., ¹Каравая О.А.

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия.

²Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им В.А. Котельникова РАН, Саратов, Россия

E-mail: gulyi_olga@mail.ru

Важную роль в процессах азотфиксации играют грамотрицательные рост-стимулирующие бактерии рода *Azospirillum*. Среди азоспирилл наибольшее внимание исследователей привлекает вид *Azospirillum brasilense* как модельный объект при изучении ассоциативных и эндофитных ризосимбиозов, образуемых бактериями и высшими растениями. Состав и численность ассоциативной микрофлоры зависит от сезонных колебаний и антропогенных воздействий. Поэтому разработка методов, в том числе методов детекции клеток азоспирилл, позволяющих осуществлять мониторинг состава ризосферных бактерий, является одной из задач современной экологической микробиологии.

Вирусы бактерий, поражающие микробные клетки, могут быть использованы для детекции этих микроорганизмов. За счет рецепторов, расположенных на поверхности клетки, осуществляется узнавание и прикрепление бактериофагов к бактериальным клеткам. На этом основано большинство методов детекции микробных клеток с использованием бактериофагов, среди которых широкое распространение получили биосенсорные методы. В последнее время активно развиваются исследования по определению микробных клеток с использованием методов электроакустического анализа. Важным является определение микробных клеток в реальных образцах с различной электрической проводимостью. Высокая проводимость среды значительно затрудняет возможность определения клеток при их инфекции бактериофагами. В работе изучена возможность анализа бактериальных клеток на примере почвенных микроорганизмов *A. brasilense* штамма Sp7 при их инфекции специфичным бактериофагом ФАб-Sp7 с помощью акустического датчика непосредственно в суспензии с различной начальной электрической проводимостью. Анализ основан на измерении временной зависимости фазы и полных потерь выходных сигналов датчика на фиксированной частоте до и после биологического взаимодействия микробные клетки – бактериофаги. Результаты показали, что бактериофаг ФАб-Sp7 можно использовать для определения микробных клеток азоспирилл методом электроакустического анализа. Показано, что проводимость буферного раствора не должна превышать 10^{-3} См/см, а минимальная определяемая концентрация микробных клеток составляет $\sim 10^4$ кл/мл.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-07-00818).

Express-analysis the *azospirillum*-bacteriophages infection in the conducting suspensions by acoustic sensor

¹Gulyi O.I., ²Zaitsev B.D., ²Borodina I.A., ¹Karavaeva O.A.

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants & Microorganisms, RAS, Saratov, Russia.

²Kotel'nikov Institute of Radio Engineering and Electronics of RAS, Saratov Branch, Saratov, Russia,

The important role in the processes of nitrogen fixation is played by Gram-negative growth-stimulating bacteria of the genus *Azospirillum*. The *Azospirillum brasilense* species attract the greatest attention of researchers as the model object in the study of associative and endophytic rhizosymbiosis, formed by bacteria and higher plants. The composition and number of associative microflora depend on the seasonal variations and anthropogenic influences. Therefore, the development of methods, including methods for the detection of *azospirillum* cells, which allow monitoring the composition of rhizosphere bacteria, is one of the tasks of modern ecological microbiology.

Viruses of bacteria that infect microbial cells can be used to detect these microorganisms. Due to the receptors located on the surface of the cell, recognition and attachment of bacteriophages to bacterial cells are carried out. This is the basis of most methods for detecting microbial cells by using bacteriophages, among which biosensor methods have been widely used. Recently, studies on the detection of microbial cells by using electroacoustic methods of analysis have been actively developed. It is important to determine the microbial cells in real samples with different electrical conductivities. The high conductivity of the medium makes difficulties to determine the cells when they are infected with bacteriophages. The possibility of analyzing the bacterial cells by the example of *A. brasilense* soil microorganisms of strain Sp7 during their infection by a specific bacteriophage ФАб-Sp7 was studied by using an acoustic sensor directly in a suspension with the different initial electrical conductivity. The analysis is based on measuring the time dependence of the phase and the insertion loss of the sensor output signals at a fixed frequency before and after the biological interaction of the microbial cells-bacteriophages. The results have shown that the bacteriophage ФАб-Sp7 can be used to determine the microbial cells of *azospirillum* by electro-acoustic analysis. It has been shown that the conductivity of the buffer solution must not exceed 10^{-3} S / cm, and the minimum detectable concentration of microbial cells is $\sim 10^4$ cells / ml.

The work was carried out with the partial financial support of the Russian Foundation for Basic Research (project No. 16-07-00818).

Модификация регуляции генов азотфиксации у клубеньковых бактерий

Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ан.Х.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

E-mail: baymiev@anrb.ru

Для исследования возможности искусственной регуляции генов нитрогеназного комплекса ризобий была проведена работа по созданию экспрессирующих векторов с клонированными вариантами генов регуляторного белка NifA. Так на основе плазмид широкого круга хозяев были созданы генно-инженерные конструкции с генами *nifA* *R.leguminosarum* VSy9 и *Sinorhizobium (Ensifer)* sp. MLu10 под управлениями двух разных промоторов, индуцируемых арабинозой в случае промотора PBAD, и индуцируемых метилбензойной кислотой в случае промотора Pm. Было обнаружено, что рекомбинантные штаммы, трансформированные полученными конструкциями, начинают проявлять незначительную нитрогеназную активность вне симбиоза с растениями, чего не наблюдается у диких вариантов бактерий. Причем данную активность микроорганизмы проявляют даже на среде без индуктора, что, скорее всего, является следствием эффекта «протекания» взятых в работу промоторов, при котором наблюдается слабая экспрессия целевого гена. С другой стороны, индукция экспрессии дополнительно привнесенной копии гена *nifA* не приводила к существенным изменениям нитрогеназной активности. Причины данного явления требуют дальнейших исследований. Исключением оказался рекомбинантный штамм *Sinorhizobium (Ensifer)* sp. MLu10 с конструкцией pJB658SinorhnifA, нитрогеназная активность которого оказалась в несколько раз выше азотфиксирующей активности контрольного свободноживущего азотфиксирующего штамма *Pseudomonas* sp K749. В то же время обнаружено, что рекомбинантные штаммы отличаются крайне низкой стабильностью. Особенно явно данная нестабильность проявляется при регенерации бактерий после криохранения, когда при высеве бактерий на селективную среду с антибиотиком вырастают единичные колонии, тогда как на среде без антибиотика наблюдается бурный рост. Данное обстоятельство делает метод сохранения рекомбинантных штаммов бактерий методом криохранения крайне нежелательным. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (подбор штаммов для анализа №17-44-020201p_a; получение рекомбинантных штаммов и проточная цитофлуориметрия №18-34-00034mol_a)

Modification of nitrogen fixation genes regulation in nodule bacteria

Gumenko R.S., Vladimirova A.A., Baimiev Al.H., Baimiev An.H.

Institute of Biochemistry and genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

The work was done on the creation of expression vectors with cloned variants of genes regulatory protein NifA for study the possibility of artificial regulation nitrogenase complex genes rhizobium. On the basis of plasmids a wide range of hosts were created genetically engineered constructions with the genes *nifA* *R.leguminosarum* VSy9 and *Sinorhizobium (Ensifer)* sp. MLu10 under the control of two different promoters induced by arabinose (PBAD promoter) and by methyl benzoic acid (Pm promoter). It was found that recombinant strains transformed by these constructs to show little nitrogenase activity beyond symbiosis with plants, which is not observed in wild bacterial strains. Moreover, microorganisms show this activity even in a medium without an inducer, which is most likely a consequence of the effect the "flowing promoters" in which observed is a weak expression of the target gene. On the other hand, the induction of the expression an additional introduced copy of the *nifA* gene did not lead to significant changes in nitrogenase activity. The reasons for this phenomenon require further research. An exception was the recombinant strain *Sinorhizobium (Ensifer)* sp. MLu10 with the plasmid pJB658SinorhnifA. Its nitrogenase activity of which was several times higher than the nitrogen fixing activity of the control free-living nitrogen-fixing strain *Pseudomonas* sp K749. At the same time, it has been found that recombinant strains are characterized by extremely low stability. This instability appear i particularly clearly in the regeneration of bacteria after cryopreservation, when only single bacteria colonize the selective medium with the antibiotic, while on the medium without antibiotic, rapid growth is observed. This circumstance makes the method of conservation the recombinant bacterial strains by cryopreservation extremely undesirable.

The work was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research (selection of strains for analysis №. 17-44-020201p_a, production of recombinant strains and flow cytometry №18-34-00034mol_a).

Получение трансгенных регенерантов табака из культуры hairy roots

Гумерова Г.Р., Кагирова А.С., Кулуев Б.Р.

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

E-mail: gulnar.yas@mail.ru

Гены *rol* из Ri-плазмид *Agrobacterium rhizogenes* играют ключевую роль в формировании генетически трансформированных корней и широко изучаются не один десяток лет. Встраивание в растительный геном *rol*-генов (*rolA*, *B*, *C* и *D*) нарушает нормальное развитие растения вследствие гормональных изменений, что в свою очередь приводит к различным фенотипическим проявлениям. Например, у трансгенных по *rol*-генам растений отмечается изменение размера и морфологии листьев, аномальное цветение, явление гетеростелии, формирование меристем в постэмбриональный период, карликовость и многое другое. Культуры hairy roots считаются важными производителями биоактивных молекул, таких как вторичные метаболиты и рекомбинантные белки, которые могут с успехом применяться в различных отраслях промышленности и фармакологии. Существует большое количество исследований, в которых показано, что содержание вторичных метаболитов в культуре бородачатых корней может намного превышать их концентрацию в интактных растениях. Благодаря высокой регенерационной способности из культуры hairy roots можно получать целые трансгенные растения, без потери приобретенных *rol*-генов и оказываемых с их помощью эффектов на растительный организм. В связи с этим целью данной работы стало разработка основных этапов биотехнологии получения растений-регенерантов из культуры hairy roots. В качестве объекта исследования использовали свежеобранные листья *Nicotiana tabacum* L, которые стерилизовали стандартным способом. Далее 20 стерильных листовых эксплантов трансформировали методом сокультивирования с *A. rhizogenes* A4 и через 10 суток наблюдали появление первых корней. Для получения каллусной культуры наиболее активно растущие корни пересадили на среду МС с добавлением НУК (2 мг/л) и кинетина (0,2 мг/л). В случае индукции регенерантов образовавшиеся каллусы помещали на среду МС с добавлением 6-БАП и индол-3-уксусной кислоты. Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов с праймерами на гены *rolA* и *rolC* показал наличие генов *rol* в ДНК полученных образцов корней. Таким образом, в ходе проведенных экспериментов нам удалось получить взрослые трансгенные по *rol*-генам растения и из их листьев индуцировать образование косматых корней (hairy roots). Это позволяет сделать заключение о том, что регенерирующая способность *N. tabacum* оказалась достаточно высокой, что дает возможность использования такого способа для устойчивого сохранения культур hairy roots с полезными признаками в течение длительного времени.

Production of transgenic regenerants of tobacco from the hairy roots culture

Gumerova G.R., Kagirova A.S., Kuluev B.R.

Institute of biochemistry and genetics UFRC RAS, Ufa, Russia

The *rol*-genes from Ri-plasmids *Agrobacterium rhizogenes* play a key role in the genetically transformed roots formation and have been widely studied in the past decades. Integration of *rol*-genes (*rolA*, *B*, *C* and *D*) into the plant genome disrupts the normal plant development due to hormonal changes. These alterations cause some new phenotypic characteristics. For example, transgenic plants have modified leaf size and morphology, anomalous flowering, the phenomenon of heterostyles, meristems formation during postembryonic growth, dwarfism and etc. Hairy roots accumulate secondary metabolites and recombinant proteins. These compounds are industrially and pharmaceutically important phytochemicals. There are a large number of studies in which demonstrated that the secondary metabolites content in hairy roots culture can far exceeded their concentration in intact plants. Thanks to the high regenerative ability of the hairy roots culture, whole transgenic plants can be obtained, without loss of the acquired *rol*-genes and the effects with them on the whole plant organism. This paper reports the production of hairy roots using A4 strain of *A. rhizogenes* and regeneration of transformed plants. Therefore purpose of this work was the development of the universal stages of regenerative plants production from the hairy roots culture. The objects of this study were freshly picked leaves of *Nicotiana tabacum* L, which was sterilized by standard procedure. 20 leaf explants were transformed by co-cultivation with *A. rhizogenes* A4. The first transformed roots arised after 10 days. For the callus induction the most actively growing roots were transferred to MS medium with the addition of NAA (2 mg/l) and kinetin (0.2 mg/l). The induction of regenerants from calli was produced on MS medium with the addition BAP and IAA. Electrophoretic analysis of PCR products with primers on the *rolA* and *rolC* genes showed the presence of *rol*-genes in the DNA of the obtained root samples. Thus, during the experiments we were able to obtain adult transgenic plants in *rol*-genes and from their leaves to induce the formation of hairy roots. This allows us to conclude that the regenerative capacity of *N. tabacum* is high enough that it makes it possible to use this method for the sustainable preservation of hairy roots cultures with useful traits for a long time.

Биобаллистическая трансформация табака *rol*-генами с использованием CRISPR/Cas9-системы

Гумерова Г.Р., Кулуев Б.Р., Матниязов Р.Т., Чемерис А.В.
 Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия
E-mail: gulnar.yas@mail.ru

Агробактериальная трансформация является одним из эффективных методов генетической трансформации растений, основанная на естественном переносе фрагмента Ti- или Ri- плазмиды (Т-ДНК) в растительный геном, который приводит к образованию либо корончатых галлов («crown galls») в первом случае, либо волосовидных корней («hairy roots») во втором. Культуры таких корней представляет огромный практический и теоретический интерес. Однако, несмотря на широкое использование агробактериальной трансформации для создания hairy roots, этот метод имеет некоторые недостатки, вследствие которых он остается не применимым для многих видов хозяйственно-ценных растений. Биобаллистическая трансформация с использованием CRISPR/Cas9-системы – новая технология редактирования геномов высших организмов – может стать более эффективным альтернативным способом получения волосовидных корней у видов растений, плохо поддающихся агробактериальной трансформации. В связи с этим была поставлена цель опробовать предложенный метод индукции hairy roots на модельном объекте – *Nicotiana tabacum*. В качестве места встраивания *rol*-генов был выбран ген фитоендесатуразы табака (*PDS*), который широко используется в экспериментах по сайленсингу генов. При биобаллистической бомбардировке использовали ампликон *rol*-генов, фланкированный с двух сторон участками гена *PDS* табака, а также векторы pKIR1.1, pK7WGF2::hCas9 и pICH86966::AtU6p::sgRNA_PDS. Уже спустя 3 дня после биобаллистической трансформации наблюдали начало ризогенеза. На данный момент ведутся эксперименты по установлению факта встраивания *rol*-генов и их локализации в полученных в ходе работы волосовидных корнях.

Biolistic transformation of tobacco by *rol*-genes using CRISPR/Cas9 system

Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, Ufa, Russia

Agrobacterium-mediated transformation is one of the effective methods of genetic transformation of plants, based on the natural transfer of a fragment of Ti- or Ri- plasmid (T-DNA) into a plant genome, which leads to the formation of «crown galls», or «hairy roots». The culture of such roots is of great practical and theoretical interest. However, despite the extensive use of agrobacterium-mediated transformation to induce hairy roots, this method has some disadvantages. It remains impracticable for many species of economically valuable plants. Biolistic transformation using the CRISPR / Cas9 system - a new technology for genome editing of higher organisms - can become a more effective alternative way of obtaining hairy roots in plant species that are not easily amenable to agrobacterium-mediated transformation. In this connection, the aim of this research was to test the proposed method of induction of hairy roots on the model object - *Nicotiana tabacum*. As a place for integrating *rol*-genes, the tobacco phytoene desaturase gene (*PDS*) was chosen, which is widely used in gene silencing experiments. *Rol*-genes amplicon flanked on two sides tobacco *PDS* gene and vectors pKIR1.1, pK7WGF2::hCas9 and pICH86966::AtU6p::sgRNA_PDS was used for biolistic bombardment. Already 3 days after biolistic transformation, the beginning of rhizogenesis was observed. At this moment, experiments are continued and are established of *rol*-genes integration and their localization in the hairy roots genome obtained during the work.

Влияние Агростимулина на бобово-ризобийный симбиоз растений гороха

Гуро П.В., Волобуева О.Г.

Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А.Тимирязева, Москва, Россия

E-mail: polinaguro@gmail.com

Биологическая фиксация молекулярного азота микроорганизмами остается одной из наиболее актуальных проблем современной биологии. Наивысшей азотфиксирующей активностью среди микроорганизмов обладают ризобии, вступающие в симбиоз с бобовыми растениями. Уникальные функции клубеньковых бактерий по фиксации атмосферного азота приобретают особое значение в связи с усилением антропогенного воздействия на агроэкосистемы и возможностью использования биологических механизмов питания растений. В условиях вегетационного опыта изучали влияние регулятора роста Агростимулина на фоне инокуляции Ризоторфином, штамм *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae 245a, на бобово-ризобийный симбиоз и продуктивность растений гороха сортов Норд и Юниор. Совместная обработка Агростимулином и Ризоторфином растений гороха сорта Юниор приводила к увеличению количества клубеньков, массы клубеньковой ткани, активности нитрогеназы. Это происходило во все фазы развития растений, но наивысшие значения этих показателей наблюдались в фазу налива плодов. Структурный анализ урожайных данных показал, под влиянием Агростимулина на фоне инокуляции Ризоторфином наблюдалась тенденция увеличения урожая у растений гороха сорта Юниор. Наивысший урожай отмечен у сорта Норд при обработке только Ризоторфином. Проводили оценку микробиологической активности ризосферы растений гороха. Численность микроорганизмов учитывали на средах МПА, Чапека, Эшби. Обработка Агростимулином на фоне инокуляции Ризоторфином приводила к увеличению численности микроорганизмов. В вариантах с обработкой Агростимулином в почве отмечено малое количество грибов или полное их отсутствие. Таким образом, в результате проведенных исследований установлено положительное влияние регулятора роста Агростимулина на фоне инокуляции Ризоторфином. Совместная обработка Агростимулином и Ризоторфином растений гороха сорта Юниор приводила к увеличению количества клубеньков, массы клубеньковой ткани и активности в них фермента нитрогеназы, повышала продуктивность растений. Использование регулятора роста Агростимулина и биопрепарата Ризоторфина, особенно в комбинации Ризоторфин+Агростимулин, оказало положительное влияние и на микробиологическую активность почвы.

Influence of Agrostimulin on the legume-rhizobium symbiosis pea plants

Polina V. Guro, Olga G. Volobueva

Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

The biological fixation of molecular nitrogen by microorganisms is one of the most urgent problems of modern biology. The highest nitrogen-fixing activity among microorganisms is possessed by rhizobia, which enter into symbiosis with leguminous plants. The unique functions of rhizobium on the fixation of atmospheric nitrogen acquire special significance in connection with the intensification of anthropogenic impact on the agroecosystem and the opportunity to use biological mechanisms for feeding plants. In the conditions of vegetative test, the effect of the growth regulator Agrostimulin on the background of inoculation with Risotorphin, isolate *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae 245a, on the legume-rhizobium symbiosis and productivity of the pea plants of varieties Nord and Junior. Co-processing with Agrostimulin and Risotorphin of pea plants of the variety Junior resulted in an increase in the number of nodules, the weight of nodule tissue, and the activity of nitrogenase. This occurred in all phases of plant development, but the highest values of these indicators were observed in the phase of fruit filling. Structural analysis of the yield data showed that under the influence of Agrostimulin on the background of inoculation with Risotorphin, there was a tendency to increase the yield of the Juniper pea plants. The highest yield was recorded in the Nord variety when treated with Risotorphin alone. The microbiological activity of the rhizosphere of pea plants was assessed. The number of microorganisms was taken into account on the media of meat-and-peptone agar, Czapek, Ashby. Treatment with Agrostimulin on the background of inoculation with Risotorphin led to an increase in the number of microorganisms. In variants with treatment with Agrostimulin, a small amount of fungi or complete absence of fungi is noted in the soil. Thus, as a result of the studies, a positive effect of the growth regulator of Agrostimulin on the background of inoculation with Risotorphin was established. Joint treatment Agrostimulin and Risotorphin plants peas of the grade Junior led to an increase in the number of nodules, the weight of nodule tissue and the activity of the enzyme nitrogenase in them, increased the productivity of plants. Thus, as a result of the studies, a positive effect of the growth regulator of Agrostimulin on the background of inoculation with Risotorphin was established. Joint treatment Agrostimulin and Risotorphin plants peas of the grade Junior led to an increase in the number of nodules, the weight of nodule tissue and the activity of the enzyme nitrogenase in them, increased the productivity of plants. The use of the growth regulator Agrostimulin and the biologies Risotorphin, especially in the combination of Risotorphin + Agrostimulin, had a positive effect on the microbiological activity of the soil.

Анализ генов метилирования ДНК кукурузы и моделирование кодируемых ими белков

Гусев Ю.С., Мазилев С.И., Моисеева Е.М., Волохина И.В., Чумаков М.И.

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

E-mail: yuran1989@yandex.ru

В первой части доклада представлены данные по изучению генов (dmt102, dmt103, dmt105, hdt104, chr106, hon101), участвующими в метилировании ДНК у кукурузы и белков, кодирующих эти гены: (DMT102 (ДНК метилтрансфераза), DMT103, DMT105, HDT104 (гистоновые деацетилазы), CHR106 (хромметилаза) и HON101 (гистоновый линкер)). В базе данных кукурузы (MaizeGDB, <http://www.maizegdb.org>) проведен биоинформационный поиск последовательностей генов-гомологов метилированию ДНК кукурузы и их анализ. Во второй части доклада с помощью биоинформационных методов (программы PHYRE 2.0 (Protein Homology/analogy Recognition Engine, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk>), I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) проведено моделирование трёхмерной структуры белков, кодируемых генами метилирования ДНК кукурузы, и изучены их динамические свойства с помощью метода нормальных мод (elNemo, <http://www.sciences.univ-nantes.fr/elnemo>). Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № РФФИ № 18-016-00155.

Analysis of maize DNA methylation genes and modeling of proteins encoded by them

Gusev Yu.S., Mazilov S.I., Moiseeva Ye.M., Volokhina I.V., Chumakov M.I.

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

The first part of the report presents data on the genes involved in DNA methylation in maize, as well as data on the proteins encoding these genes: DMT102 (methyltransferase DNA), DMT103, DMT105, HDT104 (histone deacetylase), CHR106 (chromomethylase), and HON101 (histone linker). In the maize database (MaizeGDB, <http://www.maizegdb.org>) homologous gene sequences for DNA methylation of maize were searched for and analyzed. In the second part of the study, the three-dimensional structure of the proteins encoded by maize DNA methylation genes was modeled by the bioinformatic methods PHYRE 2.0 (Protein Homology/analogy Recognition Engine, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk>) and I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). The dynamic properties of the proteins were studied by the normal mode method (elNemo, <http://www.sciences.univ-nantes.fr/elnemo>). The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-016-00155.

Получение чистой культуры нового штамма ризобий из клубеньков сои, изучение свойств

Дашкова И.О.

ООО "НВП "БашИнком" Уфа, Россия

E-mail: irochkarutt@mail.ru

В последние годы наметился повышенный спрос на соевое зерно в России. В 2017 году размер площадей под сою вырос по отношению к 2016 году на 16,9 % и достиг рекордных отметок в 2 604,3 тыс. га. Россия обладает огромным потенциалом для крупномасштабного развития соеводства. Многолетний накопленный научный и практический задел свидетельствуют о возможности эффективного возделывания этой ценной культуры в широком ареале. Важную роль в формировании высоких урожаев сои играют специфические клубеньковые бактерии, вступающие в симбиоз с растением. В современных технологиях выращивания сои широко используются биопрепараты на основе высокоэффективных штаммов специфических ризобий, что позволяет получать высокие стабильные урожаи на биологическом азоте, т.к. он наиболее полно усваивается растениями. Целью работы является выделение эндофитных бактерий из клубеньков растения сои, получение чистых культур штаммов, их идентификация и изучение свойств штаммов *Bradyrhizobium japonicum*. Объектом исследования являлись штаммы бактерий – *Bradyrhizobium japonicum* - вид клубеньковых бактерий, сапрофитный азотфиксирующий симбионт сои (*Glycine max*). Штаммы были выделены из клубеньков сои, возделываемой в Уфе, Самаре, Амурской области на опытных полях. Для выделения чистой культуры клубеньковых бактерий были отобраны хорошо развитые растения в фазе цветения - плодообразования и с их корней отбирали крупные клубеньки. При идентификации клубеньковых бактерий на основе культурально-морфологических методов нами выявлено 7 штаммов *Bradyrhizobium japonicum*. Идентификация по морфологическим признакам проводилась по определителю Берджи. Для подсчета численности КОЕ клубеньки разрушали пинцетом. Далее методом серийных разведений и высевом на твердую питательную среду оценивали численность микроорганизмов. Определение вирулентности штаммов проводили по методике З.Г. Разумовской. Была проверена эффективность данных штаммов по способности образовывать на растениях сои активные клубеньки (учитывалось наличие леггемоглобина в центральной части клубенька), а также измерена нитрогеназная активность каждого штамма методом газовой хроматографии. Таким образом, на основании полученных данных биометрии растений, а также вирулентности, нитрогеназной активности штаммов и их способности образовывать активные клубеньки на корнях растений нами был отобран наиболее эффективный штамм *Bradyrhizobium japonicum*.

Obtaining a pure culture of a new rhizobium strain from soybean nodules, studying the properties

Dashkova I.O.

ООО "NVP" BashInkom " Ufa, Russia

In recent years, there has been an increased demand for soybean in Russia. In 2017 compared to 2016 the soybean area grew by 16.9% and reached a record mark of 2,604.3 thousand hectares. Russia has a great potential for large-scale development of the soybean industry. Many years of acquired scientific and practical experience determine the possibility of effective cultivation of this valuable culture in a wide range. An important role in the formation of high yields of soybeans is played by specific nodule bacteria, which enter into symbiosis with the plant. In modern technologies of soybean cultivation, biopreparations based on highly effective strains of specific rhizobia are widely used, which makes it possible to obtain high stable yields on biological nitrogen, as it is most fully assimilated by plants. The aim of the work is to isolate endophytic bacteria from the nodule of soybean plants, to obtain pure cultures of strains, to identify them and to study the properties of the strains of *Bradyrhizobium japonicum*. The object of the study was bacterial strains - *Bradyrhizobium japonicum* - a kind of nodule bacteria, saprophytic nitrogen-fixing soybean symbiont (*Glycine max*). The strains were isolated from the soybean nodules cultivated in Ufa, Samara and the Amur Region in experimental fields. To isolate the pure culture of nodule bacteria, well-developed plants were selected in the flowering - fruit formation phase and after that large nodules were selected from their roots. In the process of identification of nodule bacteria on the basis of culture-morphological methods, we detected 7 strains of *Bradyrhizobium japonicum*. Identification by morphological features was carried out according to Berdy's determinant. To count the number of CFU, nodules were destroyed with forceps. Then, the number of microorganisms was estimated by serial dilution and seeding on a solid nutrient medium. The virulence of the strains was determined under the method of Z. G. Razumovskaya. The effectiveness of these strains was tested for the ability to form active nodules on soybean plants (taking into account the presence of leghemoglobin in the central part of the nodule), and nitrogenase activity of each strain was measured by gas chromatography. Thus, basing on the obtained plant biometry data, as well as the virulence, nitrogenase activity of the strains and their ability to form active nodules on the plant roots, we have selected the most effective strain of *Bradyrhizobium japonicum*.

Сравнительный анализ растительных систем экспрессии для синтеза рекомбинантных белков

Дейнеко Е.В.

ФГБНУ "ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН", Новосибирск, Россия

E-mail: deineko@bionet.nsc.ru

За последнее десятилетие значительно возрос интерес к трансгенным растениям как биопродукторам различных белков медицинского назначения. При получении рекомбинантных белков актуальным остается вопрос поиска высокоэффективных и экономически выгодных систем экспрессии для их наработки. В настоящее время для синтеза рекомбинантных терапевтических белков, субъединичных вакцин и рекомбинантных моноклональных антител используются бактерии, дрожжи, а также культуры клеток насекомых и млекопитающих. Новые перспективы получения рекомбинантных фармацевтических белков открываются с использованием генетически модифицированных растений. По оценкам экспертов трансгенные растения могли бы быть более дешевым и безопасным источником рекомбинантных белков по сравнению с традиционными системами экспрессии. Привлекательность растений в качестве систем экспрессии для накопления рекомбинантных фармацевтически ценных белков обеспечивается многими обстоятельствами, среди которых более низкие затраты на их получение, отсутствие риска загрязнения рекомбинантного белка патогенами животного происхождения и т.д. К настоящему времени разработаны технологии получения генетически модифицированных растений, в геном которых перенесены гены, кодирующие различные белки для медицинских целей, в том числе и белки человека. Получены десятки видов трансгенных растений, в геном которых перенесены гены антигенов различных возбудителей инфекционных заболеваний, разнообразных терапевтических белков и антител. Однако относительно невысокий уровень накопления целевых белков (менее 1% от общего растворимого белка – ОРБ) в тканях генетически модифицированных растений послужил отправной точкой для разработки новых систем экспрессии. В качестве одной из таких альтернативных систем экспрессии рассматриваются внеядерные геномы (пластомы) хлоропластов растений. Максимально высокий уровень накопления рекомбинантного белка для транспластомных растений составил до 70% ОРБ. Среди других альтернативных систем экспрессии рекомбинантных белков для фармакологии следует назвать ряску, мох, некоторые виды водорослей, а также клетки генетически модифицированных растений, культивируемые в суспензионной культуре. Рассматриваются различные аспекты повышения накопления выхода рекомбинантных белков при культивировании растительных клеток в биореакторах. Исследования выполняются при поддержке проекта РНФ:17-14-01099.

Comparative analysis of plant expression systems for the synthesis of recombinant proteins

Deineko E.V.

The federal research center institute of cytology and genetics, the Siberian branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russia

Over the past decade, interest in transgenic plants as bio-producers of various medical proteins has increased significantly. When obtaining recombinant proteins, the question remains to find highly effective and economically advantageous expression systems for their production. New prospects for the production of recombinant pharmaceutical proteins are discovered using genetically modified plants. Experts estimate that transgenic plants could be a cheaper and safer source of recombinant proteins than traditional expression systems. The attractiveness of plants as expression systems for the accumulation of recombinant pharmaceutically valuable proteins is provided by many circumstances, including lower costs for their production, the absence of a risk of contamination of the recombinant protein by pathogens of animal origin, etc. To date, technologies have been developed for the production of genetically modified plants, into the genome of which genes encoding various proteins for medical purposes, including human proteins, have been transferred. Dozens of species of transgenic plants were obtained, into the genome of which genes of antigens of various pathogens of infectious diseases, various therapeutic proteins and antibodies were transferred. However, the relatively low level of accumulation of target proteins (less than 1% of the total soluble protein - ORB) in the tissues of genetically modified plants served as a starting point for developing new expression systems. As one of such alternative expression systems, extranuclear genomes (plastomas) of plant chloroplasts are considered. The highest level of accumulation of recombinant protein for transplastomic plants was up to 70% ORB. Among other alternative systems for expression of recombinant proteins for pharmacology, duckweed, moss, certain algae, and also cells of genetically modified plants cultivated in suspension culture should be mentioned. Various aspects of increasing the accumulation of the yield of recombinant proteins during the cultivation of plant cells in bioreactors are considered. The research is carried out with the support of the RNF project: 17-14-01099.

Влияние физиологического потенциала цианобактерий на растительно-микробное взаимодействие

Дидович С.В., Алексеенко О.П., Горгулько Т.В., Дидович А.Н.

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

E-mail: sv-alex.68@mail.ru

Изучен физиолого-биохимический потенциал двух штаммов цианобактерий при культивировании в искусственных средах и его влияние на эффективность растительно-микробного взаимодействия. Определены динамики накопления биомассы клеток, каталазной активности, изменения количества каротиноидов, обеспеченности 14-тью микро- и макроэлементами питания в течение годового цикла искусственного культивирования. Установлены корреляции в системе «физиолого-биохимический потенциал *Nostoc sphaeroides* Kützing 4 (ACSSI 150) – продуктивность растений *Triticum aestivum* L.». Ростостимулирующий эффект на растения отмечен при бактеризации штаммом *N. sphaeroides* 4, полученным с недостатком питания в культуре Fe – 31,5% (с активностью хлорофилла А 94,0%) и Zn – 226,7% (с активностью хлорофилла А 22%), а также с каталазной активностью – 32 мкмоль H₂O₂/г/мин через 1,5 и 7,5 месяцев культивирования. Гербицидный эффект на растения наблюдали при бактеризации данным штаммом с оптимальным запасом обеспеченности в культуре Zn и Fe (с потенциалом активности хлорофилла А для Zn – 14–58%, для Fe – 2–91%) и характеризующимся каталазной активностью с диапазоном 69,1–63,8 мкмоль H₂O₂/г/мин через 4,5–6,0 месяцев культивирования. Установлены корреляции в системе «физиолого-биохимический потенциал штамма *Desmonostoc muscorum* (C.Agardh ex Bornet et Flahault) Hrouzek et Ventura 1 (ACSSI 091) – продуктивность растений *Triticum aestivum* L.». Масса корней растений коррелировала с накоплением биомассы клеток штамма ($r=0,77$) и имела обратную корреляцию с количеством каротиноидов ($r=-0,95$). Увеличение фитомассы растений выявлено при бактеризации 9,0 месячной культурой штамма с биомассой 0,003–0,004 мг абсолютно сухой массы (а.с.м.)/мл среды и минимальным количеством каротиноидов в клетках (0,05–0,1%). Ингибирование растений отмечали при бактеризации штаммом с биомассой 0,0001 мг а.с.м./мл среды и количеством каротиноидов 2,5–4,4%, оптимальным запасом обеспеченности штамма Zn и Fe с потенциалом фотохимической активности хлорофилла А для Zn – 14–58%, для Fe – 2–91%, что выявлено у 1,5 и 7,0 месячной культур. Экспериментально доказано, что искусственное культивирование влияет на метаболический потенциал фототрофных штаммов, бактеризация которыми является решающим фактором, определяющим продуктивность растения, что важно для биотехнологии создания микробных препаратов стимулирующего и гербицидного действия. Исследование выполнено в рамках Госзадания РАН №0834-2015-0001 и грантов РФФИ №15-29-01272 и №18-016-00184.

The influence of the physiological potential of cyanobacteria on plant-microbe interaction

Didovich S.V., Alekseenko O.P., Gorgulko T. V., Didovich A.N.

FSB Scientific Institution «Research Institute of Agriculture of Crimea», Simferopol, Russia

Physiological and biochemical potential of the two cyanobacterial strains in condition with synthetic nutrient medium and influence of this potential on the efficiency of plant-microbe interactions studied. The dynamics of accumulation of biomass of cells and catalase activity, dynamic of change of the amount of carotenoids and dynamic of providing of 14 micro- and macroelements of nutrients during the annual cycle cultivation studied. Correlations were established in the system of «physiological and biochemical potential of *Nostoc sphaeroides* Kützing strain 4 (ACSSI 150) – plant productivity *Triticum aestivum* L.». The growth-stimulating effect on plants was observed under bacterization by strain *N. sphaeroides* 4, which was received with a lack of nutrition in the culture Fe–31,5% (with the activity of chlorophyll «A» 94,0%) and Zn–226,7% (with the activity of chlorophyll «A» 22%), as well as with catalase activity – 32 micromole H₂O₂/g/min after 1,5 and 7,5 months of cultivation. The herbicidal effect on the plants was observed under bacterization this strain with an optimal supply reserve in the culture of Zn and Fe (with potential of chlorophyll «A» activity for Zn – 14–58%, for Fe – 2–91%) and had catalase activity with a range of 69,1–63,8 micromole H₂O₂/g/min after 4,5–6,0 months of cultivation. Correlations were established in the system of «physiological and biochemical potential of *Desmonostoc muscorum* (C.Agardh ex Bornet et Flahault) Hrouzek et Ventura strain 1 (ACSSI 091) – plant productivity *Triticum aestivum* L.». The mass of plant roots correlated with the biomass accumulation of strain cells ($r=0,77$) and had an inverse correlation with the amount of cyanobacteria carotenoids ($r=-0,95$). The increase in the phytomass of plants identified under bacterization of 9,0 monthly culture of the strain with biomass of 0,003–0,004 mg absolutely dry mass (a.d.m.)/ml of nutrient medium and a minimal amount of carotenoids in the cells (0.05–0.1%). Inhibition of plants was noted under bacterization of a strain with biomass of 0.0001 mg a.d.m./ml of nutrient medium and the amount of carotenoids 2,5–4,4%, as well as with the optimal supply of the strain in the culture of Zn and Fe with the potential of photochemical activity of chlorophyll «A» for Zn – 14–58%, for Fe – 2–91%, which was established after 1,5 and 7,0 monthly of cultivation. It is experimentally proved that synthetic cultivation affects the metabolic potential of phototrophic strains, bacterization of which is the decisive factor and determine the productivity of the plant. It is important for biotechnologies of microbial preparations of stimulating and herbicidal action. The study was performed in the framework of the state task of the RAS № 0834-2015-0001 and RFBR grant №15-29-01272 and №18-016-00184.

Роль хитоолигосахаридных сигнальных молекул в контроле симбиотических и патогенных взаимоотношений растений с микроорганизмами

Долгих Е.А., Леппянен И.В., Кириенко А.Н., Бовин А.В., Долгих А.В., Шахназарова В.Ю., Тихонович И.А.
ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Пушкин, г. Санкт-Петербург, Россия
E-mail: dol2helen@yahoo.com

Бобовые растения обладают хорошо развитыми механизмами различения сигналов микроорганизмов, которые активируют внутриклеточные пути, ведущие к развитию симбиоза или патогенеза. Среди таких соединений особую роль играют хитоолигосахаридные сигнальные молекулы. Бобовые растения могут эффективно различать липохитоолигосахариды Nod-факторы, выделяемые азотфиксирующими бактериями пор. Rhizobiales, а также короткие хитоолигосахариды ХОС4–5, выделяемые грибами арбускулярной микоризы (АМ), что приводит к развитию симбиозов. Известно, что Nod-факторы и короткие ХОС4–5 способны подавлять развитие иммунного ответа у растений. Вместе с тем, бобовые растения эффективно различают длинномерные ХОС, выделяемые при расщеплении клеточной стенки фитопатогенных грибов при патогенезе. ХОС8–10 являются сильными элиситорами защитных реакций у растений. Основной целью наших исследований, которые проводятся на горохе *Pisum sativum* L., является изучение механизмов, с помощью которых растения различают столь близкие по строению соединения, но вызывающие совершенно противоположные реакции. Результатом поиска рецепторов у гороха, вовлеченных в узнавание ХОС с разной степенью полимеризации, стала идентификация CERK1-подобного рецептора – LYK9. У трансгенных растений с подавленной экспрессией гена *Lyk9* (*Lyk9-RNAi*) увеличивалась чувствительность к фитопатогенному грибу *F. culmorum*. Вместе с тем, у *Lyk9-RNAi* снижалась эффективность микоризации, а также уровень экспрессии генов – маркеров развития симбиозами с грибами АМ в ответ на обработку ХОС4–5 (NSP1, NSP2 и DWARF27). Это позволило сделать вывод о том, что рецептор LYK9 может контролировать как развитие иммунного ответа со стороны растений, так и симбиоз с грибами АМ. Такая бифункциональная роль рецептора может быть связана со способностью формировать комплексы с разными ко-рецепторами при узнавании различных ХОС. Для поиска компонентов сигнальных путей, активируемых ХОС с разной степенью полимеризации, нами были проанализированы протеомы корней гороха, обработанных сигнальными молекулами. Выявленные новые регуляторы стали предметом исследования и их роль при симбиозе и патогенезе обсуждается. Вместе с тем, нами идентифицирован рецептор K1, который необходим для узнавания сигнальных молекул Nod-факторов при бобово-ризобийальном симбиозе. Было впервые показано, что активация рецептора приводит к увеличению экспрессии генов, подавляющих иммунный ответ со стороны растений – *SymCRK* и *DNF2*. Работа поддержана грантом РФФ 16-16-10043.

Role of chitoooligosaccharidic signal molecules in the control of plant symbiotic and pathogenic relationships with microorganisms

Dolgikh E.A., Leppyanen I.V., Kirienko A.N., Bovin A.V., Dolgikh A.V., Shakhnazarova V.Yu., Tikhonovich I.A.
All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology (ARRIAM), Pushkin, Saint Petersburg, Russia

Legume plants have developed sensitive mechanisms to respond to signals from the potentially interacting microorganisms followed by the transduction of the signal to elicit the symbiosis or pathogenesis development. Among such compounds the chitoooligosaccharidic signal molecules play a specific role. Legumes can effectively respond to lipochitoooligosaccharides Nod factors released by nitrogen-fixing bacteria of the order Rhizobiales as well as short-chain CO4–5 produced by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi that results in symbiosis development. It is known that Nod factors and short CO4–5 are able to suppress the development of immune responses in plants. At the same time, legumes can effectively distinguish long-chain chitoooligosaccharides released from the cell wall of phytopathogenic fungi in pathogenesis. CO8–10 are potent elicitors of defence reactions in plants. How exactly plants perceive the structurally related signal molecules to elicit defense or symbiotic responses is the major objective of our work done on pea *Pisum sativum* L. Searching for receptors in pea involved in the recognition of COs with different degree of polymerization resulted in the identification of the CERK1-like receptor LYK9. It was shown that transgenic plants with *PsLyk9* knock-down (*PsLyk9-RNAi*) were more susceptible to the pathogenic fungus *F. culmorum*. Moreover, in *PsLyk9-RNAi* plants the efficiency of mycorrhization was declined as well as a decreased level of AM symbiosis marker genes (NSP1, NSP2 и DWARF27) was observed in response to treatment with short-chain CO5. It allowed us to conclude that CERK1-like receptor LYK9 in pea may control both the plant immunity and AM symbiosis. Such bifunctional role of the receptor might be determined by the ability to form complexes with various co-receptors at the recognition of differing COs. To find the components of the signal pathways activated by the COs with different degree of polymerization, the proteomes of pea roots treated with signal molecules were analyzed. New identified regulators became the subject of research and their role in symbiosis and pathogenesis was discussed. At the same time, we identified the K1 receptor, which is necessary for recognition of the Nod factor signal molecules and triggering the legume-rhizobia symbiosis. It was firstly shown the activation of this receptor may be connected with the induction of gene expression, suppressing the immune response in plants like the *SymCRK* and *DNF2*. This work was supported by Russian Science Foundation grant 16-16-10043.

Протекторная роль биопленок *Nostoc commune* при выращивании растений в загрязненной почве

^{1,2}Домрачева Л.И., ^{2,3}Скугорева С.Г., ³Фокина А.И.

¹Вятская государственная сельскохозяйственная академия, Киров, Россия

²Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар, Россия

³Вятский государственный университет, Киров, Россия

E-mail: skugoreva@mail.ru

Природные биопленки с доминированием цианобактерии *Nostoc commune* – многовидовые сообщества, распространенные в различных регионах планеты, включая экстремальные местообитания. В состав подобных мультивидовых биопленок, помимо эдификатора *N. commune*, входят другие гетероцистные и безгетероцистные цианобактерии и водоросли различных отделов, суммарная численность которых может превышать 2 млрд. клеток в 1 г биопленки. Гетеротрофный блок биопленок представлен бактериями различной систематической принадлежности и микромицетами, длина мицелия которых может превышать 2 км/г биопленки. Разнообразие микроорганизмов, входящих в состав биопленки, определяет разнообразие метаболических процессов, способность к деградации и утилизации ксенобиотиков. В зависимости от характера загрязняющих веществ в почве на лидирующие позиции в составе биопленок могут выходить виды фототрофов, наиболее адаптированные к присутствующим поллютантам. Ещё одной уникальной особенностью биопленок *N. commune* является их способность к самовосстановлению после механического разрушения. Наши исследования показали, что биоремедиационный потенциал биопленок *N. commune* и использование их для инокуляции семян сельскохозяйственных культур (бобовых, злаков, крестоцветных) при выращивании в химически и биологически загрязненных почвах базируется на определенных свойствах входящих в них организмов: 1. Экссудация значительного количества слизи обеспечивает хорошее прилипание биопленок к поверхности семян. 2. Биосорбция тяжелых металлов компонентами биопленок закрывает доступ этих токсикантов в корни растений. 3. Ферментативный гидролиз пестицидов, осуществляемый компонентами гетеротрофного блока биопленок, нивелирует их репрессивное действие на растение. 4. Многие виды цианобактерий, входящих в состав биопленок, выделяют вещества, обладающие фунгицидным действием, что препятствует развитию фитопатогенов в ризосфере растений. 5. Стимуляция роста и развития растений обеспечивается экзосомом ауксиноподобных веществ различными представителями мультивидовых биопленок. Таким образом, среди биоагентов микробного происхождения, используемых в практике сельского хозяйства для защиты растений от болезней и химических поллютантов, именно мультивидовые биопленки *N. commune* могут найти наиболее широкое применение.

Protector role of biofilms *Nostoc commune* in growing plants in contaminated soil

^{1,2}Domracheva L.I., ^{2,3}Skugoreva S.G., ³Fokina A.I.

¹Vyatka State Agricultural Academy, Kirov, Russia

²Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS, Syktyvkar, Russia

³Vyatka State University, Kirov, Russia

Natural biofilms with the dominance of cyanobacteria *Nostoc commune* are a multitude of species that are common in various regions of the planet, including extreme habitats. The composition of such multiview biofilms, in addition to the *N. commune* edifier, includes other heterocystic and non-heterocystic cyanobacteria and algae of various departments, the total number of which can exceed 2 billion cells/g of biofilm. The heterotrophic block of biofilms is represented by bacteria of various systematic accessory and micromycetes, the length of the mycelium of which may exceed 2 km/g of biofilm. The variety of microorganisms that make up the biofilm determines the variety of metabolic processes, the ability to degrade and utilize xenobiotics. Depending on the nature of the pollutants in the soil, the types of phototrophs most adapted to the pollutants present can enter the leading positions in the biofilm composition. Another unique feature of *N. commune* biofilms is their ability to self-repair after mechanical destruction. Our studies have shown that the bioremediation potential of *N. commune* biofilms and their use for inoculation of seeds of crops (beans, grasses, cruciferous) in cultivation in chemically and biologically contaminated soils is based on certain properties of the organisms entering into them: 1. Exudation of a significant amount of mucus provides good adhesion of biofilms to the surface of seeds. 2. Biosorption of heavy metals by biofilm components closes the access of these toxicants to plant roots. 3. Enzymatic hydrolysis of pesticides, carried out by components of the heterotrophic block of biofilms, neutralizes their repressive effect on the plant. 4. Many types of cyanobacteria that make up the biofilm give off substances with a fungicidal effect, which prevents the development of phytopathogens in the rhizosphere of plants. 5. Stimulation of plant growth and development is provided by exosmosomes of auxin-like substances by various representatives of multi-species biofilms. Thus, among biogens of microbial origin used in the practice of agriculture to protect plants from diseases and chemical pollutants, it is *N. commune* multiview biofilms that can be most widely used.

Перспективы использования бинарных ассоциаций на основе цианобактерий и актиномицетов для защиты растений от фитопатогенов

^{1,2}Домрачева Л.И., ^{2,3}Широких И.Г., ^{1,3}Товстик Е.В., ^{1,2}Скугорева С.Г.

¹Вятская государственная сельскохозяйственная академия, Киров, Россия

²Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар, Россия

³Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н. В. Рудницкого, Киров, Россия

E-mail: tovstik2006@inbox.ru

В последние годы всё бóльшую популярность в защите растений от инфекций приобретают не монокультуры микроорганизмов, а биопрепараты для интродукции в почву вместе с посадочным материалом, в состав которых входит несколько видов. При подборе партнеров для таких консорциумов необходимо учитывать отсутствие конкуренции в условиях совместного культивирования и формирование межпопуляционных регуляторных механизмов. К числу организмов, эволюционно приспособленных к совместному проживанию, относятся цианобактерии и актиномицеты. Цианобактерии обладают способностью к массовому размножению на поверхности почвы, формируя поверхностные налеты, корочки и биопленки, в которых постоянно обнаруживаются актиномицеты в качестве гетеротрофных спутников. Для защиты растений от фитопатогенов необходимо создание искусственных цианобактериально-актиномицетных ассоциаций, обладающих активной продукцией антибиотиков. Естественно предположить, что в двойных ассоциациях продуктивный потенциал, связанный с биосинтезом антимикробных веществ, может усиливаться. На искусственном инфекционном фоне по грибу *Fusarium avenaceum* 7/2, который является фитопатогенным и токсиногенным видом, в серии модельных экспериментов с культурами цианобактерий и актиномицетов, выделенных из почвы и ризосферы сельскохозяйственных растений, установлено, что наибольшей антифузариозной активностью обладают следующие бинарные ассоциации: *Nostoc linckia* + *Streptomyces luteogriseus* и *Fischerella muscicola* + *S. wedmorensis* 38.11. В дальнейшем, в ходе вегетационного опыта, изучали действие предпосевной обработки семян пшеницы Приокская жидкими монокультурами *S. wedmorensis* 38.11 и *F. muscicola* (Thur.) Gom. 300, а также двухкомпонентной смешанной ассоциацией этих микроорганизмов, на морфометрические показатели проростков и их продуктивность на обычном и инфекционном фоне по *F. avenaceum* 7/2. Результаты опыта показали, что бинарная ассоциация *Fis. muscicola* + *S. wedmorensis* 38.11 оказалась более эффективным антифузариозным агентом, чем монокультуры входящих в неё микробных компонентов.

Prospects of use of binary associations based on cyanobacteria and actinomycetes to protect plants from phytopathogens

^{1,2}Domracheva L.I., ^{2,3}Shirokikh I.G., ^{1,3}Tovstik E.V., ^{1,2}Skugoreva S.G.

¹Vyatka State Agricultural Academy, Kirov, Russia

²Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS, Syktvykar, Russia

³N. V. Rudnitski Zonal North-East Agricultural Research Institute, Kirov, Russia

Last years the increasing popularity in protection of plants against infections is got not by monocultures of microorganisms, and biological products for entering into soil together with a landing material which structure includes some kinds. At selection of partners for such consortia it is necessary to consider absence of a competition in the conditions of joint cultivation formation of mechanisms of regulation between populations. Among the organisms evolutionarily adapted to cohabitation are cyanobacteria and actinomycetes. Cyanobacteria have the ability to mass reproduction on the soil surface, forming surface deposits, crusts and biofilms, in which actinomycetes are constantly detected as heterotrophic satellites. To protect plants from phytopathogens, it is necessary to create artificial cyanobacterial-actinomycete associations that have an active production of antibiotics. It is natural to assume that in double associations the productive potential associated with the biosynthesis of antimicrobial substances can be strengthened. On an artificial infectious background on fungus *Fusarium avenaceum* 7/2, which is phytopathogenic and toxogenic, in a series of model experiments with cultures of cyanobacteria and actinomycetes isolated from soil and rhizosphere of agricultural plants, the following binary associations have the largest antifusor activity: *Nostoc linckia* + *Streptomyces luteogriseus* and *Fischerella muscicola* + *S. wedmorensis* 38.11. Later, during the vegetative experience, the effect of presowing treatment of wheat seeds in Priokskaya was studied by liquid monocultures of *S. wedmorensis* 38.11 and *F. muscicola* (Thur.) Gom. 300, and also by a two-component mixed association of these microorganisms, on the morphometric characteristics of seedlings and their productivity in the usual and infectious background according to *F. avenaceum* 7/2. The results of the experiment showed that the binary association *Fis. muscicola* + *S. wedmorensis* 38.11 proved to be a more effective antifuzario agent than the monocultures of the microbial components that enter it.

Изучение морфогенетического потенциала *in vitro* сортов тимьяна

Древова А.Н., Чередниченко М.Ю.

Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

E-mail: michael.tsch@gmail.com

В настоящее время лекарственные травы широко используются в медицине для лечения и профилактики различных заболеваний. Среди представителей семейства Lamiaceae Mart. тимьян обладает наибольшим количеством видов и форм. Тимьян является источником эфирного масла, которое содержит много биологически активных соединений (главным образом, тимол и карвакрол), обладающих сильными бактерицидными свойствами. Масло тимьяна широко применяют в официальной медицине. Оно оказывает благотворное влияние на организм: укрепляет иммунитет, обладает фунгицидным действием, положительно воздействует на нервную систему, на деятельность желудочно-кишечного тракта, а также обладает анальгетическим действием и другими свойствами. Для анализа и регулирования процесса образования ценных вторичных метаболитов целесообразно использовать биотехнологические методы культуры *in vitro*. Изучение морфогенетического потенциала различных видов и сортов тимьяна даст возможность подобрать оптимальный объект для последующих исследований в области регулирования и повышения интенсивности вторичного синтеза. Независимость от внешних условий и высокая эффективность производства вторичных метаболитов в культуре *in vitro* делают эту технологию привлекательной для производителей лекарственных средств. Целью данной работы было изучение морфогенетического потенциала различных видов и сортов тимьяна *in vitro*. В результате проведенных экспериментов показана сортоспецифичность реакции на стерилизующие агенты (хлорид ртути (II) и гипохлорит натрия) сортов Лимонный, Альпийский мед (*Thymus vulgaris*) и Пикантный (*Thymus serpyllum*). Для сорта Лимонный лучшей средой для образования каллуса является среда МС с добавлением 2,4-Д и БАП. Каллус образуется в основном из стеблевых сегментов. Для стеблевого органогенеза предпочтительнее использовать среду МС с добавлением кинетина. Для сорта Альпийский мед лучшей средой для образования каллуса является среда МС с добавлением 2,4-Д или сочетания цитокинина БАП с ауксином ИУК (в отношении 30:1). Стеблевой органогенез происходит на питательной среде МС с добавлением БАП и ИУК. Сорт Пикантный обладает наиболее высокой способностью к образованию каллуса как из стеблевых, так и из листовых сегментов. Высокой активностью индукции каллусогенеза обладают среды МС с содержанием 2,4-Д и БАП + ИУК (в отношении 10:1). Для стеблевого органогенеза предпочтительнее использовать питательную среду МС с добавлением БАП + ИУК.

Study of the morphogenetic potential *in vitro* of thyme varieties

Drevova A.N., Cherednichenko M.Yu.

Russian Timiryazev State Agrarian University, Moscow, Russia

Currently, medicinal herbs are widely used in medicine for treatment and prevention of various diseases. Among the representatives of the Lamiaceae Mart. family thyme has the largest number of species and forms. Thyme is a source of essential oil, which contains many biologically active substances (mainly thymol and carvacrol) with the strong bactericidal properties. Thyme oil is widely used in officinal medicine. It has a beneficial effect on the human body: strengthens the immune system, has a fungicidal effect, positively affects the nervous system, the activity of the gastrointestinal tract, and has analgesic effects and other properties. To analyze and to regulate the formation process of valuable secondary metabolites, it is advisable to use biotechnological methods of *in vitro* culture. The study of the morphogenetic potential of various species and varieties of thyme will make it possible to select the optimal object for subsequent studies in the field of regulation and increasing the intensity of secondary synthesis. Independence from external conditions and high efficiency of secondary metabolites production in *in vitro* culture make this technology attractive for drug manufacturers. The aim of this work was to study the morphogenetic potential of various species and varieties of thyme *in vitro*. As a result of the experiments, the variety-specific reaction to sterilizing agents (mercuric chloride (II) and sodium hypochlorite) of varieties Lemonny, Alpiysky mjod (*Thymus vulgaris*) and Pikantrny (*Thymus serpyllum*) was shown. For variety Lemonny, the best environment for the callus formation is the MS medium with the addition of 2.4-D or BAP. Callus is formed mostly from stem segments. For stem organogenesis, it is preferable to use the MS medium supplemented with kinetin. For variety Alpiysky mjod, the medium with the addition of 2.4-D or a combination of cytokinin BAP with auxin IAA (in the ratio of 30: 1) is the best medium for callus formation. Stem organogenesis occurs on the MS nutrient medium with the addition of BAP and IAA. Variety Pikantrny has the highest ability to callus formation from stem and leaf segments. High activity of callusogenesis induction is possessed by MS media containing 2.4-D and BAP + IAA (in a ratio of 10:1). For stem organogenesis, it is preferable to use MS nutrient medium with addition of BAP + IAA.

Создание новых устойчивых к пирикулярриозу форм *Oryza sativa* L. с использованием методов молекулярного маркирования

¹Дубина Е.В., ¹Шиловский В.Н., ²Костылев П.И., ¹Рубан М.Г.

¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт риса», Краснодар, Россия

²ФГБНУ «Аграрный научный центр «ДОНСКОЙ», Зерноград, Россия

E-mail: lenakrug1@rambler.ru

По степени вредоносности для риса пирикулярриоз (возбудитель – гриб *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr Yaegashi & Udagawa (анаморф *Pyricularia oryzae* Cav.)) занимает первое место. В системе защиты растений от болезней наиболее эффективным методом является создания «иммунных» сортов риса - источников устойчивости и быстрое внедрение их в производство. На основе использования современных технологий молекулярного ДНК-маркирования нами проведено введение и пирамидирование генов резистентности к пирикулярриозу Pi-ta, Pi-b, Pi-1, Pi-2, Pi-33 в отечественные сорта риса для придания им длительной устойчивости к заболеванию. В результате ряда возвратных скрещиваний получен селекционный материал с интродуцированными и пирамидированными генами резистентности к пирикулярриозу. Контроль доминантных аллелей целевых генов в процессе селекции проводили методами молекулярного маркирования (marker assisted selection, MAS). Для повышения экономической эффективности маркерной селекции разработана система мультиплексной ПЦР, позволяющая идентифицировать одновременно два изучаемых гена Pi-1+Pi-2, Pi-33+Pi-ta и Pi-ta+Pi-b резистентности к *M. grisea* в геномной ДНК гибридных растений при постановке одной реакции. Её использование позволит значительно сократить затраты расходных материалов и время на выполнение анализа образцов риса. Фитопатологическая оценка полученных линий показала их устойчивость к *M. grisea*. Сорт риса Альянс (КП-171-14) с геном Pi-ta и сорт риса Пируэт с тремя генами устойчивости к пирикулярриозу (Pi-1, Pi-2, Pi-33), адаптированные к условиям выращивания на юге России, устойчивые к краснодарской популяции патогена *Pyricularia oryzae* Cav., а также имеющие высокую урожайность и качество крупы переданы на Государственное сортоиспытание, сорт риса Антарис с геном Pi-ta подготовлен для передачи на ГСИ. Внедрение и возделывание таких сортов в производстве позволит сократить применение химических средств защиты, получать экологически чистую сельхозпродукцию и избежать загрязнения зерновых экосистем.

Development of new blast resistant forms of *Oryza sativa* L. using methods of molecular marking

¹Dubina E.V., ¹Shilovskii V.N., ²Kostylev P.I., ¹Ruban M.G.

¹Federal State Budgetary Scientific Institution «All-Russian Rice Research Institute», Krasnodar, Russia

²Federal State Budgetary Scientific Institution "Agrarian Scientific Center" DONSKOY ", Zernograd, Russia

Diseases of agricultural crops are one of the factors that severely limit the productivity of crop production around the world. The annual damage caused by phytopathogenic microorganisms, according to various estimates, is from 10 to 20% of the total productivity of world crop production. One of the serious limiting biotic stress factor for rice is blast (imperfect fungus pathogen *Pyricularia oryzae* Cav. (*Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr)). Pathogen affects all the above-ground organs of the plant, which leads to yield loss by 20 - 60%, and in the epiphytotic years - 100%. The main cause of large yield losses from disease is the absence of resistant varieties. The newly developed rice varieties quickly lose resistance to new races of the pathogen, as the high variability of the *M. grisea* fungus constantly outstrips the evolution of the host plant. The combination of several effective genes of resistance on the genetic base of the best and newly developed varieties is an effective breeding strategy for resistance to highly competitive fungal pathogens. Application of modern biotechnological methods of DNA marking facilitates breeding work in this direction and allows developing genetic sources with introgressed and pyramidal genes of resistance to disease. The aim of our research is the development of methodological bases of marker-assisted rice breeding for resistance to *Magnaporthe grisea* L. using PCR methods, as well as development of pathogen-resistant varieties and breeding forms on the genetic basis of Russian varieties. Based on the use of marker-assisted selection technology (MAS - breeding using DNA markers to the genes of interest), in 2007 we hybridized the lines of donors of genes for resistance to blast with domestic varieties. As a result of hybridization of each combination, the F1 generation was obtained, which was used in recurrent crosses with recipient parental forms (domestic rice varieties). In 2008, BC1 and BC2 generation were obtained in artificial climate chambers. Beginning with the first recurrent crossing, marker control was carried out for the presence of transferable donor alleles in the hybrid progeny. The plants were selected which, according to the results of DNA analysis, carried the donor allele of the pathogen resistant gene. In 2009 BC3 and BC3F1 generation was obtained, individual selection was carried out. The plants most closely resembling the morphotype of the recipient parental form and carrying, in addition, the donor alleles of resistance genes to the pathogen in the homozygous state were selected. During the work with the help of marker control of donor alleles, we obtained an extensive spectrum of hybrid plants with pyramided genes of resistance to blast Pi-2, Pi-b, Pi-ta, Pi-33, Pi-1, which in 2009-2015 passed complex evaluation in breeding, control nurseries and from 2015 to 2017. - in competitive variety testing. Simultaneously, these lines were evaluated for resistance to the pathogen on the infectious background during artificial infection. Among the plants that, according to the results of the DNA analysis, had target genes in the genotype, as well as during phytopathological evaluation for resistance to the pathogen, showed themselves as resistant and medium-resistant, 5 lines were selected that combine early maturity, short stature, nonshattering and fertility of the spikelet. The rice variety KP-30 (Antaris) with blast resistant gene Pi-ta is prepared for transfer to the state variety testing. Thus, with the use of molecular marking methods, rice lines and varieties were obtained, in the genotype of which there are effective genes for resistance to blast. Their introduction into production will allow avoiding the epiphytotic development of the disease, preserve the biological yield of rice and obtain environmentally friendly agricultural products.

Структурные особенности гликополимеров матрикса и поверхности клеток биопленок бактерий *Azospirillum halopraeferens* Au4

¹Евстигнеева С.С., ¹Сигида Е.Н., ¹Федоненко Ю.П., ^{1,2}Коннова С.А.

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

E-mail: Stels20295@yandex.ru

Грамотрицательные бактерии р. *Azospirillum*, относящиеся к группе PGPR, вступают в ассоциативные отношения с широким спектром дикорастущих и культурных растений. Заселяя поверхность корней, азоспириллы образуют биопленки, которые являются одной из стратегий выживания бактерий в определенной экологической нише. Несмотря на важную роль подобных сообществ в формировании растительно-микробной ассоциации, мало внимания уделяется изучению структуры преобладающих компонентов поверхности клеток биопленок и состава их внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ). В связи с этим целью исследования являлась характеристика гликанов поверхности клеток и ВПМ биопленок галотолерантных бактерий *A. halopraeferens* Au4. Для получения биопленок на границе фаз «жидкость-воздух» бактерии *A. halopraeferens* Au4 культивировали в колбах Эрленмейера с селективной питательной средой в стационарных условиях. На пятые сутки выращивания азоспириллы образовывали зрелые биопленки, имеющие толщину 67.5 ± 5.1 мкм. Из биопленок мягкой деградацией ультразвуком выделяли ВПМ. После отделения матрикса из бактериальных клеток экстрагировали горячим водным раствором фенола липополисахарида (ЛПС-Б). Выходы ВПМ и ЛПС-Б составили 12.7 и 5.1% от массы высушенных клеток, соответственно. Для выделения гликанов матрикса препарат ВПМ подвергали протеиназной обработке. Полученные таким образом гликополимеры, выход которых составил 20% от массы ВПМ, содержали характеристические для ЛПС компоненты – углеводы, в т.ч. КДО, 3-гидроксилированные жирные кислоты и фосфор, – поэтому в дальнейшем мы рассматривали их как ЛПС-М. Методом ГЖХ было показано, что ЛПС-М и ЛПС-Б характеризовались сходным моносахаридным составом, однако отличались от образца ЛПС планктонной культуры данного штамма возрастанием содержания глюкозы в 1.5-2 раза. В ходе мягкого кислотного гидролиза ЛПС-М и ЛПС-Б в случае каждого образца были получены две полисахаридные фракции: О-специфический полисахарид (ОПС) I и ОПС II, которые исследовали методом ЯМР спектроскопии. ОПС I оказался близок по структуре к крахмалу. ОПС II имел сходное строение с ОПС планктонной формы, однако обладал меньшей степенью гликозилирования. Поиск оптимального сочетания структуры и свойств гликополимеров поверхности клеток биопленок и ВПМ бактерий *A. halopraeferens* Au4, вероятно, играет ключевую роль для успешного формирования ассоциации с растениями и ее дальнейшего полноценного существования.

Structural features of glycopolymers of the matrix and the cell surface of *Azospirillum halopraeferens* Au4 biofilms

¹Yevstigneyeva S.S., ¹Sigida E.N., ¹Fedonenko Yu.P., ^{1,2}Konnova S.A.

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, The Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

²Chernyshevsky Saratov State University, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, The Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

Gram-negative bacteria of the genus *Azospirillum* belonging to the PGPR group enter into associative relations with a wide spectrum of wild-growing and cultivated plants. During colonization of the root surface, azospirilla form biofilms, which are one of the strategies for survival of bacteria in a certain ecological niche. Despite the important role of such communities in the formation of plant-microbial association, low attention is paid to the study of the predominant components of the cell surface of the biofilm and the composition of extracellular polymer matrix (EPM). In this connection, the purpose of the study was to characterize the glycans of the cell surface and EPM biofilms of halotolerant bacteria *A. halopraeferens* Au4. To obtain biofilms at the air/liquid interface, *A. halopraeferens* Au4 were cultured in Erlenmeyer flasks with a selective nutrient medium under stationary conditions. On the fifth day of growing, the azospirilla formed mature biofilms having a thickness of 67.5 ± 5.1 μ m. EPM was isolated with soft ultrasound degradation from the biofilm. After separation of the matrix, lipopolysaccharide (LPS-B) was extracted from the bacterial cells with a hot aqueous solution of phenol. The yields of EPM and LPS-B were 12.7 and 5.1% of dry cell weight, respectively. To isolate the glycans of the matrix, the EPM preparation was subjected to a proteinase treatment. The glycopolymers, the yield of which was 20% of the EPM mass, contained the characteristic components for LPS - carbohydrates, including KDO, 3-hydroxylated fatty acids and phosphorus, so we have defined them as LPS-M. It was shown by GLC that LPS-M and LPS-B were characterized by a similar monosaccharide composition, but differed from the LPS of the planktonic culture of this strain by an increase in the glucose content by a factor of 1.5-2. During the mild acid hydrolysis of LPS-M and LPS-B in the case of each sample, two polysaccharide fractions were obtained: O-specific polysaccharide (OPS) I and OPS II, which were further investigated by NMR spectroscopy. OPS I was close in structure to starch. OPS II had a similar structure with an OPS planktonic form, but had a lower degree of glycosylation. The search for an optimal combination of the structure and properties of glycopolymers of the cell surface of biofilms and EPM of *A. halopraeferens* Au4 bacteria is likely to play a key role in the successful formation of association with plants and its continued full-fledged existence.

Влияние биопрепаратов на микробиоценоз ризосферы ячменя озимого

Еговцева А.Ю., Мельничук Т.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», Симферополь, Республика Крым, Россия

E-mail: eau82@mail.ru

В настоящее время остро стоит проблема повышения продуктивности сельскохозяйственных культур при минимализации энерго- и ресурсозатрат, а также охране окружающей среды. Создание биопрепаратов комплексного действия, одновременно включающих свойства стимуляторов роста и фунгицидов, дает возможность решать многие проблемы биологической защиты растений и повышать качество конечной продукции, в то же время, улучшая состояние почв. Цель работы заключалась в оценке воздействия предпосевной обработки семян ячменя озимого (*Hordeum vulgare* L.) комплексом микробных препаратов (КМП) на численность почвенных микроорганизмов ризосферы. Для анализа проводили отбор почвы ризосферы в фазу цветения. Определяли количество колониобразующих единиц микроорганизмов основных эколого-трофических групп, используя общепринятые методы в микробиологии. Обработку полученных результатов проводили статистическими методами с использованием компьютерной программы Excel 2016. Микробиологический анализ ризосферы показал, что инокуляция семян КМП способствовала изменению численности микроорганизмов различных эколого-трофических групп. Установлена тенденция увеличения количества педотрофов и бактерий, трансформирующих преимущественно органические и минеральные формы азота, под воздействием биопрепаратов. Численность олиготрофов возросла по сравнению с контролем на 24 %. Свободноживущие азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter* являются биоиндикаторами обеспеченности почв органическим веществом, а также фосфором и калием. В условиях полевого опыта общая численность аэробных азотфиксаторов и азотобактера превышала контроль на 9 % и 11 %, соответственно. Под воздействием инокуляции отмечено увеличение количества актиномицетов на 33 %, целлюлозолитиков на 36 %, при этом численность микромицетов снижалась на 39 % в сравнении с контролем (без обработки семян комплексом микробных препаратов). Напряженности минерализационных процессов в ризосфере ячменя не отмечено, так как коэффициенты минерализации, олиготрофности, олигонитрофильности и педотрофности не превышали единицы. По биометрическим данным наших исследований выявлено, что применение биопрепаратов способствовало лучшему развитию растений ячменя озимого. Высота растений увеличилась на 14,0 % в сравнении с контролем. Таким образом, в результате наших исследований установлено положительное влияние инокуляции семян ячменя озимого комплексом микробных препаратов на развитие растений и микробиоценоз ризосферы.

Influence of biopreparation on microbocenosis of the rhizosphere of winter barley

Egovtseva A.Yu., Melnichuk T.N.

Federal State Budget Scientific Institution "Research Institute of Agriculture of Crimea", Simferopol, Russia

Currently, the challenge of increasing the productivity of agricultural crops, minimizing energy and resource costs, as well as protecting environment is actual. Creation of complex biopreparations, including the properties of growth stimulants and fungicides at the same time, makes it possible to solve many problems of biological plant protection and improve the quality of final products and soil properties. The aim of the work was to assess the effect of presowing treatment of barley seeds (*Hordeum vulgare* L.) with a complex of microbial preparations (CMP) on the number of soil microorganisms in the rhizosphere. For the analysis, soil was taken from the rhizosphere during the flowering phase. The number of colony-forming units of microorganisms of the main ecological-trophic groups was determined using generally accepted methods in microbiology. The results were processed by statistical methods using the computer program Excel 2016. The microbiological analysis of the rhizosphere showed that the inoculation of the seeds of CMP promoted a change in the number of microorganisms of various ecological-trophic groups. The tendency to increase the amount of bacteria transforming mainly organic and mineral forms of nitrogen, pedotrophs, under the influence of biopreparation has been established. The number of oligotrophs increased in comparison with the control by 24%. Free-living nitrogen-fixing bacteria of the genus *Azotobacter* are bioindicators of soil supply with organic matter, as well as phosphorus and potassium. Under field experiment conditions, the total number of aerobic nitrogen fixators and *Azotobacter* exceeded the control by 9% and 11%, respectively. Under the influence of inoculation, an increase in the number of actinomycetes by 33% and cellulolytic agents by 36% was noted. The amount of micromycetes decreased by 39% in comparison with the control (without seed treatment with a complex of microbial preparations). The intensity of mineralization processes in the rhizosphere of barley was not noted, since the coefficients of mineralization, oligotrophy, oligonitrophilicity and pedotrophy do not exceed unity. The use of biopreparations contributed to the better development of barley plants of winter crops, which was revealed by the biometric data of our studies. The height of plants increased by 14.0% in comparison with the control. Thus, as a result of our studies, the positive effect of barley seeds inoculation with the complex of microbial preparations on the development of plants and the biocenosis of the rhizosphere was established.

Влияние генотипа и состава питательной среды на укоренение розы эфиромасличной при микроразмножении *in vitro*

^{1,2}Егорова Н.А., ²Ставцева И.В., ¹Митрофанова И.В.

¹ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», Ялта, Россия

²ФГБУН «НИИ сельского хозяйства Крыма», Симферополь, Россия

E-mail: yegorova.na@mail.ru

Одним из наиболее известных ароматических растений является роза эфиромасличная, продукты переработки которой широко используются в парфюмерно-косметической и пищевой промышленности, а также в медицине. Для совершенствования не только традиционных методов селекции и семеноводства, но и биотехнологических (в частности, эмбриокультуры, создания коллекций *in vitro*) необходима оптимизация основных этапов клонального микроразмножения. Целью данной работы было изучение влияния генотипа, состава питательной среды и длительности культивирования на укоренение в процессе клонального микроразмножения розы эфиромасличной *in vitro*. В работе были исследованы основные выращиваемые в Крыму сорта розы эфиромасличной – Радуга, Лань, Лада, Мичуринка, Фестивальная, полученные при участии видов *Rosa gallica* L., *R. damascena* Mill., *R. alba* L. Для введения в асептическую культуру в качестве эксплантов использовали меристемы с одной парой листовых примордиев (0,3-0,4 мм), выделенные из пазушных почек растений. У большинства сортов на 1-м и 2-м этапах микроразмножения наблюдали развитие основного побега, а также пазушных и адвентивных почек и побегов. Анализ морфогенеза эксплантов при клональном размножении свидетельствует о целесообразности применения для размножения розы как микропобегов с укороченными междоузлиями (микророзеток), так и микрочеренков из нормально развитых побегов, что позволяет повысить коэффициент размножения. Укоренение побегов проводили в условиях *in vitro*, помещая сегменты стебля с одним узлом на модификации питательной среды МС с добавлением ауксинов (НУК, ИУК, ИМК). Установлено, что максимальная частота ризогенеза и количество корней было на среде ½МС с 0,5 мг/л НУК. Наибольшая частота укоренения (100,0%) и число корней (7,3-7,7 шт./побег) отмечены у сортов Радуга и Фестивальная. У сорта Лада выявлена наименьшая частота ризогенеза (85,7%), а у ‘Лани’ – минимальное число корней (4,9 шт./побег). При исследовании влияния пассажа на укоренение микропобегов розы *in vitro* было показано, что у сорта Радуга при использовании микрочеренков, полученных во 2, 6, 9-м пассажах, не было достоверных различий по частоте укоренения и числу корней. В то же время у ‘Мичуринки’ по мере увеличения пассажа наблюдали достоверное повышение частоты ризогенеза и количества корней на эксплант. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 14-50-00079.

Influence of genotype and culture medium composition on the rooting of essential oil rose during micropropagation *in vitro*

^{1,2}Yegorova N.A., ²Stavtseva I.V., ¹Mitrofanova I.V.

¹FSFIS “The Labour Red Banner Order Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of RAS”, Yalta, Russia

²FSFIS “Research Institute of Agriculture of Crimea”, Simferopol, Russia

²Federal State Budget Scientific Institution “Research Institute of Agriculture of Crimea”, Simferopol, Russia

Essential oil rose is one of the world’s best known aromatic plants. Its products are widely used in the perfumery, cosmetics and food industry, as well as in medicine. To improve not only traditional methods of breeding and seed production, but also biotechnological ones (in particular, embryoculture, creation of collections *in vitro*), optimization of the main stages of clonal micropropagation is necessary. The purpose of this work was to study the influence of genotype, culture medium composition and duration of cultivation on rooting in the process of clonal micropropagation of essential oil rose *in vitro*. In this work we studied the main rose essential oil cultivars grown in the Crimea – Raduga, Lany, Lada, Michurinka, Festivalnaya, obtained with the participation of species *Rosa gallica* L., *R. damascena* Mill., *R. alba* L. To introduce into the aseptic culture, meristems with one pair of leaf primordia (0.3-0.4 mm) isolated from axillary buds of plants were used as explants. In most cultivars, the development of main shoot, as well as axillary and adventitious buds and shoots, were observed at the 1st and 2nd stages of micropropagation. Analysis of the explant morphogenesis during clonal micropropagation shows the expediency of using for rose multiplication both microshoots with shortened internodes (micro sockets of leaves) and microcuttings from normally developed shoots, which makes it possible to increase the multiplication index. Rooting of the shoots was carried out *in vitro*, placing segments of the stem with one node on the modified MS nutrient medium with the addition of auxins (NAA, IAA, IBA). It was found that the maximum frequency of rhizogenesis and the number of roots was using medium ½MS with 0.5 mg L⁻¹ NAA. The highest frequency of rooting (100.0%) and the number of roots (7.3-7.7 pcs /shoot) were observed for Raduga and Festivalnaya cultivars. ‘Lada’ had the lowest frequency of rhizogenesis (85.7%), while ‘Lany’ had the lowest number of roots (4.9 pcs / shoot). When studying the influence of the passage on the rooting of rose microshoots *in vitro*, it was shown that for Raduga cultivar, when using microcutting obtained in the 2nd, 6th, and 9th passages, there were no significant differences in the frequency of rooting and the number of roots. At the same time, as the passage increased, a significant growth in the frequency of rhizogenesis and the number of roots on the explant was observed for ‘Michurinka’. This study was funded by a research grant № 14-50-00079 of the Russian Science Foundation.

Микробиоценоз филлосферы некоторых культурных растений семейства *Grossulariaceae*

¹Ерина Н.В., ¹Коптева Т.С., ²Ковалева И.А.

¹Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия

²Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

E-mail: spero-89@mail.ru

Филлосфера это поверхности растений, контактирующие с воздухом – важная и вездесущая среда обитания бактерий. Бактерии, ассоциированные с листьями, представлены широко распространёнными и древними симбиозами, которые функционируют и влияют на рост растения-хозяина многими путями, включая выработку питательных ростостимулирующих веществ и гормонов и защиту растений от различных инфекций. На состав эпифитной микрофлоры оказывает влияние микрофлора почвы (особенно у молодых растений), так как при прорастании бактерии, микроскопические грибы, дрожжи неизбежно попадают на молодые побеги. Количество микроорганизмов, обнаруживаемых на поверхности листьев, иногда может достигать 10^8 клеток на грамм свежих листьев, или 10^6 на 1 см^2 , что вполне сопоставимо с численностью микроорганизмов в грамме почвы. На поверхности корневой системы и наземных частей растений во время их жизни, выделяются различные органические соединения, синтезированные растительным организмом. Цель работы является определение видового состава эпифитной микрофлоры филлосферы (бактерий, дрожжей и дрожжеподобных организмов, микроскопических грибов), выявление количественной динамики и определение характера взаимоотношений некоторых представителей микрофлоры. В качестве модельных растений были выбраны растения семейства *Grossulariaceae* (*Ribes niveus*, *R. nigrum*, *R. rubrum*, *Grossularia sp.*). В ходе проведенного эксперимента для выделения микроорганизмов с поверхностей растений применяли метод отпечатка листовой пластинки с применением стандартных питательных сред. Для установления характера взаимоотношений между выделенными штаммами микроорганизмов пользовались методом блочков и перпендикулярных штрихов. Для определения ростостимулирующих свойств в качестве модельного объекта использовали семена пшеницы. В результате проведенной работы были определены типичные представители эпифитной нормофлоры растений семейства *Grossulariaceae*. Состав микрофлоры растений, относящихся к разным видам, в целом представлен сходными представителями, при этом выявлены отличия их количественного состава. Изучение характера их взаимоотношений позволило выявить виды, проявляющие фунгицидные свойства, некоторые штаммы проявляли ростостимулирующие свойства. В результате проведенной работы проведен анализ состава бактериальной микрофлоры, проявляющей фунгицидные свойства и их корреляцию с составом микроскопических грибов – эпифитов и дрожжей.

Microbiocenosis of phyllosphere of some cultivated plants of *Grossulariaceae* family

¹Erina N.V., ¹Kopteva T.S., ²Kovaleva I.A.

¹Stavropol state medical university, Stavropol, Russia

²North-Caucasus federal university, Stavropol, Russia

Phyllosphere is the surfaces of plants contacting with air – an important and ubiquitous environment of bacteria. Bacteria associated with leaves are represented by widespread and very old symbioses that function and influence the growth of a host plant in many ways, including generating nutritive growth stimulative materials and hormones and protection of plants from different infections. Composition of epiphytic microflora is influenced by soil microflora (especially in young plants), as during the germination bacteria, microscopic fungi, yeasts inevitably get on the young shoots. The number of microorganisms found on the surface of the leaves can sometimes reach 10^8 cells for one gram of fresh leaves, or 10^6 for 1 cm^2 , which is quite comparable with the quantity of microorganisms in a gram of soil. Different organic compounds, synthesized by a vegetative organism, are exuded on the surface of root system and aboveground parts of plants during their lifetime. The purpose of the work is determination of species composition of epiphytic microflora of phyllosphere (bacteria, yeasts and yeastlike organisms, microscopic fungi), revelation of quantitative dynamics and determination of type of mutual relations of some representatives of microflora. Plants of *Grossulariaceae* family (*Ribes niveus*, *R. nigrum*, *R. rubrum*, *Grossularia sp.*) were chosen as model plants. In the course of the performed experiment the method of lamina imprint with the use of standard nutrient media was implemented for separation of microorganisms from plant surfaces. To ascertain the type of mutual relations between isolated cultures of microorganisms agar block and perpendicular lines method was used. To determine growth stimulative properties wheat seeds were used as a model object. As a result of the work that was carried out, typical representatives of epiphytic normal flora of plants of *Grossulariaceae* family were determined. The composition of microflora of plants belonging to different species is in general embodied in similar representatives, meanwhile differences of their quantitative composition are identified. Study of type of their mutual relations made it possible to determine species showing fungicidal properties, some cultures showed growth stimulative properties. As a result of the performed work analysis of composition of bacterial microflora showing fungicidal properties and their correlation with composition of microscopic fungi – epiphytes and yeasts was done.

Энтомопатогенный микробиологический препарат «Битокс» для борьбы с вредителями-фитофагами

Ермолова В.П., Гришечкина С.Д., Яхно В.В., Антонец К.С., Нижников А.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург, Россия

E-mail: ermolovavalya1940@mail.ru

Ежегодные потери продукции растениеводства от вредных организмов могут достигать 30-50%, поэтому защите сельскохозяйственных культур придается большое значение. Среди микробиологических средств защиты растений лидерство принадлежит препаратам, созданным на основе разных подвигов энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis* (Bt). Перспективность и широкое использование препаратов на основе Bt связаны с безопасностью для нецелевых объектов и в первую очередь, для человека и теплокровных животных. В ФГБНУ ВНИИСХМ разработан энтомоцидный препарат широкого спектра действия «Битокс» на основе приоритетного штамма *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* №800/15 (патент РФ №2514211 от 27.04.2014). Препарат представляет собой жидкость, легко разбавляемую водой до необходимой рабочей концентрации, удобной для применения серийной опрыскивающей аппаратуры. Биологическая активность препарата, произведенного на базе филиала «Экос» ФГБНУ ВНИИСХМ, характеризуется следующими параметрами: титр $3,5-3,6 \pm 0,1$ млрд. КОЕ/мл; содержание экзотоксина, выраженное в ЛК50 (концентрация препарата, вызывающая гибель 50% особей соответствующего вида), $3,1-3,2 \pm 0,1$ мкл/г корма для личинок второго возраста комнатной мухи (*Musca domestica* Linn.); $0,24 \pm 0,02\%$ культуральной жидкости для личинок второго возраста колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say.), полученных из природной популяции. Полевые испытания препарата «Битокс» против колорадского жука, проведенные на картофеле, показали, что применение препарата позволяет увеличить урожайность на 11,0-11,7% в Ленинградской области и на 13,7-14,1% в Краснодарском крае. Испытания против паутинного клеща (*Tetranychus urtica* L.) показали эффективность в полевых условиях на сое – 96,0%, в защищенном грунте на огурцах – 98,4%; против белокрылки (*Trialeurodes vaporariorum* West.) – 100% (Краснодарский край); против капустной моли (*Plutella xylostella* L.) и капустной белянки (*Pieris brassica* L.) на капусте эффективность «Битокса» составила 80,0-95,6%. В целом, проведенные нами исследования показали высокую энтомоцидную активность «Битокса» против широкого круга вредителей, не уступающую химическим эталонам. В связи с возрастающей потребностью в экологически чистой продукции, расширение ассортимента биологических инсектицидов является весьма актуальным, так как применение этих препаратов способствует существенному снижению пестицидной нагрузки на окружающую среду. Работа выполнена в рамках Государственного задания (шифр темы 0664-2018-0021).

Entomopathogenic microbiological insecticide «Bitoks» for the control of phytophagous pests

Ermolova V.P., Grishechkina S.D., Yakhno V.V., Antonets K.S., Nizhnikov A.A.

Federal State Budget Scientific Institution "All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology", St. Petersburg, Russia

The annual loss of crop production from pests can reach 30-50%. Thus, the protection of crops is of great importance. The biological insecticides based on different subspecies of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) are most commonly used biological agents for protection of plants. The prospects and wide use of Bt-based insecticides are associated with safety for non-target species, primarily, for humans and warm-blooded animals. The biological insecticide of a broad spectrum of action "Bitoks" based on the strain of *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* №800/15 has been developed at ARRIAM (Patent of the Russian Federation No. 2514211 dated April 27, 2014). "Bitoks" represents a liquid that is easily diluted with water to the required working concentration, convenient for the use of serial spraying equipment. The biological activity of "Bitoks" produced at "Ecos" branch of ARRIAM was characterized by the following parameters: a titer was $3.5-3.6 \pm 0.1$ billion CFU / ml; exotoxin content expressed in LC50 (50% lethality of individuals of target species) was $3.1-3.2 \pm 0.1$ µl / g of feed for the second-stage larvae of the house fly (*Musca domestica* Linn.); $0.24 \pm 0.02\%$ of the culture fluid for the second-stage larvae of the Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) obtained from the natural population. Field tests of the "Bitoks" insecticide against the Colorado beetle conducted on potatoes showed that the use of this insecticide makes it possible to increase the productivity of land by 11.0-11.7% in the Leningrad Region and by 13.7-14.1% in the Krasnodar Territory. The tests of the "Bitoks" against the spiderweb mite (*Tetranychus urtica* L.) and whitefly (*Trialeurodes vaporariorum* West.) showed efficacy against the spiderweb mite for soybeans grown in the field of 96.0%, for cucumbers grown in the sheltered ground of 98.4%, while the efficiency against white flies was 100% (Krasnodar region). The efficiency of "Bitoks" against the cabbage moths (*Plutella xylostella* L.) and the cabbage whiting (*Pieris brassica* L.) for cabbage was 80.0-95.6%. Overall, our study demonstrated high entomocidal activity of "Bitoks" against a wide range of pests, which was not inferior to chemical standards. Regarding the growing demand for environmentally friendly products, the expansion of the range of biological insecticides is very relevant, especially considering the use of these drugs provides a significant reduction in the environmental pollution by pesticides. The work was supported by the Budget project (0664-2018-0021).

Особенности производства и применения микромицет-бактериального препарата для гумификации растительных остатков

¹Жемякин С.В., ^{1,2}Попов А.А., ²Свиридова О.В., ²Воробьев Н.И., ³Пищик В.Н.

¹ООО «Петербургские Биотехнологии», Санкт-Петербург, Россия

²ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

³ФГБНУ Агрофизический НИИ, Санкт-Петербург, Россия

E-mail:svzhem@gmail.com

Интенсивные агротехнологии, не учитывающие приоритет естественных процессов в микробно-растительных биосистемах, привели к дисбалансу углеродных процессов в земледелии. Неограниченное расходование энергетических и питательных ресурсов почв вынуждает проводить восстановление их агрохимических и агрофизических свойств и поддержки биологического разнообразия почвенной биоты. В сложившейся критической ситуации возрастает роль биопрепаратов, направленных на микробиологическую гумификацию растительных остатков. Фундаментальной особенностью использования биопрепаратов является поддержка в микробно-растительной системе уникальной способности к саморегулированию и самовосстановлению функций в окружающей среде. Использование биопрепаратов предполагает их гармоничную интеграцию в современные экологические агротехнологии: органические и минеральные удобрения, севооборот, биологический азот, фито-защитные и стимулирующие мероприятия, No-till культивирование почв. Целью этой работы было создание технологии производства, масштабирование объемов и условий применения микромицет-бактериального препарата МИКОБАКТ, предназначенного для гумификации растительных остатков. МИКОБАКТ сертифицирован в РФ. МИКОБАКТ содержит комплекс бактериальных и грибных продуцентов для трансформации лигноцеллюлозы растительных остатков до гумусовых форм. МИКОБАКТ применяется в России, Украине, Казахстане, Намибии, Германии и Литве. Испытания МИКОБАКТ показали, что он улучшает фитопатогенное состояние почв, привлекая патогенную микрофлору к полезной деструктивной деятельности. Сравнительно низкая стоимость МИКОБАКТа обеспечивала его высокую конкурентоспособность на рынке аналогичных биологических препаратов: Стернифаг, Экстрасол и другие.

Features of production and application of micromycete-bacterial preparation for humification of plant residues

¹Zhemyakin S.V., ^{1,2}Popov A.A., ²Sviridova O.V., ²Vorobyov N.I., ³Pishchik V.N.

¹LLC "Petersburg Biotechnologies", St.Petersburg, Russia

²All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, St.Petersburg, Russia

³Agrophysical Research Institute, St.Petersburg, Russia

Intensive agrotechnologies that do not take into account the priority of natural processes in plant-microbial biosystems to an imbalance of carbon processes in agriculture have led. Unlimited use of energy and nutrient resources of soils forces the restoration of their agrochemical and agrophysical properties and supports the biological diversity of soil biota. In the formed critical situation, the role of biological preparations is increasing aimed at microbiological humification of plant residues. A fundamental feature of the use of biopreparations is the support into plant-microbial system a unique ability to self-regulating and self-restoring the functions in the environment. The using of biopreparations assumes their harmonious integration into modern ecological agrotechnologies: organic and mineral fertilizers, crop rotation, biological nitrogen, phyto-protective and stimulating measures, No-till cultivation of soils and others. The goal of this work was the creating of production technology, the scaling of the volumes and conditions of application of the micromycete-bacterial biopreparation MICOBACT intended for humification of plant residues. MICOBACT is certified in the RF. MICOBACT contains a complex of bacterial and fungal producenes for the transformation of lignocellulose from plant residues to humus forms. MICOBACT is used in Russia, Ukraine, Kazakhstan, Namibia, Germany and Lithuania. MICOBACT tests showed that it improves the phytopathogenic state of soils, attracting pathogenic microflora to useful destructive activity. The comparatively low cost of MICOBACT ensured its high competitiveness in the market of similar biopreparations: Sternifag, Exstrasol and others.

Геномика и транскриптомика симбиотических систем, образуемых горохом посевным (*Pisum sativum* L.)

¹Жуков В.А., ¹Афонин А.М., ¹Жернаков А.И., ¹Клюкова М.С., ¹Кулаева О.А., ¹Сулима А.С., ¹Штарк О.Ю., ^{1,2}Тихонович И.А.

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: vladimir.zhukoff@gmail.com

Горох посевной (*Pisum sativum* L.), являющийся ценной сельскохозяйственной культурой, обладает сложноорганизованным геномом, секвенирование которого пока не осуществлено. Использование РНК-секвенирования для тотального анализа экспрессии генов, однако, позволяет успешно изучать генетические основы азотфиксирующего и арбускулярно-микоризного симбиозов у гороха. В ходе работы был создан комбинированный транскриптом гороха посевного, который можно использовать в качестве «референса» для аннотирования транскриптов, идентифицируемых в ходе анализа дифференциальной экспрессии генов при помощи РНК-секвенирования. В дальнейшем были исследованы транскрипционные профили симбиотических клубеньков серии мутантов гороха с нарушениями последовательных стадий развития клубеньков при помощи секвенирования транскриптома на приборе Illumina HiSeq2000 с использованием технологии MACE (Massive Analysis of cDNA Ends), разработанной компанией GenXPro GmbH (Франкфурт-на-Майне, Германия). Технология состоит в секвенировании небольшого фрагмента, соответствующего каждой молекуле мРНК, и является более чувствительной к уровню экспрессии генов, чем обычное РНК-секвенирование. Профили дифференциальной экспрессии были проанализированы в комбинациях «дикий тип - мутант», а также в сравнении некоторых мутантов друг с другом. В результате были идентифицированы биологические процессы, нарушенные у различных мутантов, что проясняет детальную роль симбиотических генов, затронутых мутациями, в развитии и функционировании клубеньков. В частности, было охарактеризовано семейство генов, кодирующих NCR-пептиды (от англ. Nodule-specific Cysteine-Rich). Кроме того, были исследованы транскрипционные профили корней мутантов по гену *sym36*, необходимому для развития как азотфиксирующих клубеньков, так и арбускулярной микоризы, при образовании обоих типов симбиоза. В целом, результаты работы позволяют выявить набор генов, используемых растением для управления симбионтами, описать молекулярные механизмы взаимной регуляции симбионтами друг друга, а также расширить представления о генетическом контроле развития азотфиксирующего и арбускулярно-микоризного симбиозов. Работа поддержана грантами РФ 17-76-30016 и 16-16-00118.

Genomics and transcriptomics of symbiotic systems formed by pea (*Pisum sativum* L.)

¹Zhukov V.A., ¹Afonin A.M., ¹Kliukova M.S., ¹Kulaeva O.A., ¹Shtark O.Y., ¹Sulima A.S., ¹Zhernakov A.I., ^{1,2}Tikhonovich I.A.

¹All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St.Petersburg, Russia

²St.Petersburg State University, St.Petersburg, Russia

Pea (*Pisum sativum* L.), which is a valuable crop culture, has a complex genome, which yet has not been completely sequenced. However, the use of RNA sequencing for total analysis of gene expression allows one to study the genetic bases of nitrogen-fixing and arbuscular-mycorrhizal symbiosis in pea. In the course of the work, a combined transcriptome of pea was created, which can be used as a "reference" for annotating transcripts identified in the analysis of differential gene expression by RNA sequencing. Further, transcription profiles of symbiotic nodules of a series of pea mutants with violations of successive stages of nodule development were studied by sequencing the transcriptome on Illumina HiSeq2000 using the MACE technology developed by GenXPro GmbH (Frankfurt am Main, Germany). The technology consists of sequencing a small fragment corresponding to each mRNA molecule and is more sensitive to the genes' expression level than common total mRNA sequencing. The differential gene expression profiles were analyzed in "wild type vs. mutant" combinations, and also in comparison of some mutants to each other. As a result, biological processes disturbed in various mutants have been identified, which clarifies the detailed role of symbiotic genes affected by mutations in the development and functioning of nodules. In particular, the family of genes encoding NCR peptides (Nodule-specific Cysteine-Rich peptides) was characterized. In addition, the transcriptome profiles of roots of mutants in the gene *sym36*, which is necessary for the development of both nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza, were studied during formation of both types of symbiosis. In general, the results of the work allow us to identify a set of genes used by the plant for controlling symbionts, to describe the molecular mechanisms of mutual regulation of symbionts by each other, and to broaden the knowledge on genetic control of the development of nitrogen-fixing and arbuscular-mycorrhizal symbiosis. The work is supported by RSF grants ## 17-76-30016 and 16-16-00118.

Биотехнология получения линейного материала *Oryza sativa* L. как этап селекционного процесса

Замбриборщ И.С., Шестопап О.Л., Шпак Д.В., Бойко М.С.

Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения, Одесса, Украина
E-mail: izambriborsh@gmail.com

Создание эффективной биотехнологии получения дигамплоидных линий риса позволит значительно сократить цикл селекции новых сортов. По результатам наших исследований андрогенеза *in vitro* *Oryza sativa* L. показана перспективность и результативность проведения данных работ в Украине. В 2012-2017 гг. Проведено тестирование морфогенетического потенциала в культуре пыльников риса 35 гибридных популяций F₂ от межсортовых скрещиваний между отечественными и иностранными сортами. В результате исследований подобраны условия стерилизации эксплантов риса, выбран оптимальный срок предварительной обработки метелки (6-7 суток в воде при + 8-10 °С, темнота). Протестированы различные варианты питательных сред для индукции каллуса с микроспор пыльников риса и последующей регенерации. По данным результатам был получен Патент Украины на полезную модель UA 108514 U. Способ получения линий риса (Шестопап О.Л., Замбриборщ И.С., Шпак Д. В. - № u201512317; заявл. 14.12.2015; опубл. 25.07.2016. - Бюл. № 14/2016), который обеспечивает эффективный процесс формирования новообразований и способствует выходу достаточного количества зеленых регенерантов. Путем андрогенеза *in vitro* в культуре пыльников риса за шесть лет получено 2138 зеленых растения-регенерантов. После этапа адаптации к условиям *ex vitro*, выжило 822 регенеранты (38,4%). Из зелёных растений регенерантов (за 2012-2016 гг.) получено 183 линии риса посевного (процент спонтанной диплоидизации 24,9%). Данная работа ведется в тесном сотрудничестве с заведующим отделом селекции Института риса (г. Скадовск) к.с.-х.н. Д.В. Шпаком. Все полученные в лаборатории культуры тканей СГИ регенеранты после первого этапа адаптации к условиям *ex vitro* (2-3 недели) передаются на доращивание в Институт риса. В результате проведенной сотрудниками Института риса селекционной оценки лучших линий, установлено, что полученные (в 2012 году) методом культуры пыльников дигамплоидные линии риса характеризовались високорослостью, более высокими показателями продуктивной кустистости, имели более плотную кисть, а также превышали оригинальные сорта по показателям продуктивности главной метелки (2,98 - 5,99 г против 2,34 - 5,15 г у стандартов в зависимости от группы спелости). Шесть линий переданы для регистрации в Национальный центр генетических ресурсов растений Украины.

Biotechnology producing linear material *Oryza sativa* L. as the stage of the selection process

Zambriborshch I.S., Shestopal O.L., Shpak D.V., Boyko M.S.

Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, Odessa, Ukraine

Creating an effective biotechnology of obtain dihaploid rice lines will significantly reduce the cycle of breeding new varieties. According to the results of our research androgenesis *in vitro* of *Oryza sativa* L. were showed the prospects and effectiveness of these works in Ukraine. In 2012-2017 years, the morphogenetic potential in anther culture of rice 35 F₂ hybrid populations from intravarietal hybridization between domestic and foreign varieties have been tested. As a result of research selected sterilization conditions of rice explants and selected optimum panicle pretreatment period (6-7 days in water at + 8-10 ° C, dark). Different variants of nutrient media for callus induction from microspores of anthers, and subsequent regeneration of rice lines have been tested. According to the results, the patent of Ukraine for utility model UA 108514 U was received (The method of obtaining rice lines Shestopal OL, Zambbrorshch IS, Shpak DV - No. u201512317; application 14.12.2015; published on 25.12.2015; 2016. - Bulletin No. 14/2016), which provides an efficient process of formation of callus and support the produce of a sufficient number of green regenerants. The 2138 green plant regenerants were produced for six years in *in vitro* anther culture of rice. After the adaptation stage to *ex vitro* condition, were survived 822 regenerants (38.4%). The 183 lines of rice seed were gave from green plants regenerants (during 2012-2016). The spontaneous diploidization percentage 24.9%. This work is conducted in close cooperation with the Head of breeding Department of Institute of rice (Skadovsk) Ph.D. Shpak D.V. All regenerants obtained in the tissue culture laboratory of SGI after the first stage of adaptation to *ex vitro* conditions (2-3 weeks) have been transferred to the Institute for rice. As a result of a selection evaluation of the best lines conducted by the Institute of Rice, it was established that dihaploid lines of rice obtained in 2012 (by the method of anther culture) were characterized by high-growth, higher productivity, more dense panicle, and also exceeded the original varieties in terms of the productivity of the main panicle (2.98 - 5.99 g versus 2.34 - 5.15 g for the standards, depending on the ripeness group). Six lines for registration to the National Center for Plant Genetic Resources of Ukraine have been transferred.

Размножение шлемника байкальского *Scutellaria baicalensis* Georgi в культуре *in vitro* и оценка содержания флавоноидов в них

¹А.А. Зарипова, ²Р.Г. Фархутдинов

¹Южно-Уральский ботанический сад-институт, Уфа, Россия

²Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

E-mail: zaripova.al@mail.ru

Исследования сложной рецептуры восточной медицины показали, что шлемник байкальский входит в «элитную» группу наиболее часто употребляемых растений. Однако, природные ресурсы его ограничены и данный вид отличается медленной регенерационной способностью. Для сохранения растительного генофонда и активного использования БАВ шлемника байкальского актуальным является культивирование его методом *in vitro*. Целью данной работы являлась отработка приемов культивирования *in vitro* шлемника байкальского для получения устойчивой пролиферирующей культуры и определения потенциальных возможностей для массового размножения. В исследованиях были использованы следующие модели микроразмножения: пролиферация пазушных побегов и культивирование частей растения с последующей индукцией органогенеза. Лучшие результаты в процессе мультипликации получили путем активации пазушных меристем. При культивировании эксплантов на среде MS с добавлением БАП на 40 день культивирования наблюдалось множественное побегообразование. Коэффициент мультипликации равен 10,2. Наиболее оптимальной для множественного побегообразования является среда, содержащая БАП в концентрации 2 мг/л и ИУК в концентрации 0,5 мг/л. В ходе проведенных исследований выяснилось, что сумма флавоноидов в лекарственном сырье *Scutellaria baicalensis* составила 18,4% от сухого веса. В составе преобладал флавоноид байкалин - 16% от суммы флавоноидов. Содержание флавоноидов в каллусной ткани составило до 1,21 % от сухой массы, а содержание байкалина составило 11 % от суммы флавоноидов. Таким образом, в каллусной ткани наблюдается образование БАВ, однако в меньшем количестве, чем в природном растительном сырье.

Propagation of *Scutellaria baicalensis* Georgi *in vitro* culture and evaluation of the content of flavonoids in them

¹Zaripova A.A., ²Farkhutdinov R.G.

¹South Ural Botanical Garden Institute, Ufa, Russia

²Bashkir State University, Ufa, Russia

Studies of the complex formulation of Oriental medicine have shown that the Baikal skullcap is included in the "elite" group of the most commonly used plants. However, natural resources are limited and this species has a slow regenerative ability. For conservation of plant gene pool and active use of biologically active substances of *Scutellaria baicalensis* is the actual cultivation of his method *in vitro*. The aim of this work was to work out methods of cultivation *in vitro* of the Baikal skullcap to obtain a stable proliferating culture and identify potential opportunities for mass reproduction. The following models of micro-propagation were used in the studies: the proliferation of axillary shoots and the cultivation of parts of the plant with subsequent induction of organogenesis. The best results in the process of animation were obtained by activating the axillary meristem. When cultivating explants on MS medium with the addition of BAP on the 40th day of cultivation, multiple shoots were observed. The multiplier is 10.2. The most optimal for multiple shoots is the medium containing BAP at a concentration of 2 mg / l and IUC at a concentration of 0.5 mg/l. During the research it was found that the amount of flavonoids in the medicinal raw material *Scutellaria baicalensis* was 18.4% of the dry weight. The composition was dominated by flavonoid baicalin-16% of the amount of flavonoids. The content of flavonoids in callus tissue was up to 1.21 % of the dry mass, and the content of baicalin was 11% of the amount of flavonoids. Thus, the callus tissue is observed the formation of biologically active substances, but in smaller amounts than in natural plant material.

Антибактериальная активность экстрактов эндосперма плодов водяного ореха *Trapa sibirica* Fler. из озера Упканкуль Республики Башкортостан

¹Зулькарнаева Е.Ш., ²Артюхин А.Е., ³Михайлова Е.В., ^{1,2,3}Кулуев Б.Р.
¹Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия
²Башкирский государственный университет, Уфа, Россия
³Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия
E-mail: kuluev@bk.ru

Одной из проблем медицины на сегодняшний день является появление у микроорганизмов устойчивости к большому количеству антибиотиков. Большинство антибиотиков было получено из микроорганизмов и грибов, однако другие группы организмов, безусловно, также продуцируют многочисленные соединения с антимикробной активностью. Наиболее перспективными в этом плане являются растения. Водяной орех *Trapa* L. относится к семейству Дебрениковых (*Lythraceae*) и в Республике Башкортостан данное растение произрастает лишь в двух озерах Нуримановского района: Упканкуль и Бильгиляр, причем относится оно к виду *Trapa sibirica* Fler. Плоды водяного ореха представляют собой костянку состоящую из эндосперма, мезосперма и экзосперма. Целью нашей работы являлась сравнительная оценка антибактериальной активности спиртовых, водных и гексановых экстрактов эндосперма плодов водяного ореха диско-диффузионным методом. Плоды разделяли на ядра и оболочки, замораживали их при -70 °С и гомогенизировали в ступке с пестиком. Экстракцию метаболитов из этого порошка проводили отдельно в воде, гексане и 70% растворе этанола, при комнатной температуре в течение 4 часов при постоянном помешивании на шейкере. Затем экстракцию продолжали в холодильнике при температуре +4°С в течение 18 часов. В дальнейшем экстракт нагревали при 37°С и центрифугировали. Надосадочную жидкость использовали в эксперименте. В качестве положительного контроля использовали бумажные диски, пропитанные антибиотиком цефотаксимом. Спиртовые и водные экстракты ядер и мезосперма водяного ореха не проявили заметной антимикробной активности. В то же время гексановый экстракт эндосперма плодов водяного ореха оказывал существенное негативное воздействие на рост *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Таким образом, нами показано, что эндосперм плодов водяного ореха содержит метаболиты с антибактериальной активностью.

Antibacterial activity of endocarp extracts of *Trapa sibirica* Fler. fruits from Lake Upkankul of the Republic of Bashkortostan

¹Zulkarnaeva E.Sh., ²Artyukhin A.E., ³Mikhaylova E.V., ^{1,2,3}Kuluev B.R.
¹Bashkir State Medical University, Ufa, Russia
²Bashkir State University, Ufa, Russia
³Institute of Biochemistry and Genetics UFRS RAS, Ufa, Russia

One of the problems of medicine is the emergence of microorganisms resistance to a large number of antibiotics. Most antibiotics were obtained from microorganisms and fungi, but other groups of organisms certainly also produce numerous compounds with antimicrobial activity. The most promising in this regard are the plants. The water caltrop *Trapa* L. belongs to the family of the Lythraceae and in the Republic of Bashkortostan this plant grows only in two lakes of the Nurimanovsky district: Upkankul and Bilgilyar, and it refer to the species *Trapa sibirica* Fler. The fruit of the water caltrop is a drupe consisting of endocarp, mesocarp and exocarp. The purpose of our work was a comparative evaluation of the antibacterial activity of alcoholic, aqueous and hexane extracts of endocarps of water caltrop fruits by agar diffusion test method. Fruits were frozen at -70 °C and homogenized in a mortar with a pestle. Extraction of metabolites from this powder was carried out separately in water, hexane and 70% ethanol solution, at room temperature for 4 hours with constant stirring on the shaker. The extraction was then continued in the refrigerator at a temperature of +4°С for 18 hours. Subsequently, the extract was heated at 37°С and centrifuged. The supernatant was used in the experiment. As a positive control, disks impregnated with antibiotic cefotaxime were used. Alcohol and aqueous extracts of endosperm and mesocarp of the water caltrop did not show appreciable antimicrobial activity. At the same time, the hexan endocarp extract of the fruits had a significant negative effect on the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Thus, we have shown that the endocarps of the water caltrop fruits contains metabolites with antibacterial activity.

Цианобактерии как объекты биотехнологии

Зыкова Ю.Н., Домрачева Л.И., Трефилова Л.В., Ковина А.Л.

ФГБОУ ВО Вятская ГСХА, Киров, Россия

E-mail: orewek7@rambler.ru

В настоящее время цианобактерии (ЦБ) являются одной из самых перспективных групп микроорганизмов в области биотехнологии. Причина такой востребованности опираются на следующие особенности цианобактерий: 1. Они широко распространены в природе, обладая способностью быстро и свободно заселять разнообразные субстраты. 2. При этом среди ЦБ можно встретить большое количество экстремофилов, которые способны жить и размножаться в экстремальных условиях (повышенные и пониженные температуры, низкие и высокие значения pH, отсутствие влаги, засоленные субстраты и т.д.). 3. ЦБ относятся к бактериям, которые максимально используют возможность вступать в сложные симбиотические связи с другими микро- и макроорганизмами. ЦБ начинают использовать для создания биопрепаратов, востребованных в сельском хозяйстве, в биомониторинговых исследованиях, в очистке окружающей среды от загрязнения. Так, благодаря тому, что ЦБ обладают ризогенным эффектом, их используют для обработки семян многих ценных декоративных растений для более быстрого укоренения. На основе ЦБ можно составлять смешанные микробные ассоциации с программируемым составом, усиливающим полезные свойства ЦБ. Антагонистическая активность многих видов ЦБ доказана нами в опытах по подавлению фитопатогенных грибов р. *Fusarium* с бобовыми, злаковыми, декоративными, овощными и древесными культурами. Высокая сорбционная и детоксикационная активность ЦБ стала основой для предпосевной инокуляции семян при выращивании растений в почвах, загрязненных поллютантами. Доказаны также сорбционные возможности гомогената и биопленок ЦБ, используемые для очистки водных сред от ионов ТМ. Еще одним биотехнологическим аспектом, связанным с ЦБ, является их использование в качестве тест-организмов на загрязнение окружающей среды по следующим показателям: активность каталазы, содержание хлорофилла а и накопление малонового диальдегида при перекисном окислении липидов. Разработан экспресс-метод определения жизнеспособности клеток ЦБ в тестируемых средах по определению дегидрогеназной активности с использованием двух показателей: содержанию жизнеспособных клеток и накоплению фармазана. Практическое применение биотехнологических свойств ЦБ требует проведения дальнейших работ по определению оптимального титра при создании цианобактериальных биопрепаратов, сроков культивирования, используемых субстратов для выращивания ЦБ (жидкие среды, почва, опилки, сфагновый мох, смесь субстратов мох+опилки+почва, агаризованная паста).

Cyanobacteria as objects of biotechnology

Zykova Yu.N., Domracheva L.I., Trefilova L.V., Kovina A.L.

Of the Vyatka state agricultural Academy, Kirov, Russia

Now cyanobacteria (CB) are one of the most perspective groups of microorganisms in the field of biotechnology. The reason of such demand rely on the following features of cyanobacteria: 1. They are widespread in the nature, having ability quickly and freely to occupy various natural and artificial substrata. 2. At the same time among the CB it is possible to meet a large number of ekstremofil which are capable to live and breed in extreme conditions (the increased and lowered temperatures, low and high values pH, lack of moisture, the salted substrata, etc.). 3. The CB treat bacteria which as much as possible use an opportunity to enter difficult symbiotic communications with others micro- and macroorganisms. CB they begin to be used for creation of the biological products demanded in agriculture, in biomonitoring researches, in cleaning of the environment of pollution. So, thanks to the fact that the CB have rizogenny effect they are used for processing of seeds of many valuable ornamental plants for faster rooting. On the basis of the CB it is possible to make the mixed microbic associations with the programmable structure enhancing useful properties of the CB. The antagonistic activity of many types of the CB is proved by us in experiments on suppression of phytopathogenic fungus of river of *Fusarium* in vegetative and field experiments with bean, cereal, decorative, vegetable and wood cultures. The high sorption and detoksikatsionny activity of the CB became a basis for a preseeding inoculation of seeds at cultivation of plants in the polluted soils. Also sorption opportunities of the gomogenat and biofilms of the CB used for cleaning of water environments of heavy metals ions are proved. One more biotechnological aspect connected with the CB is their ispolzovanpy as a test-oganizm on environmental pollution on the following indicators: activity of a catalase, the maintenance of a chlorophyll and and accumulation of malon dialdehyde at lipid peroxidation. The express method of determination of viability of cells of the CB in the tested environments by determination of degidrogenazny activity with use of two indicators is developed. Practical use of biotechnological properties of the CB demands carrying out further works on definition of an optimum caption during creation of cyanobacterial biological products, terms of cultivation, the used substrata for cultivation of the CB (liquid bezazotisty environments, the soil, sawdust, a sfagnovy moss, mix of substrata a moss + sawdust + the soil, agarizovanny paste).

Организация *E. coli*, как основа биотехнологической биоинформатики, в концепции системы взглядов супрамолекулярной химии

Иванова Э.А., Тропынина Т.С.

Уфимский Институт биологии - Обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения УФИЦ РАН, Уфа, Россия

E-mail: fiona_belobor@mail.ru

В настоящее время самоорганизующиеся внутриклеточные процессы переходят в разряд рассмотрения супрамолекулярной химии. Это молодая и, в высшей степени, междисциплинарная область науки, иллюстрирующая сложные перекрёстные взаимосвязи физики, химии, микроэлектроники, биологии, связанных в единую цельную систему, на основе «химии запрограммированных несущих информацию молекул». Феномен такой самоорганизации, на знании взятых из законов природы, можно сравнить с самопроизвольной сборкой сложнейших пространственно-временных структур в живой клетке. Мы подошли к анализу молекулярно-генетической организации *E.coli*, представив её в виде супрамолекулярных ансамблей: бактериоплазмы-(БП), непрочно-(НС) и прочно-(ПС) связанных с клеточным остатком (КО) гетерополимеров, в супермолекулах которых уже запрограммирована память хромосомной организации и её реализации в циклах морфогенезных фаз роста и развития. Вся гигантская молекула ДНК бактерии представляет собой единицу репликации, ремоделинг которой обеспечивается при участии нуклеоидных (гистоноподобных - основных) белков, состав которых и взаимодействия с другими факторами окружающей среды, изменяются в зависимости от фазы роста и развития бактериальной клетки. Немалая роль в этом процессе принадлежит протеолитической системе. Наш интерес к Arg-X протеазо-процессингу был вызван тем, что по данным трёх царств эукариотов, аргининбогатые гистоны эволюционно стабильные белки, что свидетельствует о их важной роли в сохранении и реализации генетической информации в процессах структурирующих упаковку ДНК. Притом известно, что из всех аминокислот только аргинин связывается с ДНК. Последовательное исследование динамики насыщенности кислыми/основными белками супраблоков: (БП), (НС), (ПС) (КО) в процессе многих клеточных делений и фаз развития продемонстрировало, что в экс-поненциальной фазе роста Arg-X -процессинг функционирует на уровне основных и нуклеоидных белков БП – жидко-кристаллической внутриклеточной поверхностной структуры, а также «кислых» белков КО. При переходе в фазу замедления (линейного роста) Arg-X процессинг функционирует главным образом в кислых/основных белках супраструктур НС и ПС, а при переходе к остановке роста в кислых/основных белках супраструктур НС и вновь проявляются активные зоны в БП. Экспериментальные данные биологов-биохимиков в области супрамолекулярной химии могут быть интересны физико-химикам и биотехнологам.

Organization of *E. coli*, as basis of the biotechnological bioinformatics, in conception of system of looks of of supramolecular of chemistry

Ivanova E.A., Troynina T.S.

Ufa Institute of Biology of UFRS RAS, Ufa, Russia

Presently self-optimizing intracellular processes pass to the digit of consideration of supramolecular chemistry. It is a young and, in a high degree, interdisciplinary area of science, illustrating within of physics, chemistry, microelectronics, biology, bound in the single whole system, on the basis of "chemistry of the programed information-carrying molecules". Phenomenon of such самоорганизации, on knowledge taken from natural laws, it is possible to compare to the spontaneous assembling of the most difficult spatio-temporal structures in a living cage. We walked up to the analysis of molecular-genetic organization of *E.coli*, presenting her as supramolecular ensembles: bacterioplasm - (BP), fragile- (FR) and durable- (DR) of the heteropolymers related to the cellular remain (CR), in the supermolecules of that memory of chromosomal organization and her realization is already programed in the cycles of морфогенезных phases of height and development. All giant molecule of DNA of bacterium is unit of replication, remodeling provided that with participation of nucleotide (histone-like, basic) proteins composition of that and co-operating with other factors of environment, change depending on the phase of growth and development of bacterial cell. A considerable role in this process belongs to the protease-processing system. Our interest in Arg-X to protease-processing was caused by that from data of three reigns of eukaryotes, arginine-rich histones evolutionary stable proteins, that testifies to their important role in maintenance and realization of genetic information in the processes of structure-forming packing DNA. It is besides known that from all amino acids only an arginine contacts with DNA. Successive research of dynamics of saturation of sour/by the basic proteins of suprablocs: (BP), (FR), (DR) (CR) in the process of many cellular divisions and phases of development showed, that in the exponential phase of height of Arg-X-processing functions at the level of basic and nucleoid proteins of BP - liquid-crystallineintracellular surface structure, and also "sour" proteins of CR. In transition in the phase of deceleration (linear height) of Arg-X processing functions mainly in the sour/basic squirrel of suprablocs FR and DR, and in transition to the stunt of growth in the sour/basic squirrel of suprablocs FR and again active zones show up in BP. Experimental data of biologists-biochemists in area of supramolecular chemistry can be interesting to physic-chemistry and biotechnologists.

Оценка жизнеспособности черенков древесных растений после криозаморозки

Ишмуратова М.Ю.

Карагандинский государственный университет имени академика Е.А. Букетова, Караганда, Казахстан

E-mail: margarita.ishmur@mail.ru

Сохранение генофонда культурных и дикорастущих видов растений является одной из основных задач в отечественном растениеводстве. В настоящее время около 100 тысяч видов растений находятся под угрозой потери их генетического разнообразия. В связи с этим возрастает интерес к банкам зародышевых плазм семян, меристем, черенков, пыльцы и культур клеток как средству долговременного хранения геномов и генетических стандартов культурных и дикорастущих растений. Наиболее перспективным режимом хранения растительной гермоплазмы считается криоконсервация - замораживание в жидком азоте при сверх критических низких температурах. Целью настоящего исследования являлось определение жизнеспособности черенков плодовых древесных культур (яблоня домашняя и смородина черная) после криоконсервации. Исследования выполнены на базе лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии растений биолого-географического факультета Карагандинского государственного университета имени академика Е.А. Букетова в 2016-2018 гг. черенки длиной 6–8 см и толщиной от 0,5 до 1 см замораживали при различных условиях, варьируя состав криопротекторов и тару (пластиковые пакеты и пакеты из фольги). Размораживание осуществлялось при комнатной температуре. Жизнеспособность черенков после размораживания оценивали по распусканию почек при посадке в грунт. Полученные результаты показали, что успешно криоконсервацию выдерживают толстые, хорошо сформировавшиеся черенки при влажности не более 10-12 %. Наилучшие результаты для обоих видов получены при замораживании в таре из фольги с применением смеси криопротекторов (глюкоза 20 % и глицерин 20 % в соотношении 1:1). Выживаемость черенков яблони составила 95-100 %, черной смородины –67-77 %. При применении других криопротекторов (сахароза, фруктоза, глицерин) аналогичные результаты не превышали 33-50 %. Контрольные варианты (без применения криопротекторов) показали минимальные результаты выживаемость – 12-16 %. Таким образом, заморозку черенков изученных древесных растений необходимо вести только для толстых образцов, в таре из фольги с применением смеси 20 % растворов глюкозы и глицерина.

Assessment of viability of shanks of wood plants after cryo freezing

Ishmuratova M.Yu.

Karaganda State University named after academician Ye.A. Buketov, Karaganda, Kazakhstan

Preservation of a gene pool of cultural and wild-growing species of plants is one of the main tasks in domestic agricultural study. Present days about 100 thousand species of plants are under the threat of loss of their genetic variety. In this regard interest in banks of germinal plasmas of seeds, meristems, shanks, pollen and the cellular cultures as to means of long-term storage of genomes and genetic standards of cultural and wild-growing plants increases. The most perspective method of storage of vegetable germ plasma is considered a cryopreservation - freezing in liquid nitrogen at over critical low temperatures. The purpose of the present research was definition viability of shanks of fruit wood crops (an apple-tree and blackcurrant) after a cryopreservation. Researchers are executed on the basis of laboratory of molecular genetics and plant biotechnology of biological and geographical faculty of the Karaganda State University named after academician Ye.A. Buketov in 2016-2018. Studied shanks 6-8 cm long and from 0,5 to 1 cm thick froze under various conditions, varying structure of cryoprotectors and a container (plastic and foil packages). Defrosting was carried out at the room temperature. The viability of shanks after defrosting was estimated on blooming of buds after landing at soil. The received results have shown that successfully a cryopreservation the thick, well created shanks at humidity maintain no more than 10-12%. The best results for both plant species are received after freezing in a foil container and with use of mix of cryoprotectors (20 % solutions of glucose and glycerin in the ratio 1:1). The survival of shanks of an apple-tree was 95-100%, blackcurrant was 67-77%. Application of other cryoprotectors (sucrose, fructose, glycerin) didn't exceed similar results stayed on the level of 33-50%. Control variant (without application of cryoprotectors) have shown the minimum results survival – 12-16%. Thus, freezing of shanks of the studied wood plants needs to be conducted only for thick samples, in a foil container with use of mix of 20% of solutions of glucose and glycerin.

CG-богатая синтетическая последовательность в 5' - НТО увеличивает активность транскрипции и трансляции в растениях

^{1,2}Кабардаева К.В., ¹Тюрин А.А., ³Мустафаев О., ¹Павленко О.С., ¹Гра О.А., ¹Фадеев В.С., ¹Голденкова-Павлова И.В.

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

²Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

³Бакинский государственный университет, Баку, Азербайджан

E-mail: kabardaewa@yandex.ru

Детальный анализ модульной структуры регуляторных районов эукариотических генов, включая растений, становится лидирующим направлением в изучении механизмов регуляции экспрессии генов. Поэтому мы провели исследования на трансгенных растениях табака для изучения вклада CG-богатой синтетической последовательности в эффективность экспрессии репортерного гена термостабильной лихеназы на уровне транскрипции и трансляции. Использование регуляторных последовательностей, характерных для индивидуальных генов, с целью изучения их функциональной роли в регуляции экспрессии генов, по нашему мнению, не позволяет учесть разнообразие потенциальных регуляторных мотивов, вариации в CG-содержании и вторичной структуры в последовательностях, т.е. нивелировать индивидуальные свойства последовательности. В связи с этим в своем исследовании мы использовали синтетическую последовательность, которая содержит характерные для 5'-областей генов растений CG-богатые мотивы и имеет размер 405 п.н., который, с одной стороны, близок среднему размеру 5'-НТО генов, включенных в анализ, а, с другой стороны, число нуклеотидов в этой последовательности кратно трем, что позволило дополнительно использовать ее и как 5'-область кодирующей последовательности гибридного гена, в котором синтетическая последовательность слита в рамке считывания с последовательностью репортерного гена. Наши результаты позволяют заключить, что CpG динуклеотиды, локализованные в 5'-области гетерологичного гена, увеличивают активность транскрипции в растениях, при этом не исключают и положительный вклад синтетической CG-богатой последовательности, содержащей мотивы, характерные для 5'-области генов растений, в эффективность трансляции мРНК гетерологичных генов.

CG-rich synthetic sequence in the 5' - UTR increases the activity of transcription and translation in plants

^{1,2}Kabardaeva K.V., ¹Tyurin A.A., ³Mustafaev O., ¹Pavlenko O.S., ¹Gra O.A., ¹Fadeev V.S., ¹Goldenkova-Pavlova I.V.

¹Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

³Baku State University, Baku, Azerbaijan

Detailed analysis of the modular structure of eukaryotic gene regulatory areas, including plants, is becoming a leading trend in the study of mechanisms for regulating gene expression. Therefore, we have conducted studies on transgenic tobacco plants to examine the contribution of the CG-rich synthetic sequence in the expression efficiency of the reporter gene for thermostable lichenase at the level of transcription and translation. The application of regulatory sequences specific to individual genes to study their functional role in regulating gene expression, in our opinion, does not allow to take into account the diversity of potential regulatory motives, variations in CG-content and secondary structure in sequences, i.e. to level the individual properties of the sequence. In this regard, in our study, we used a synthetic sequence that contains typical for 5'-regions of plant genes CG-rich motifs and has a size of 405 p.n., which, on the one hand, is close to the average size of 5'-NTO genes included in the analysis, and, on the other hand, the number of nucleotides in this sequence is a multiple of three, which allowed to use it as well as 5' - region coding sequence of a hybrid gene, in which the synthetic sequence is merged in the frame of reading with a sequence of a reporter gene. Our results allow to conclude that the CpG dinucleotide, localized in the 5' region of the heterologous gene increase the activity of transcription in plants, it does not rule out the positive contribution of synthetic CG-rich sequence containing motifs characteristic of the 5'-region of genes of plants, the efficiency of translation of mRNA of heterologous genes.

Критерии отбора маркеров для наборов микросателлитов, используемых для оценки генетического разнообразия популяций ели европейской и сосны обыкновенной

Калько Г.В., Кузьмина М.В., Котова Т.М.

Федеральное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский институт лесного хозяйства», Санкт-Петербург, Россия
E-mail: kagava0720@gmail.com

Основными критериями при составлении панелей микросателлитных маркеров для оценки генетического разнообразия ели европейской и сосны обыкновенной считали стабильную амплификацию, отсутствие множественных ампликонов, средний и (или) высокий уровень полиморфизма, отсутствие нулевых аллелей и подтверждение селективной нейтральности маркеров. Из 30 опубликованных ранее ядерных микросателлитов ели было отобрано 12 стабильно амплифицирующихся локусов. Девять средне- и высокополиморфных локусов (PIC от 0,427 до 0,811) тестировали в выборках из 27-31 особи из 3-х естественных и 2-х искусственных популяций ели. Из 37 ранее опубликованных ядерных микросателлитных маркеров сосны были отобраны 23 стабильно амплифицирующихся локуса. Четырнадцать средне- и высокополиморфных локусов (PIC от 0,556 до 0,891) были тестированы на материале сосны из 3-х естественных (по 30 особей) и 4-х искусственных (по 15 особей) популяций. Микросателлитный анализ включал амплификацию отобранных локусов с праймерами, мечеными флуоресцентными красителями, и фрагментный анализ результатов ПЦР на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 Applied Biosystems. Данные анализировали с помощью программ GenAlEx 6.503, Genepop 4.7.0 и Popgene32. По 4 маркера ели и сосны были отбракованы из-за вероятности нулевых аллелей, превышающей 5 % в ряде популяций (Genepop 4.7.0). Два из отброшенных локусов сосны находились под действием балансирующей селекции в одной из семей полусибсов (Popgene32). В изученных популяциях наблюдаемая гетерозиготность (H_o) у ели варьировала от 0,407 до 0,540; у сосны – от 0,598 до 0,732 (GenAlEx 6.503). При использовании поправки Бонферрони выявлено сцепление по одной паре разных локусов в обеих исследованных семьях полусибсов ели. У сосны неравновесие по сцеплению выявлено у 2 локусов в одной из естественных популяций (Genepop 4.7.0). В качестве косвенного критерия достаточности числа локусов для оценки генетического разнообразия ели и сосны использовали оценку вероятности генотипа (GP). Вероятность генотипов особей ели при использовании 5 маркеров в естественных популяциях составляет от $3,0 \cdot 10^{-6}$ до $3,5 \cdot 10^{-2}$, в семьях полусибсов – от $2,7 \cdot 10^{-6}$ до $1,6 \cdot 10^{-2}$. Вероятность генотипов сосны в естественных популяциях варьирует от $9,3 \cdot 10^{-11}$ до $1,7 \cdot 10^{-6}$, в семьях полусибсов – от $7,5 \cdot 10^{-11}$ до $1,4 \cdot 10^{-5}$ (GenAlEx 6.503). Сделан вывод о необходимости увеличения числа маркеров для анализа генетического разнообразия ели европейской. Желательно увеличение числа маркеров для сосны.

The criteria for the selection of markers for microsatellite set used for estimation of genetic diversity of European spruce and Scots pine populations

Kalko G.V., Kuzmina M.V., Kotova T.M.

Saint Petersburg Forestry Research Institute, Saint Petersburg, Russia

The main criteria used for the development of set of microsatellite markers for estimation of the genetic diversity of European spruce and Scots pine were the stable amplification, the absence of multiple amplicons, the average and (or) high level of polymorphism, the absence of null alleles and confirmation of the selective neutrality of markers. 12 stably amplified loci were selected from 30 previously published nSSR of spruce. Nine medium and high polymorphic loci (PIC from 0,427 to 0,811) were tested on 27-31 individuals in 3 natural and 2 artificial spruce populations. 23 stably amplified loci were selected from 37 previously published nSSR of pine. 14 medium and high polymorphic loci with a PIC value from 0,556 to 0,891 were tested on Scots pine trees from 3 natural (30 per population) and 4 artificial (15 trees) populations. Microsatellite analysis included amplification of selected loci with primers labeled with fluorescent dyes and fragment analysis of PCR results with using the ABI PRISM 3500 Applied Biosystems genetic analyzer. The data was analyzed with help GenAlEx 6.503, Genepop 4.7.0 and Popgene32 programs. 4 spruce and 4 pine markers were discarded because of the probability of null alleles exceeded 5 % in a several populations (Genepop 4.7.0). It was shown that two of the discarded loci of pine were under the influence of balancing selection (Popgene32). The observed heterozygosity (H_o) varied from 0,407 to 0,540 and from 0,598 to 0,732 in spruce and pine tested populations, correspondingly (GenAlEx 6.503). The linkage disequilibrium at the 0,05 confidence level with Bonferroni correction was made. The linkage disequilibrium between 2 pair of different loci was detected in both tested half-sibs families of spruce and between 1 pair of loci in one of the natural population of pine (Genepop 4.7.0). As an indirect criterion of the sufficiency of the number of loci for assessing the genetic diversity of spruce and pine, the probability of genotype (GP) estimation was used. The genotype probability (GP) varied from $3,0 \cdot 10^{-6}$ до $3,5 \cdot 10^{-2}$ for natural and from $2,7 \cdot 10^{-6}$ to $1,6 \cdot 10^{-2}$ for artificial populations of European spruce and from $9,3 \cdot 10^{-11}$ to $1,7 \cdot 10^{-6}$ for natural and from $7,5 \cdot 10^{-11}$ to $1,4 \cdot 10^{-5}$ for half-sibs families of pine (GenAlEx 6.503). It was concluded that there is a need to increase the number of markers for genetic diversity evaluation of European spruce and it is desirable to increase the number of markers for Scots pine.

Методы молекулярной спектроскопии в микробной биотехнологии

Камнев А.А., Тугарова А.В.

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

E-mail: a.a.kamnev@mail.ru

Одним из важнейших условий развития микробной биотехнологии является понимание метаболических процессов, протекающих в клетке, на молекулярном уровне. В агробиотехнологии такие процессы лежат в основе реакции бактерий, участвующих в растительно-микробных взаимодействиях, на условия окружающей среды, сигнальные молекулы и различные стрессовые факторы. Методы молекулярной спектроскопии основаны на регистрации результатов взаимодействия электромагнитного излучения разных диапазонов с функциональными группами (группами атомов, связанных химическими связями) соединений, включая био(макро)молекулы, и, таким образом, дают уникальную информацию об их состоянии и его изменениях. Во многих случаях эти методы являются неразрушающими, используют минимальную пробоподготовку и малые количества исследуемого материала. Среди методов молекулярной спектроскопии, используемых в нашей исследовательской группе, особое место занимают методы колебательной спектроскопии – инфракрасная (ИК) фурье-спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния, применениям которых посвящен настоящий пленарный доклад. Оба метода связаны с регистрацией колебательных переходов функциональных групп, по энергии соответствующих ИК-диапазону электромагнитного спектра, но при этом основаны на различных физических принципах и дают взаимодополняющую информацию. Таким образом, данные методы чувствительны к химическому строению веществ (и в связи с этим широко используются в материаловедении и структурном химическом анализе). Важным их отличием, помимо индивидуальных спектроскопических “образов” различных функциональных групп, является также высокая чувствительность к любым межмолекулярным и внутримолекулярным взаимодействиям, изменяющим длины или энергии химических связей. Применительно к микроорганизмам это позволяет исследовать состояние и изменения основных биомакромолекул клетки (включая анализ компонентов вторичной структуры белков) *in situ*, образование и свойства биогенных наночастиц; осуществлять неразрушающий мониторинг накопления и расходования резервных веществ (таких как сложные полиэферы, накапливающиеся в виде гранул многими микроорганизмами в качестве запаса по энергии и углероду) и изменения их свойств как реакции на стрессы. Эти данные важны для оптимизации их биосинтеза, существенного как для выживаемости микроорганизмов, так и с целью получения биоразлагаемых биополимеров – экологических заменителей традиционных пластиков. Работа частично поддержана грантом РФФИ № 17-08-01696-а.

Molecular spectroscopy techniques in microbial biotechnology

Kamnev A.A., Tugarova A.V.

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

The development of modern microbial biotechnology is based on understanding cellular metabolic processes at the molecular level. In agricultural biotechnology, such processes underlie the responses of bacteria involved in plant-microbe interactions to environmental conditions, signalling molecules and various stress factors. Molecular spectroscopy techniques are based on registering the results of interactions of electromagnetic radiation from different wavelength ranges with functional groups (i.e., groups of atoms linked by chemical bonds) in chemical substances including bio(macro)molecules, and thus provide unique information on their state and its changes. Such techniques are often nondestructive, require minimum sample treatment and minor quantities of samples under study. Among the molecular spectroscopy techniques used in our research, a special role is played by vibrational spectroscopy techniques (Fourier transform infrared (FTIR) and Raman spectroscopies), microbiological applications of which will be featured in this plenary lecture. Both techniques are related to registering vibrational transitions of functional groups (within the infrared range of the electromagnetic spectrum). However, they are based on different physical principles and provide complementary information. Thus, these techniques are sensitive to the chemical structure of matter (and hence are widely used in materials science and structural chemical analysis). Their important feature, along with creating individual spectroscopic “images” of various functional groups, is their high sensitivity to virtually all intra- and intermolecular interactions which can alter the lengths or energies of chemical bonds. With regard to microorganisms, this allows for studying the state and changes of main biomacromolecular constituents of the cell (including the analysis of secondary structure components of proteins) *in situ*, microbially induced formation and properties of various biogenic nanoparticles; performing nondestructive monitoring of accumulation and consumption of reserve substances (e.g., biopolyesters accumulated in the form of intracellular granules by many microorganisms as a carbon-and-energy store) and changes in their properties as a response to stresses. Such data are necessary for optimising their biosynthesis which is of importance both for microbial survival and for obtaining biodegradable biopolymers as eco-friendly substitutes for traditional plastics. This work was supported in part by The Russian Foundation for Basic Research (Grant # 17-08-01696-a).

Полиморфизм и эволюция ризобий козлятника

Карасев Е.С.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: evgenii1991.karasev@gmail.com

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*, которые образуют функционально полноценные клубеньки только на корнях одного из видов, в то время, как при перекрёстной инокуляции клубеньки не имеют азотфиксирующей активности. Эта особенность позволяет предположить, что данные биотипы находятся на ранних этапах дивергенции, когда утрата способности к симбиотическому взаимодействию с хозяином происходит лишь частично. У клубеньковых бактерий за образование клубеньков и за симбиотическую азотфиксацию отвечают 2 группы генов: *nod*-гены и *nif/fix*-гены. Ранее, на основании анализа нуклеотидного полиморфизма, было показано, что эти группы генов имеют различную эволюционную историю. Уровень полиморфизма в этих группах генов может указывать на степень дивергенции их функций. На основании полногеномного секвенирования группы штаммов из северокавказской популяции мы провели сравнительный анализ полиморфизма в конкатенатах генов, относящихся к соответствующим группам, а также сравнили данные с группой хромосомных генов, не относящихся к симбиотическим. В полученных данных прослеживается следующая тенденция: наибольшая дивергенция биотипов наблюдается по генам фиксации азота (*nif/fix*), тогда как по *nod*-генам различия минимальные. Эти данные согласуются с фенотипическими различиями биотипов, выявляемыми при перекрёстной инокуляции, указывая на ключевую роль специфичной азотфиксации в дивергентной эволюции вида *N. galegae*.

Polymorphism and evolution of goatskin's rhizobia

Karasev E.S.

St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

Microsymbionts of goatskin (*Neorhizobium galegae*) are a very interesting and convenient model for studying the evolutionary processes occurring during the initial stages of speciation. In the nature, there are two species of goatskin: *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. According to this, microsymbionts are divided into two biotypes: *N. galegae* bv. *orientalis* and *N. galegae* bv. *officinalis*, which form fully functional nodules only on the roots of one of the species, while there are only non-fixing nodules during cross-inoculation. This fact suggests that these biotypes are in the early stages of divergence, and only the partial loss of symbiotic interaction ability with the host plant occurs. There are two groups of genes, responsible for the nodule formation and for symbiotic nitrogen fixation in rhizobia: *nod*-genes and *nif / fix*-genes. During the nucleotide polymorphism analysis, it was earlier shown that these gene groups have a different evolutionary history. The polymorphism level in these gene groups may indicate the degree of divergence of their functions. We performed a comparative analysis of the polymorphism in the gene concatenants according to the corresponding groups, based on the full genomic sequencing of a group of strains from the North Caucasian population. We also compared the data with a group of chromosomal genes that are non-symbiotic. The following trend is observed in the obtained data: the greatest divergence of biotypes is observed in the nitrogen fixation genes (*nif / fix*), whereas in the *nod*-genes the differences are minimal. These data are consistent with the phenotypic differences in biotypes found in cross-inoculation, indicating the key role of specific nitrogen fixation in the divergent evolution of *N. galegae*.

Оценка ростстимулирующей способности штаммов ризосферных бактерий в отношении микрорастений картофеля

¹К.Ю. Каргаполова, ¹О.В. Ткаченко, ²Г.Л. Бурьгин, ²Н.В. Евсева

¹Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов, Россия

²Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

E-mail: kinaschchri@gmail.com

Ключевые слова: картофель, ризосферные бактерии, *in vitro*, *ex vitro*. Ризосферные микроорганизмы могут быть использованы для улучшения адаптационной способности и роста стерильных микрорастений, выращенных в культуре *in vitro*. Ранее нами установлено достоверное положительное влияние азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 на рост микрорастений картофеля в культуре *in vitro* и *ex vitro*. Целью данного исследования являлось изучение коллекционных ризосферных бактерий как эффективных ассоциативных симбионтов микрорастений картофеля в культуре *in vitro* и *ex vitro*. Для исследований материалом служили штаммы ризосферных бактерий *Azospirillum brasilense* Sp7, Sp245, S27, SR80, SR88 из коллекции ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>), а также микрорастения картофеля сорта Невский. Микроклоны картофеля сорта Невский высаживали на твердую питательную среду Мурасиге и Скуга без гормонов и инокулировали суспензией бактерий в концентрации 106 кл/мл. Коллекционные штаммы исследовали на способность к стимуляции роста растений, для чего каждые 10 суток культивирования оценивали морфометрические показатели микрорастений. Весь период совместного культивирования продолжался 50 суток (в культуре *in vitro* – 30 суток, *ex vitro* – 20 суток). В качестве основного контроля служили стерильные микрорастения, в качестве положительного контроля – микрорастения, инокулированные штаммом *A. brasilense* Sp245. Установлено, что в условиях *in vitro* бактерии стимулировали рост длины побегов микрорастений: *A. brasilense* Sp245 на 8,74%, Sp7 на 11,3%, S27 на 21,2%, SR80 на 11,9%, SR88 на 24,1%. Только один штамм SR88 стимулировал рост корня в длину на 17% и увеличение количества корней на 10%. В условиях *ex vitro* установлено достоверное отличие опытных вариантов от контроля. Повышали длину побега растений два штамма SR80 на 11,2% и SR88 на 11,7%. Штамм SR80 кроме того стимулировал увеличение количества листьев на 8,42%. Контрольный штамм Sp245 стимулировал повышение площади листовой поверхности на 17,3%, тогда как штаммы SR80 и SR88 соответственно на 71,6% и 45,6%. Таким образом, для повышения эффективности метода микроклонального размножения картофеля могут успешно использоваться коллекционные штаммы ризосферных азотфиксирующих бактерий *A. brasilense*. Полученные результаты могут быть использованы в системе семеноводства картофеля на оздоровленной основе.

Assessment of growth-stimulating ability of strains of rhizosphere microorganisms concerning potatoes microplants

¹Kargapolova K. Yu., ¹Tkachenko O. V., ²Burygin G. L., ²Evseva N. V.

¹N. I. Vavilov Saratov State Agrarian University, Saratov, Russia

²Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Federal Agency of Scientific Organizations, Saratov, Russia

Keywords: potatoes, rhizosphere bacteria, *in vitro*, *ex vitro*. Rhizosphere microorganisms can be used to improve the adaptive ability and the growth of the sterile microplants which are grown up in the culture of *in vitro*. Earlier we could establish a reliable positive influence of nitrogen-fixing bacteria of *Azospirillum brasilense* Sp245 on the growth of microplants of potatoes in the culture of *in vitro* and *ex vitro*. The purpose of this research was to study the collection of rhizosphere microorganisms as efficient associative symbiotes of microplants of potatoes in the condition of *in vitro* and *ex vitro*. The strains of the rhizosphere bacteria of *Azospirillum brasilense* Sp7, Sp245, S27, SR80, SR88 of the IBPPM RAS collection as well as microplants of Nevskij's potatoes served as a researching (<http://collection.ibppm.ru>) material. The Nevskij's potatoes microclones without any hormones were planted into a solid nutrient medium and inoculated by suspensions of bacteria in concentration of 106 c/ml. The collection strains were investigated on the subject of the growth-stimulating ability of plants by estimating the morphometric indexes of microplants every 10 days of cultivation. The entire period of collateral cultivation proceeded 50 days (in the culture *in vitro* – 30 days, *ex vitro* – 20 days). The main monitoring was served by sterile microplants, as positive monitoring – a microplant, inoculate the strain of *A. brasilense* Sp245. It has been established that bacteria being in *in vitro* conditions stimulated the growth of microplants shoots' length. *A. brasilense* Sp245 for 8,74%, Sp7 for 11,3%, S27 for 21,2%, SR80 for 11,9%, SR88 for 24,1%. Already one strain of SR88 stimulated root growth in length by 17% and the increase in the number of roots by 10%. A reliable difference has been established in *ex vitro* conditions between experimental variants and those one of control. Two strains of SR80 increased the length of roots by 11,2% and of SR88 by 11,7%. Besides that the strain of SR80 stimulated the increasing number of leaves by 8,42%. The control strain of Sp245 stimulated increase of the sheet surface's area by 17,3% while the strains of SR80 and SR88 by 71,6% and by 45,6% accordingly. Thus, to increase the effectiveness of the method of microclonal propagation of potatoes, the collective strains of rhizospheric nitrogen-fixing bacteria of *A. brasilense* can be successfully used. The obtained results can be used in the system of potatoe -seed farming of on a healthy basis.

Использование специфики физиолого-биохимических свойств штаммов *Rhizobium galegae* при разработке микробных препаратов

Картыжова Л.Е.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

E-mail: Liliya_Kartyzhova@mail.ru

При разработке микробных препаратов для растениеводства учитываются основные физиолого-биохимические свойства штаммов микроорганизмов, обеспечивающие повышение урожайности перспективной сельскохозяйственной культуры, качество получаемой продукции. Продуктивное возделывание нетрадиционной для Беларуси высокобелковой бобовой культуры *Galega orientalis* Lam обусловлено использованием микробных препаратов на основе штаммов клубеньковых бактерий *Rhizobium galegae*. Физиолого-биохимические свойства отобранных штаммов *Rhizobium galegae* определяли спектр использования разрабатываемых на их основе микробных препаратов. Наличие конкурентной способности (сапрофитная, ризосферная, нодулирующая) и симбиотической активности у отобранных штаммов клубеньковых бактерий *Rhizobium galegae* 1, *Rhizobium galegae* 5, *Rhizobium galegae* 8 явились основанием для разработки спектра микробных препаратов с целью максимально эффективного использования при возделывании галеги восточной. Установлено, что штамм *R. galegae* 1 обладает высокой ризосферной конкурентной способностью (73%), что обеспечивает ему хорошую подвижность и размножение в почве, адсорбцию на корнях растения – хозяина, а также колонизацию его корней и выживаемость в полевых условиях. На его основе разработан микробный препарат Ризофос марки «Галега». Штамм *R. galegae* 5 имеет высокие показатели сапрофитной, ризосферной, нодулирующей конкурентной способности, что обеспечивает ему большую приспособленность при интродукции в экосистему с различными почвенно-экологическими условиями, способен усваивать С, N, P и обладает устойчивостью к экстремальным условиям среды (t₀, pH, влажности, наличию пестицидов в почве). Получен патент на использование данного штамма в экстремальных условиях (пат.13575 Респ. Беларусь, МПК (2009) С 12N 1/20. С 05 F 11/00). Наличие высокой ризосферной конкурентной способности у штамма *R. galegae* 8, составляющей 70%, обеспечивает ему высокую подвижность в почве, скорость размножения в ризосфере бобового растения. Высокая адсорбирующая способность клеток штамма *R. galegae* 8 на поверхности корня растения – хозяина и скорость их проникновения в корень обеспечивает ему лучшую совместимость с генотипом растения-хозяина, что было использовано при разработке микробного препарата Вогал, успешно применяемого в почвенно-климатических условиях Беларуси при возделывании местных сортов галеги восточной.

Elaboration of microbial preparations based on physiological- biochemical characteristics of *Rhizobium galegae* strains

Kartyzhova L.E.

Institute of Microbiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus

Researchers developing microbial products for plant cultivation take into account major physiological-biochemical properties of microbial strains providing for increased productivity of promising agricultural crops and upgraded quality of farm products. The efficient cultivation in Belarus of non – traditional highly proteinaceous legume crop *Galega orientalis* Lam. is promoted by introduction of microbial preparations based on strains of nodulating bacteria *Rhizobium galegae*. Physiological-biochemical properties of selected *Rhizobium galegae* strains determined application range of derived microbial products. The presence of competitive capacity (saprophytic, rhizospheric, nodulating) and symbiotic activity in selected nitrogen – fixing bacterial strains *Rhizobium galegae* 1, *Rhizobium galegae* 5, *Rhizobium galegae* 8 laid the groundwork for design of a whole spectrum of biopreparations in order to maximize their symbiotic efficiency for tillage of *Galega orientalis* Lam. It was found that strain *R. galegae* 1 possessed high rhizospheric competitive ability (73%), ensuring its good mobility and soil propagation, adsorption on roots of plant hosts and their further colonization, enhanced survival in field experiments. The strain originated microbial preparation Rhizophos, brand Galega. Strain *R.galegae* 5 also displayed elevated parameters of saprophytic, rhizospheric, nodulating competitive activities, securing its increased adaptability upon introduction into ecosystems with different soil-ecological conditions, capability to assimilate C, N, P and resistance to extreme environmental factors (temperature, pH, humidity, pesticide excess in soil). The method of using this strain under extreme conditions was patented in 2009 (Patent № 13575, Republic of Belarus, Int cl. C 12N1/20, C 05 F 11/00). The available hypercompetitive ability of strain *R.galegae* 8 constituting approximately 70% provides for high soil mobility and proliferation rate in rhizosphere of legume crop. Elevated adsorbing potential of *R.galegae* 8 cells on root surface of plant host and their fast penetration inside the radix contributed to better compatibility with host genome – the trait indispensable for further design of microbial preparation Vogal successfully employed for cultivation of local *Galega orientalis* varieties under soil-climatic conditions of Belarus.

Изучение арбускулярной микоризы бобовых культур и эффективность ее применения в лабораторных условиях модельных опытов

Картыжова Л.Е., Алещенкова З.М.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

E-mail: Liliya_Kartyzhova@mail.ru

Процессы образования клубеньков и грибных арбускул контролируются перекрывающимися генами растений. Отсюда и тесная взаимосвязь между микоризой и клубеньковыми бактериями. Арбускулярная микориза (АМГ) играет огромную роль в выживании и развитии растений в неблагоприятных условиях окружающей среды. На почвах с пониженным содержанием фосфора применение АМГ способствует повышению продуктивности растений, так как поступление фосфора из почвы в растение за счет микоризы осуществляется быстрее. Активное развитие структур АМГ в корневой системе, особенно гиф, способствует увеличению площади поглощения. В результате формируется мощная корневая система у растений, что и обеспечивает их продуктивность. Изучение арбускулярной микоризы бобовых культур и эффективность ее применения явилось целью исследований. В качестве растительных объектов исследований были использованы соя сорта «Ясельда» и галега восточная сорта «Нестерка». Модельные опыты по изучению влияния моно и бинарной инокуляции АМГ (корневая, почвенно-корневая) в сочетании с клубеньковыми бактериями проводили в микроvegetационных сосудах. В результате проведенных экспериментов установлен ростстимулирующий эффект в отношении роста и развития сои, обусловленный применением корневого инокулюма. Максимальное развитие всех структур АМГ происходит в фазу «созревания» сои, которое превышает на 166% интенсивность ее размножения в фазу «бутионизация-цветения». В варианте с бинарной инокуляцией на этой стадии роста и развития сои особенно интенсивно формируются структуры размножения: везикулы и мицелий. Максимальный выход зеленой массы надземной части растений сои, отмечен в вариантах с применением корневого инокулюма, тогда как на формирование бобов, выполненность семян более значимое влияние оказал почвенно-корневой инокулюм. Установлено, что на рост и развитие галеги восточной, в модельной системе, положительно влияет, как моноинокуляция АМГ (почвенно - корневой инокулюм), так и инокуляция АМГ в сочетании с клубеньковыми бактериями: сырой вес фитомассы возрастает на 380% по сравнению с контролем, сухой – на 194%. В варианте с бинарной инокуляцией получена дополнительная прибавка зеленой массы галеги восточной, которая по сырому и сухому весу превышала моноинокуляцию (АМГ) на 100 и 61% соответственно. Стимуляция роста растений в высоту и количества формирующихся ветвей на 60 сутки вегетации обусловлена применением почвенно-корневого инокулюма АМГ совместно с *Rhizobium*.

Investigation of arbuscular mycorrhiza of leguminous crops and efficiency of its application in laboratory model experiments

Kartyzhova L.E., Aleschenkova Z.M.

Institute of Microbiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus

The processes of nodulation and formation of fungal arbuscles are governed by overlapping plant genes. It appears natural therefore that close relationship exists between mycorrhiza and nodulating bacteria. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) play an enormous role in survival and development of plant species under adverse environmental conditions. AMF stimulate phytoproductivity on phosphorus-depleted soils because mycorrhiza intensifies P supply from soil to plant. Active development of fungal structures, especially hyphae, in the root system promotes expanded nutrient uptake area. As a result extensive plant rhizosphere is generated to ensure increased productivity. Aim of this research was to study arbuscular mycorrhiza of legume cultivars and analyze its efficiency. Soybean of variety Yaselda and Galega orientalis of variety Nesterka were chosen as vegetative objects of studies. Model experiments to assess the effect of mono AMF inoculation (root, soil-root) and binary (coupled to the impact of nodulating bacteria) were conducted in microvegetation vessels. The performed experiments have revealed growth – stimulating action on soybean seedlings caused by root inoculum. Maximum development of AMF structure occurred in soybean maturation phase, exceeding by 166% propagation rate during budding and blossoming stages. Binary inoculation tests demonstrated at these stages rapid generation of reproduction elements: vesicles and mycelium. The highest green mass yield of soybean overground vegetative part was recorded in variants with root inoculum, whereas shaping of beans and seed maturation were largely influenced by soil – root inoculum. It was found that growth and development of Galega orientalis in model system was favored both by AMF monoinoculation (soil-root inoculum) and binary treatment with AMF and nodulating bacteria. As a result crude phytomass increased by 380%, dry weight by 194% in comparison with the control. In experiment with binary inoculation additional yield of Galega orientalis green mass surpassed AMF monoinoculation harvest in crude and dry weight by 100% and 61%, respectively. Stem growth and branching rate upon 60 days of vegetation period were stepped up by joint action of soil-root AMF inoculum and *Rhizobium* culture.

Генетический анализ ризобий из трёх популяций реликтового бобового растения *Vavilovia formosa*

¹Кимеклис А.К., ¹Кузнецова И.Г., ¹Сазанова А.Л., ¹Сафронова В.И., ¹Белимов А.А., ¹Онищук О.П., ¹Курчак О.Н.,
¹Гладков Г.В., ¹Аксёнова Т.С., ¹Пинаев А.Г., ^{1,2,3}Андронов Е.Е., ¹Проворов Н.А.

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

²Почвенный институт имени В. В. Докучаева Российской академии наук, Москва, Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра Генетики и Биотехнологии, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: kimeklis@gmail.com

Вавиловия прекрасная (*Vavilovia formosa* (Stev.) An. Fed) – эволюционный реликт из трибы бобовых растений Fabae, произрастающий в высотных регионах Больших Кавказских гор и Переднеазиатских нагорий. В силу своей труднодоступности является очень малоизученным растением с неохарактеризованными ризобиальными симбионтами. Тем не менее, с эволюционной точки зрения, бобово-ризобиальный симбиоз вавиловии и почвенных бактерий, как изолированная от современного культивирования бобовых система, должен обладать уникальными признаками, отличными от изученных моделей формирования симбиоза в трибе Fabae. Эти признаки мы находим при изучении выборки из 20 штаммов ризобий, выделенных из клубеньков вавиловии, отобранных из трёх удалённых популяций – в Северной Осетии, Дагестане и Армении. Анализ нуклеотидных последовательностей коровых компонентов геномов этих штаммов показал, что они принадлежат виду *Rhizobium leguminosarum*, когда как филогенетический анализ симбиотических генов позволяет их выделить в отдельную группу внутри биовара viciae. В дополнении к этому, все штаммы *R. leguminosarum*, выделенные из вавиловии, оказались носителями гена nodX, который является необходимым критерием для нодулирования группы горохов *P. sativum* cv. Afghanistan. При этом микровегетационный тест показал, что выделенные симбионты не образуют эффективного симбиоза с афганским горохом, но одновременно с этим сама вавиловия образует эффективный симбиоз только с ризобиями-носителями nodX. Анализ строения симбиотического региона представительных симбионтов вавиловии и штаммов биовара viciae показал, что ризобии вавиловии обладают гораздо менее компактным симбиотическим регионом, чем ризобии других растений трибы Fabae, что можно отнести к архаичным признакам, т.к. компактизация генома – естественный эволюционный процесс, повышающий мобильность элементов генома. Эти свойства симбионтов вавиловии позволяют отнести их к отдельному симбиотипу vaviloviae внутри вида *Rhizobium leguminosarum*. Данное исследование поддержано грантом РФФИ 18-316-00124.

Genetic analysis of rhizobia from three populations of the relic legume *Vavilovia formosa*

¹Kimeklis A.K., ¹Kuznetsova I.G., ¹Sazanova A.L., ¹Safronova V.I., ¹Belimov A.A., ¹Onishchuk O.P., ¹Kurchak O.N., ¹Gladkov G.V., ¹Aksenova T.S., ¹Pinaev A.G., ^{1,2,3}Andronov E.E., ¹Provorov N.A.

¹All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia

²V.V. Dokuchaev Soil Science Institute of Russian Academy of Science, Moscow, Russia

³Saint-Petersburg State University, department of Genetics and Biotechnology, St. Petersburg, Russia

Beautiful vavilovia (*Vavilovia formosa* (Stev.) An. Fed) is an evolutionary relic from the legume tribe Fabae, growing in the high mountain regions of the Greater Caucasus Mountains and the Western Asian Plateau. Due to its inaccessibility, it is a poorly studied plant with uncharacterized rhizobial symbionts. Nevertheless, from the evolutionary point of view, the legume-rhizobia symbiosis of vavilovia and soil bacteria is isolated from the modern system of the legume cultivation, thus it must have unique features that differ from the studied models of symbiosis in the tribe Fabae. We find these signs in the study of 20 rhizobia strains isolated from nodules of vavilovia, collected from three distant populations - in North Ossetia, Dagestan and Armenia. The analysis of the nucleotide sequences of the core components of these strains genomes showed that they belong to the species *Rhizobium leguminosarum*, while phylogenetic analysis of symbiotic genes showed that they can be separated into a distinct group within the biovar viciae. In addition to this, all *R. leguminosarum* strains, isolated from vavilovia, were carriers of the nodX gene, which is a necessary criterion for nodulating a group of peas *P. sativum* cv. Afghanistan. At the same time, the tube test showed that the isolated symbionts do not form an effective symbiosis with the Afghan peas, but at the same time, vavilovia itself forms an effective symbiosis only with the rhizobia carrying nodX. Comparative analysis of the structure of the symbiotic region of representative vavilovia symbionts and strains of the biovar viciae showed that the rhizobia of vavilovia have a much less compact symbiotic region than the rhizobia of other plants of the tribe Fabae, which can be attributed to archaic features, because compaction of the genome is a natural evolutionary process that increases the mobility of the elements of the genome. These properties of vavilovia symbionts allow to attribute them to a separate symbiovar vaviloviae inside the species *Rhizobium leguminosarum*. This study is supported by RFBR grant 18-316-00124.

Изучение влияния биологически активных компонентов *Solanum nigrum* L. на микроорганизмы

Клепикова А.В., Стеценко Д.С., Астафьева О.В.

ФГБУ ВО «Астраханский государственный университет», Астрахань, Россия

E-mail: anastasklepkovich@mail.ru

В природных условиях высшие растения и микроорганизмы тесно взаимосвязаны, между ними существуют различные формы взаимоотношений и взаимного влияния. Изучение взаимоотношений растений с микроорганизмами является актуальным направлением, так как полученные знания могут быть применены в сельском хозяйстве и в других областях. Целью данного исследования являлось изучение влияния экстрактов паслена черного на микроорганизмы. Объектом исследования был выбран паслен черный (*Solanum nigrum* L.). Это растение широко распространено в Европе, Азии, Северной Америке. Растет на сорных местах, полях, в огородах, садах, по берегам водоемов и рек. Были приготовлены водные и 70% спиртовые вытяжки из корня, стебля и листьев. Экстракты вводили в питательную среду методом диффузии с использованием лунок. Все экстракты продемонстрировали противомикробный эффект. Диаметр зоны задержки роста сильно варьировал в зависимости от активности выделенных биологически активных веществ, их концентрации и от части растения, из которого они были извлечены, так же от исследуемых тест-микроорганизмов. Наиболее выраженной противомикробной активностью обладали водные экстракты стебля и корня *S. nigrum*, спиртовой экстракт из стебля действовал слабее. Экстракты листьев показали невысокую ингибирующую активность. Самым слабым противомикробным эффектом обладал спиртовой экстракт корня. Полученные результаты говорят о том, что паслен черный содержит биологически активные вещества, обладающие противомикробным действием. Эти вещества могут защищать растения от патогенных микроорганизмов. Необходимо изучение химического состава экстрактов с целью определения соединений, обуславливающих противомикробный эффект.

The study of the effect of biologically active components of *Solanum nigrum* L. on microorganisms

Klepikova A.V., Stetsenko D.S., Astafjeva O.V

FGBU VO "Astrakhan State University", Astrakhan, Russia

In natural conditions, higher plants and microorganisms are closely interrelated and there are various forms of mutual relations and mutual influence between them. The study of plants relationship with microorganisms is a topical question because the knowledge gained from this can be applied in agriculture and other areas. The aim of this research is to study the effect of *S. nigrum* extracts on microorganisms. We chose Black nightshade (*Solanum nigrum* L.) as the object of this study. This plant is widely spread in Europe, Asia, and North America. It grows on weedy places, fields, gardens, along the banks of reservoirs and rivers. We prepared water and 70% alcohol extracts from the root, stem and leaves. We tested the antibacterial activity by means of agar diffusion test. All extracts demonstrated an antimicrobial activity. The diameter of zone inhibition varied greatly depending on the activity of the isolated biologically active substances, on their concentration and on the part of the plant, they were extracted from, as well as on the researched test-microorganisms. The water extracts from the stalk and root of *S. nigrum* possessed the most evident antimicrobial activity, the alcoholic extract from the stem was weaker. Leaves extracts showed low inhibitory activity. The alcoholic root extract possessed the weakest antimicrobial activity. The results suggest that *S. nigrum* contains biologically active substances with an antimicrobial activity. These substances can protect plants from pathogenic microorganisms. It is necessary to study the extracts chemical composition in order to determine the compounds responsible for the antimicrobial activity.

Оценка влияния биопрепаратов на урожай винограда Мускат белый

Клименко Н. Н.

ФГБУН "Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма", Симферополь, Россия

E-mail: ninaklymenko@yandex.ru

Современное промышленное производство винограда является перспективной отраслью сельского хозяйства на Юге России и в Крыму. Однако антропогенное воздействие, оказываемое интенсивной агротехнологией на ампелоценоз, отрицательно сказывается на его состоянии. Отмечается снижение показателей почвенного плодородия и нарушение водно-физических свойств почвы. Однако для нивелирования или устранения негативных последствий интенсификации производства необходимо внедрять новые биологизированные способы ведения ампелоценоза. К ним относятся применение биопрепаратов для улучшения минерального питания растений и задернение почвы междурядий многолетними травами для сохранения влаги и улучшения структуры почвы. Нами были проведены исследования влияния микробных препаратов и задернения междурядий многолетними травами на урожай винограда Мускат белый. Было отмечено, что применение микробных препаратов на винограднике способствовало увеличению численности бактерий эколого-трофических групп микроорганизмов, участвующих в трансформации труднодоступных для растений соединений азота и фосфора в почве в 1,5-2 раза. При этом содержание нитратного азота и подвижного фосфора в ризосфере повышалось вследствие активизации почвенной микрофлоры. Вышеуказанные показатели имеют тесную корреляционную связь с урожаем винограда Мускат белый, который повышался под действием Диазофита и комплекса микробных препаратов (КМП) на 11-17%.

Assessment of the influence of biopreparations on the yield of grapes Muscat white

Klimenko N. N.

FSBIS 'Research institute of Agriculture of the Crimea', Simferopol, Russia

Modern industrial production of grapes is a perspective branch of agriculture in the South of Russia and in the Crimea. However, the anthropogenic impact exerted by intensive agrotechnology on ampelocenosis negatively affects its condition. A decrease in the indices of soil fertility and a violation of the water-physical properties of the soil are noted. However, in order to level or eliminate the negative consequences of intensification of production, it is necessary to introduce new biologic methods of ampelocenosis management. These include the use of biopreparations to improve the mineral nutrition of plants and grassing the soil of inter rows by perennial grasses to preserve moisture and improve soil structure. We conducted studies of the effect of microbial preparations and the grassing by perennial grasses on the Muscat white grapes yield. It was noted that the use of microbial preparations in the vineyard contributed to an increase in the number of bacteria in the ecological and trophic groups of microorganisms involved in the transformation of compounds of nitrogen and phosphorus that are difficult to reach in plants in the soil by a factor of 1.5-2. The content of nitrate nitrogen and mobile phosphorus in the rhizosphere increased due to the activation of soil microbiota. The above indices have a close correlation with the Muscat white grape yield, which was increased by 11-17% under the influence of Diazofit and CMP – complex of microbial preparations.

Эффективные растительно-микробные взаимодействия декоративных растений и ризосферных бактерий

Клименко О.Е., Клименко Н.И.

Никитский ботанический сад, Ялта, Россия

E-mail: olga.gnbs@mail.ru

Проблемой современного питомниководства является снижение качества посадочного материала, которое связано со снижением плодородия почв питомников, загрязнением окружающей среды, изменением климата. Для преодоления этих неблагоприятных явлений применяются различные приемы и способы повышения плодородия почв, а также устойчивости и адаптивности растений к неблагоприятным условиям среды. К ним относятся различные регуляторы роста, как естественные, так и искусственно полученные, биологически активные вещества, макро- и микроудобрения, севообороты. Одним из путей повышения эффективности выращивания саженцев при условии сохранения окружающей среды и повышения плодородия почвы является применение микробных препаратов (МП), созданных на базе эффективных штаммов ризосферных бактерий. Однако в декоративном питомниководстве они практически не используются. В связи с этим были проведены многолетние эксперименты в полевых мелкоделяночных опытах по созданию эффективных растительно-микробных ассоциаций в ризосфере саженцев декоративных растений в декоративном питомнике лаборатории степного садоводства Никитского ботанического сада. Для опытов использовали следующие МП: азотобактерин (АБ), созданный на базе активного штамма *Azotobacter chroococcum* 10702 и обладающий азотфиксирующими свойствами; фосфоэнтерин (ФЭ) – на основе штамма *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, трансформирующий труднодоступные фосфаты в доступное растениям состояние и Комплекс микробных препаратов (КМП), оказывающий комплексное влияние на растение и состоящий из смеси в равных долях трех препаратов: diazofита (*Agrobacterium radiobacter* 204) азотфиксатора, ФЭ и биополицида, созданного на основе штамма антагониста патогенных микромицетов *Paenibacillus polymyxa* П. Из декоративных растений в опыт были включены *Prunus pissardii* Carr., *Wisteria sinensis* (Sims) Sweet, *Spiraea cantoniensis* Lour. и *Spiraea x vanhouttei* (Briot) Zab. Показано положительное влияние применения МП на ризогенез, рост и выход стандартного посадочного указанных высокодекоративных деревьев, кустарников и лиан в открытом грунте. Установлено улучшение агрохимических свойств почвы и минерального питания саженцев под действием МП, а также специфичность видов декоративных растений к ассоциации с интродуцированными бактериями. Наиболее эффективными для большинства культур были взаимодействия в ризосфере с биоагентами азотобактерина и комплекса микробных препаратов.

Effective plant-microbial interactions of ornamental plants and rhizosphere bacteria

Klimenko O.E., Klimenko N.I.

Nikitsky Botanical Gardens, Yalta, Russia

The problem of modern nursery farming is a decrease in the quality of planting material, which is associated with a decrease in the fertility of nursery soils, environmental pollution, and climate change. To overcome these adverse phenomena, various methods and technics are used to increase soil fertility, as well as the stability and adaptability of plants to unfavorable environmental conditions. These include various growth regulators, both natural and artificially obtained, biologically active substances, macro- and microfertilizers, crop rotations. One of the ways to increase the efficiency of growing seedlings, provided that the environment is preserved and soil fertility is increased, is the use of microbial preparations (MP), created on the basis of effective strains of rhizosphere bacteria. However, in decorative nursery, they are practically not used. In this connection, long-term experiments in field small-scale were conducted to create effective plant-microbial associations in the rhizosphere of ornamental plants seedlings in the ornamental nursery of the steppe gardening laboratory of the Nikitsky Botanical Gardens. The following MPs were used for the experiments: Azotobacterin (AB), created on the basis of the active strain *Azotobacter chroococcum* 10702 and possessing nitrogen-fixing properties; phosphoenterin (PE) – based on the *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 strain, transforming difficult-to-reach phosphates into a state accessible to plants and a complex of microbial preparations (CMP), which has a complex effect on the plant and consists of a mixture in equal proportions of three preparations: diazophyte (*Agrobacterium radiobacter* 204) nitrogen fixator, PE and a biopolytsid based on the antagonist strain of pathogenic micromycetes *Paenibacillus polymyxa* P. Some ornamental plants were included in the experiment: *Prunus pissardii* Carr., *Wisteria sinensis* (Sims) Sweet, *Spiraea cantoniensis* Lour and *Spiraea x vanhouttei* (Briot) Zab. The positive effect of MP application on rhizogenesis, growth and output of the standard planting of these highly decorative trees, bushes and lianas in the open ground is shown. Improving of soil agrochemical properties and mineral nutrition of seedlings under the influence of MP, as well as the specificity of the species of ornamental plants to associate with the introduced bacteria are established. The most effective for the cultures were interactions in the rhizosphere with Azotobacterin and a complex of microbial preparations bioagents.

Устойчивость и накопление кадмия различными экотипами гипераккумулятора *Noccaea caerulescens* и исключателем из рода *Thlaspi*

Кожевникова А.Д., Жуковская Н.В., Серегин И.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева
РАН, Москва, Россия

E-mail: nataliazhukovskaya@mail.ru

Основной задачей данной работы являлся сравнительный анализ устойчивости к кадмию (Cd) и способности к его накоплению гипераккумулятором *Noccaea caerulescens* F.K. Mey и исключателем *Thlaspi arvense* L. Пять экотипов *N. caerulescens* (La Calamine (LC), Saint Félix de Pallières (SF), Col du Mas de l'Aire (CMA), Ganges (GA) с металлоносных почв и Lellingen (LE) с неметаллоносных почв) выращивали на растворе Хогланда в течение 8 недель в присутствии 1, 5, 25 и 50 мкМ нитрата кадмия, а *T. arvense* – в присутствии 0.1, 0.2, 1.0 и 5.0 мкМ нитрата кадмия. Токсическое действие Cd оценивали по изменению сухой массы корней и побегов. Содержание Cd в корнях и побегах определяли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии и оценивали в мг/кг сухой массы растительного материала и в расчете на корневую систему или побег одного растения. Устойчивость *N. caerulescens* к Cd была выше, чем у *T. arvense*, и у разных экотипов *N. caerulescens* возрастала в ряду GA < CMA < LE < SF ≈ LC. Способность к накоплению Cd в корнях у экотипов *N. caerulescens* возрастала в ряду LC < LE ≈ GA < CMA ≈ SF, в побегах – в ряду LC < LE ≈ GA < SF < CMA. Снижение накопления биомассы корней у гипераккумулятора *N. caerulescens* начиналось при более низком содержании в них Cd по сравнению с побегами, в то время как у исключателя *T. arvense* прослеживалась обратная закономерность. Таким образом, экотипы гипераккумулятора *N. caerulescens*, обладая более высокой устойчивостью к Cd по сравнению с исключателем *T. arvense*, существенно отличались между собой не только по способности накапливать тяжелые металлы, но и по устойчивости к ним. Экотип LC с каламиновых почв накапливал меньше Cd и не исключено, что именно поэтому был более устойчив, чем другие экотипы. Экотип SF, также произрастающий на каламиновых почвах, отличался не только высокой устойчивостью к Cd, но и наибольшим его накоплением, что, вероятно, связано с более эффективными механизмами детоксикации Cd. Полученные результаты свидетельствуют о существовании различий в механизмах и причинах устойчивости к Cd у разных экотипов гипераккумулятора *N. caerulescens*, изучение которых является важным направлением будущих исследований.

Cadmium Tolerance and Accumulation in Various Accessions of Hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* and Excluder of the genus *Thlaspi*

Kozhevnikova A.D., Zhukovskaya N.V., Seregin I.V.

Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Cadmium (Cd) accumulation and tolerance were analyzed in hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* F.K. Mey and excluder *Thlaspi arvense* L. Five accessions of *N. caerulescens* (La Calamine (LC), Saint Félix de Pallières (SF), Col du Mas de l'Aire (CMA), Ganges (GA) from metalliferous soils and Lellingen (LE) from nonmetalliferous soils) were grown in Hoagland solution for 8 weeks in the presence of 1, 5, 25, and 50 μM cadmium nitrate and *T. arvense* in the presence of 0.1, 0.2, 1.0, and 5.0 μM cadmium nitrate. The toxic effect of Cd was assessed by changes in root and shoot dry weight. The content of Cd in roots and shoots was determined by atomic absorption spectro-photometry and expressed in mg/kg dry weight of plant material and calculated per plant root system or shoot. The tolerance of *N. caerulescens* to Cd was higher than that of *T. arvense* and increased in various accessions of *N. caerulescens* in the row GA < CMA < LE < SF ≈ LC. The ability to accumulate Cd in roots of *N. caerulescens* accessions increased in the row LC < LE ≈ GA < CMA ≈ SF, while that in shoots were in the row LC < LE ≈ GA < SF < CMA. Reduction in accumulation of root biomass of hyperaccumulator *N. caerulescens* started at lower Cd content in them compared with that in shoots, while an opposite pattern was observed for excluder *T. arvense*. Thus, accessions of hyperaccumulator *N. caerulescens*, having a higher tolerance to Cd compared with excluder *T. arvense*, differed significantly from each other not only in their capacity to accumulate heavy metals but also in tolerance to them. LC accession from calamine soils accumulated less Cd and, possibly, this was the reason why it was more tolerant than the other accessions. SF accession, also growing on calamine soils, was characterized both by high Cd tolerance and accumulation, which is probably due to more efficient mechanisms of Cd detoxification. The results obtained suggest that there are differences in the mechanisms and causes of tolerance to Cd in various accessions of hyperaccumulator *N. caerulescens*, the study of which is an important area of future research.

Использование трёхкомпонентной бактериальной ассоциации при выращивании лядвенца рогатого

Ковина А.Л., Домрачева Л.И., Трефилова Л.В., Товстик Е.В.
Вятская государственная сельскохозяйственная академия, Киров, Россия
E-mail: nm-flora@rambler.ru

Впервые практическое использование микроорганизмов в сельском хозяйстве было связано с применением бактерий рода *Rhizobium* для обработки семян бобовых еще в конце 19 века. С тех пор искусственно созданные растительно-микробные симбиозы с различным сочетанием партнеров используются для повышения урожая сельскохозяйственных культур и улучшения его качества. К настоящему времени сложилось убеждение в предпочтительности мультивидовых микробных ассоциаций при создании биопрепаратов. В частности, кроме монокультуральной предпосевной обработки семян бобовых практикуют инокуляцию семян бинарными и тройными консорциумами микроорганизмов. С этой целью желательны партнерами ризобиев выбирать микробы, выделяющие много слизи, которая обеспечивает прилипание биопрепарата к семенам и в которой клубеньковые бактерии не только могут выживать в почве, но и размножаться перед внедрением в корень. Другим важным свойством мультивидовых ассоциаций является способность к детоксикации вредных веществ, находящихся в почве, и обезвреживанию фитопатогенов. Подобными природными качествами обладают многие виды почвенных цианобактерий и актиномицетов. В опытах с лядвенцем рогатым (*Lotus corniculatus* L.) сорта Солнышко впервые была проведена предпосевная обработка семян моно-, бинарными и тройными ассоциациями микроорганизмов: *Rhizobium loti*; цианобактерией *Fischerella muscicola* 300; актиномицетом *Streptomyces hygroscopicus*; *F. muscicola* + *S. hygroscopicus*; *Rh. loti* + *F. muscicola*; *Rh. loti* + *S. hygroscopicus*; *Rh. loti* + *F. muscicola* + *S. hygroscopicus*.

Результаты проведенных наблюдений показывают, что бактериальная инокуляция семян не сказывается отрицательно на состоянии полезной аборигенной микрофлоры почвы, что всегда следует учитывать при любой интродукции в неё микробных культур. При анализе состояния растений лядвенца в первый год пользования выявлено, что преимущества бинарной и тройной ассоциаций при инокуляции семян, по сравнению с их обработкой только *Rh. loti*, проявляются в стимуляции роста надземной части и корневой системы, более интенсивном развитии клубеньков на корнях, увеличении количества плодов и роста ксеромассы. При этом все вышеперечисленные максимальные показатели достигнуты в 2-х вариантах: *Rh. loti* + *S. hygroscopicus* и *Rh. loti* + *F. muscicola* + *S. hygroscopicus*.

Use of a three-component bacterial association in the cultivation of *Lotus corniculatus*

Kovina A. L., Domracheva L. I., Trefilova L. V., Tovstik E. V.
Vyatka state agricultural Academy, Kirov, Russia

For the first time the practical use of microorganisms in agriculture was associated with the use of bacteria of the genus *Rhizobium* for the treatment of legume seeds in the late 19th century. Since then, artificially created plant-microbial symbioses with different combinations of partners have been used to increase the yield of crops and improve its quality. To date, there has been a belief in the preferences of multivid microbial associations in the creation of biopreparation products. In particular, in addition monoculturally presowing treatment of seeds of legumes the practice of inoculation of seeds binary and triple consortia of microorganisms. With this purpose, it is desirable rhizobial partners to select the microbes that produce a lot of mucus, which provides adhesion of the biopreparation to the seeds and in which *Rhizobium* not only can survive in the soil, but also to multiply before implementation in the root. Another important property of well-defined, multi associations is the ability to detoxify harmful substances in the soil, and neutralization of pathogens. Many types of soil cyanobacteria and actinomycetes possess similar natural qualities. In experiments with *Lotus corniculatus* L. varieties of Honey was first conducted for the seed treatment with mono-, binary and triple associations of microorganisms: *Rhizobium loti*; the cyanobacterium *Fischerella muscicola* 300; actinomycete *Streptomyces hygroscopicus*; *F. muscicola* + *S. hygroscopicus*; *Rh. loti* + *F. muscicola*; *Rh. loti* + *S. hygroscopicus*; *Rh. loti* + *F. muscicola* + *S. hygroscopicus*. The results of the observations show that bacterial inoculation of seeds does not adversely affect the state of beneficial indigenous microflora of the soil, which should always be taken into account when any introduction of microbial cultures into it. In the analysis of the condition of the plants of *Lotus corniculatus* L. in the first year of use it is revealed that the advantages of binary and triple associations with seed inoculation, in comparison with the processing of only *Rh. loti*, manifested in the stimulation of the growth of the aboveground and root system, more intensive development of nodules on the roots, increasing the number of fruits and the growth of dry mass. In this case, all the above maximum values are reached in 2 versions: *Rh. loti* + *S. hygroscopicus* and *Rh. loti* + *F. muscicola* + *S. hygroscopicus*.

Исследование оптимальных условий культивирования бактерий рода *Bacillus* – продуцентов биопрепаратов для снижения вредоносности экономически значимых болезней плодовых культур

Козицын А.Е., Асатурова А.М.

Всероссийский научно-исследовательский институт Биологической защиты растений, г. Краснодар, Россия

E-mail: KozicinAlexander@gmail.com

Многолетнее и широкомасштабное применение химических фунгицидов в сельскохозяйственной практике является мировой проблемой и несет ряд отрицательных последствий: токсическое загрязнение окружающей среды, снижения плодородия почв, ухудшение качества продуктов питания, оказывающее негативное воздействие на здоровье человека. Одним из путей решения проблемы является переориентация сельского хозяйства на применение экологически безопасных средств защиты растений, в том числе биопрепаратов на основе живых культур микроорганизмов. Одними из наиболее распространенных экономически значимых заболеваний плодовых культур являются парша, мучнистая роса и альтернариоз. Цель данного исследования в том, чтобы разработать элементы технологии производства биопрепарата на основе штаммов бактерий *Bacillus subtilis* BZR 336g и *Bacillus subtilis* BZR 517 для дальнейшего применения их на плодовых культурах против наиболее распространенных экономически значимых заболеваний. Как один из элементов технологии производства в условиях пилотных биореакторов определяли оптимальные условия аэрации для культивирования исследуемых штаммов. Степень аэрации культуры клеток регулировался изменением количества пропускаемого стерильного воздуха через питательную среду в процессе культивирования. Измерялся этот параметр в м³/ч атмосферного воздуха, проходящего через культуру бактерий в емкости биореактора в процессе культивирования клеток лабораторных штаммов. Степень пропускания воздуха через питательную среду поддерживалась на изначально установленных значениях в пределах от 0,2-0,8 м³/ч с шагом 0,2 м³/ч. Степень влияния объема проходящего воздуха в процессе культивирования определялась количеством жизнеспособных клеток в готовой продукции биопрепарата и антифунгальной активностью, оцениваемой методом биоавтограмм по степени биоцидного влияния бактериальной культуры по отношению к тест культурам возбудителей грибных болезней: *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* и *Alternaria* sp. Для обоих исследуемых штаммов оптимальный расход проходящего через культуру воздуха составил 0,6 м³/ч, при этом расходе было зафиксировано как наибольшее количество жизнеспособных клеток, так и наибольшая антифунгальной активностью.

Investigation of the optimal conditions for cultivation of bacteria of the genus *Bacillus* - producers of biopreparations to reduce the severity of economically significant diseases of fruit crops

Kozitsyn A. E., Asaturova A. M.

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

Long-term and large-scale application of chemical fungicides in agricultural practice is a global problem and has a number of negative consequences: toxic pollution of the environment, reduction of soil fertility, deterioration of food quality, negatively affecting human health. One way to solve the problem is to redirect agriculture to use environmentally friendly plant protection products, including biopreparations based on microorganisms living cultures. Some of the most common economically significant diseases of fruit crops are scab, powdery mildew and alternaria. The purpose of this study is to develop the elements of the production technology of biopreparations based on *Bacillus subtilis* BZR 336g and *Bacillus subtilis* BZR 517 strains - producers of biofungicides, for their further use on fruit crops against the most common economically significant diseases. Optimal aeration conditions for the cultivation of the studied strains have been determined as one of the elements of the semi-industrial production technology under the conditions of pilot bioreactors. The degree of aeration of the culture cells was regulated by changing the amount of sterile air passed through the nutrient medium during the cultivation process. This parameter was measured in m³ / h of atmospheric air passing through the culture of bacteria in the bioreactor vessel during the cultivation of cells of laboratory strains. The degree of air transmission through the nutrient medium was maintained at initially set values ranging from 0.2-0.8 m³ / h in increments of 0.2 m³ / h. The degree of influence of the volume of passing air during the cultivation process was determined by the number of viable cells in the finished product of the biological preparation and by fungicidal activity estimated by the bioautologic method according to the degree of biocidal influence of the bacterial culture with respect to the test culture of the fungal diseases pathogenes: *Fusarium oxysporum* and *Alternaria* sp. For the both studied strains, the optimal air flow through the culture was 0.6 m³ / h, with the greatest number of viable cells and the largest antifungal activity recorded at the expense.

Реакция компонентов аденилатциклазной сигнальной системы корней проростков гороха на инфицирование различающимися по эффективности штаммами *Rhizobium leguminosarum* bv.viciae

Кузакова О.В., Ломоватская Л.А., Романенко А.С.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений, Иркутск, Россия

E-mail: titanic87@list.ru

Развитие симбиоза между бобовыми и клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium leguminosarum* (Rlv) во многом зависит от эффективности последних. На всех этапах контакта микро- и макропартнеров происходит модуляция активности сигнальных систем как растений, так и бактерий, что определяет дальнейший эффект симбиоза. Поэтому целью данного исследования являлось выявление особенностей в сорбции различающихся по эффективности штаммов Rlv на корнях проростков гороха и реакции компонентов АСС (трансмембранная аденилатциклаза (тАЦ), растворимая аденилатциклаза (рАЦ), цАМФ) корней. В работе использовали эффективный штамм Rlv 1022, 1064, неэффективный, высококонкурентный и штамм 249б, неэффективный по азотфиксации. Инокуляцию трехсуточных стерильных проростков гороха Rlv проводили в течение 360 мин. Для анализа использовали пять зон корня: 1 - меристема - 2мм; 2- зона без корневых волосков-2-7мм; 3-зона, содержащая зачатки корневых волосков-7-12 мм; 4- зона молодых корневых волосков-12-17 мм; 5-зона сформированных корневых волосков-17-22мм от кончика корня; 6- coleoptile. Наибольшее количество колонийобразующих единиц (КОЕ) эффективного 1022 и неэффективного 1064 штаммов было зафиксировано в 3-5 зонах (120-160 КОЕ), тогда как неэффективного штамма 249 – в 5 зоне (32 КОЕ). Повышенный уровень цАМФ в 1 и 2 зонах корня гороха (130-140 % от контроля), при инфицировании всеми штаммами Rlv на фоне сниженной сорбции, свидетельствует об активной защитной функции этой сигнальной молекулы. Следует отметить высокий уровень цАМФ и в эпикотиле, что свидетельствует о системной активации АСС. При инфицировании штаммом 1022 активность рАЦ в 1-3 зоне превышала контроль (130%), в то время как активность тАЦ оставалась на его уровне. Активность рАЦ и тАЦ в зоне зрелых корневых волосков (3-5 зоны) и эпикотиле существенно снижалась (60-80% от контроля). Иная картина наблюдалась при инфицировании неэффективным штаммом 1064, где активность тАЦ во всех зонах роста корня гороха превышала рАЦ. При инфицировании неэффективным штаммом 249 в 1-5 зонах активность тАЦ и рАЦ несущественно отличалась от контроля (100-120%). Исключение составлял эпикотиль: активность рАЦ превышала контроль на 30%, тАЦ-60%. Таким образом, различные по эффективности штаммы Rlv оказывают различное влияние на степень активации компонентов АСС в клетках корня проростков гороха.

Reaction of the components of the adenylate cyclase signaling system of pea seedlings roots to infecting with differently effective strains of *Rhizobium leguminosarum* bv.viciae

Kuzakova O.V., Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S.

Siberian Institute of plant physiology and biochemistry, Irkutsk, Russia

The development of the symbiotic process between legumes and rhizobium of the genus *Rhizobium leguminosarum* (Rlv) largely depends on the effectiveness of the latter. All the stages of contact between micro- and macropartners are known to be characterized with modulation of the signaling systems activity of both plants and bacteria, which determines the further effect of symbiosis.

Therefore, the purpose of this study was to identify the specific features of the sorption of differing in effectiveness Rlv strains in pea seedlings roots and the reaction of ACS components (transmembrane adenylate cyclase (tAc), soluble adenylate cyclase (sAc), cAMP) of the roots.

An effective strain Rlv 1022, an ineffective and highly competitive 1064, and strain 249b, ineffective in nitrogen fixation, were used in the study.

Inoculation of three-day sterile pea seedling with Rlv was carried out during 360 minutes. Five root zones were used for the analysis: 1 - meristem - 2 mm, 2 - zone without root hairs - 2-7 mm; 3- zone containing the rudiments of the root hairs - 7-12 mm; 4- zone of young root hairs - 12-17 mm; 5- zone of formed root hairs - 17-22mm from the tip of the root; 6 - coleoptile.

The largest number of colony-forming units (CFU) of effective 1022 and ineffective 1064 strains was recorded in 3-5 zones (120-160 CFU), while inefficient strain 249 was recorded in zone 5 (32 CFU). Elevated cAMP levels in 1 and 2 zones of pea roots (130-140% of the control), when infected with all Rlv strains against the background of reduced sorption, speaks for the active protective function of this signal molecule. A high level of cAMP in epicotyl should be noted; it indicates the systemic activation of ACS. When infected with strain 1022, the activity of sAc in the 1-3 zones exceeded the control (130%), while the activity of the tAc remained at its level. The activity of sAc and tAc in the zone of formed root hairs (3-5 zones) and epicotyl significantly decreased (60-80% of the control). Another situation was observed when infected with ineffective 1064 strain, where tAc activity in all the growth zones of pea roots exceeded sAc. When infected with an ineffective strain 249 in 1-5 zones, the activity of tAc and sAc was insignificantly different from control (100-120%). Epicotyl was an exception: the activity of sAc exceeded the control by 30%, tAc-60%.

Thus, differently effective Rlv strains exert a different effect on the degree of activation of ACS components in pea seedlings root cells.

Оценка эффективности интродукции штаммов микроорганизмов родов *Paenibacillus* и *Pseudomonas* в естественную экосистему бобового растения

Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф., Логинов О.Н.

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

E-mail: biolab316@yandex.ru

Одним из наиболее известных примеров сбалансированного фитомикробиома является бобово-ризобияльное сообщество. Клубеньковые бактерии, будучи естественными симбионтами бобовых растений, обеспечивают последних дополнительным азотом. Некоторые штаммы ризобий обладают также другими свойствами PGPB-микроорганизмов: синтез фитогормонов и биоконтроль фитопатогенов. Представляется интересным изучение возможности повышения потенциала экосистемы бобовых растений через интродукцию микроорганизмов с комплексом полезных свойств. Целью настоящей работы являлось изучение влияния ростстимулирующих штаммов бактерий на экосистему бобовое растение – аборигенное микробное сообщество. В эксперименте были использованы штаммы бактерий, обладающие комплексом положительных для растений свойств: способность к фиксации атмосферного азота и фосфора, продукция ростстимулирующих и антибиотических веществ: *Paenibacillus ehimensis* IB 739 (VKM B-2680D), *Pseudomonas koreensis* IB-4 (VKM B-2830D), *Pseudomonas chlororaphis* IB-51. Объектами исследования были растения гороха посевного (*Pisum sativum* L.), люпина белого (*Lupinus albus* L.), нута (*Cicer arietinum* L.), люцерны изменчивой (*Medicago x varia* Martyn), донника белого (*Melilotus albus* Medik.). В качестве препаратов для обработки семян растений применяли жидкую культуру штаммов бактерий. В ходе эксперимента оценивали влияние инокуляции семян на всхожесть, размерные показатели растений, количество клубеньков, анализировали численность различных групп ризосферных микроорганизмов, оценивали количество азота, накопленное в почве и усвоенное растениями. Установлено, что бактериализация семян способствовала увеличению всхожести растений, стимулировала рост побегов и корней, усиливала образование клубеньков. Использование штамма *Paenibacillus ehimensis* IB 739 положительно влияло на азотное питание растений, о чем свидетельствовало накопление азота в корнях и зеленой массе бобовых культур. Отмечено также, что внесенные бактерии подавляли развитие фитопатогенных микроскопических грибов в ризосфере, что способствовало снижению количества растений, пораженных корневыми гнилями. Эффективность предпосевной обработки против корневых гнилей на различных культурах составляла 30-60 %.

Assessment of efficiency of introduction of microbial strains of the genera *Paenibacillus* and *Pseudomonas* in a natural ecosystem of legume plant

Kuzina E.V., Rafikova G.F., Loginov O.N.

Ufa Institute of Biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: biolab316@yandex.ru

One of the most well-known examples of a balanced phytomicrobiome is the legume-rhizobial community. Nodule bacteria, being natural symbionts of leguminous plants, provide the latter with additional nitrogen, some strains of rhizobia possess such properties of PGPB microorganisms as an increase in the productivity of agricultural crops by synthesis of phytohormones and biocontrol of phytopathogens. It seems interesting to study the possibility of increasing the potential of the ecosystem of leguminous plants through the introduction of microorganisms with a set of beneficial properties. The purpose of this work is to study the effect of growth-promoting strains of bacteria on the ecosystem of a legume plant-an aboriginal microbial community. In the experiment, bacterial strains with a set of positive plant properties were used: the ability to fix atmospheric nitrogen and phosphorus, the production of growth-promoting and antibiotic substances: *Paenibacillus ehimensis* IB 739 (VKM B-2680D), *Pseudomonas koreensis* IB-4 (VKM B-2830D), *Pseudomonas chlororaphis* IB-51. The objects of the study were pea plants (*Pisum sativum* L.), white lupine (*Lupinus albus* L.), chickpeas (*Cicer arietinum* L.), alfalfa changeable (*Medicago x varia* Martyn), white sweet melon (*Melilotus albus* Medik.). As a preparation for the treatment of plant seeds, a liquid culture of bacterial strains was used. In the course of the experiment, the influence of seed inoculation on germination, the size indices of plants, the number of nodules was evaluated, the number of different groups of rhizosphere microorganisms was analyzed, the amount of nitrogen accumulated in the soil and assimilated by plants was estimated. It was established that the bacterization of seeds promoted the increase of plant germination, stimulated the growth of shoots and roots, and increased the formation of nodules. The use of the strain *Paenibacillus ehimensis* IB 739 positively influenced the nitrogen nutrition of plants, as evidenced by the accumulation of nitrogen in the roots and green mass of legumes. It was also noted that the introduced bacteria suppressed the development of phytopathogenic microscopic fungi in the rhizosphere, which contributed to a decrease in the number of plants affected by root rot. The effectiveness of presowing treatment against root rot in different cultures was 30-60%.

Промышленное производство биопрепаратов на основе микроорганизмов

Кузнецов В.И.

ООО "НВП "БашИнком", Уфа, Россия

E-mail: saimonnord@yandex.ru

Научно-внедренческое предприятие БашИнком основано в 1989 году группой инженеров, биологов, физиков, химиков и ученых. Общая численность сотрудников более 450 человек. Цель - инновационные разработки и производство.

Сейчас в наш холдинг входит 5 заводов и научно-внедренческий Биотехнологический Центр, объединяющий: Биологическую научно-производственную лабораторию, отдел разработки новых препаратов, отдел кормовых добавок для сельскохозяйственных животных, Химлабораторию, Лабораторию физиологии растений, Лабораторию фитопатологии и селекции с роботизированным участком. В лабораториях непрерывно проводится проверка эффективности, а также усовершенствование выпускаемых препаратов за счет ускоренной направленной селекции природных эффективных штаммов полезных микроорганизмов и усиления антагонизма к выделяемым патогенам возбудителям болезней сельскохозяйственных культур. Также решение данной задачи осуществляется за счет комплексного подхода при создании новых многокомпонентных препаратов широкого спектра действия для различных природных зон ведения сельского хозяйства.

Технология применения биопрепаратов обеспечивает замкнуты цикл сельскохозяйственного производства, позволяющий получить экологически чистую продукцию, высокий уровень сохранности урожая и экологичность утилизации отходов.

В ассортименте более 250 наименований товаров и услуг. Объемы выпуска производственных предприятий под руководством НВП «БашИнком» превышают производство всех биотехнологических предприятий России, бывшего СНГ и Восточной Европы. Ежегодный рост производства компании достигает в среднем 15-20% в год

Основные виды деятельности предприятия БашИнком это разработка и производство современных экологически безопасных микробиологических удобрений, фунгицидов, инсектицидов для сельскохозяйственного производства и личных подсобных хозяйств, а также разработка и производство экологически безопасных пробиотических кормовых добавок для животных на основе штаммов полезных микроорганизмов.

Industrial production of biologic preparations based on microorganisms

Kuznetsov V.I.

ООО "NVP" BashInkom ", Ufa, Russia

The Scientific and Innovation Enterprise BashInkom was founded in 1989 by a group of engineers, biologists, physicists, chemists and scientists. The total number of employees currently exceeds 450 people. The enterprise is targeted at innovative development and production.

Presently our holding comprises 5 factories and the Scientific and Innovative Biotechnological Center uniting the Biological Research and Production Laboratory, the Department for the Development of New Preparations, the Department of Feed Additives for Farm Animals, the Chemical Laboratory, the Laboratory of Plant Physiology, the Laboratory of Phytopathology and Selection with a robot-manned line. In the laboratories, efficiency testing is continuously carried out, as well as the improvement of the produced preparations with the help of accelerated directed selection of natural effective strains of beneficial microorganisms and with an increased antagonism to the pathogenic agents causing diseases of agricultural crops. Also, the solution of this objective is carried out by means of an integrated approach in the process of creating new multi-component preparations with a wide spectrum of effect for various natural agricultural areas.

The technology of biopreparations secures a closed cycle of agricultural production, which enables us to obtain environmentally safe products, a high level of crop protection and environmental safety of waste disposal.

The range includes more than 250 items of goods and services. The output of industrial enterprises under The Scientific and Innovation Enterprise BashInkom exceeds the production of all biotechnological enterprises in Russia, the former CIS and Eastern Europe. On average production growth reaches 15-20% per year.

The main activities of the company BashInkom are the development and production of modern ecologically safe microbiological fertilizers, fungicides, insecticides for agricultural production and private subsidiary farms, as well as the development and production of environmentally safe probiotic feed additives for animals based on strains of beneficial microorganisms.

Два ризобийных ко-микросимбионта, выделенных из реликтового бобового *Oxytropis popoviana*, имеющих комплементарные наборы симбиотических генов и совместно повышающих эффективность нодуляции растений

¹Кузнецова И.Г., ¹Сафронова В.И., ¹Белимов А.А., ¹Сазанова А.Л., ¹Чирак Е.Р., ²Верхозина А.В., ¹Андронов Е.Е.,
¹Пухальский Я.В., ^{1,3}Тихонович И.А.

¹ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (ВНИИСХМ), СПб-Пушкин, Россия

² Сибирский институт физиологии и биохимии растений (СИФИБР), Иркутск, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет (СПбГУ), Санкт-Петербург, Россия

E-mail: Kuznetsova_rina@mail.ru

Исследование феномена ризобийной синергии может открыть новый способ повышения эффективности симбиоза за счет использования вспомогательных генов ко-микросимбионтов. Цель работы: определить таксономическое положение клубеньковых изолятов реликтового бобового растения остролодочник Попова (*Oxytropis popoviana*) и в вегетационных опытах изучить их роль в формировании и функционировании симбиоза. Десять ризобийных штаммов были выделены из корневых клубеньков растений *Oxytropis popoviana*, произрастающих в Бурятии. Для идентификации изолятов были секвенированы гены 16S рРНК, ITS-регионы и гены «домашнего хозяйства» *recA*, *glnII* и *rpoB*. Девять быстрорастущих изолятов были отнесены к роду *Mesorhizobium*: восемь штаммов были идентифицированы как *M. japonicum* и один изолят принадлежал виду *M. kowhaii*. Единственный медленно растущий изолят был идентифицирован как *Bradyrhizobium* sp. Два штамма, *M. japonicum* Оро-242 и *Bradyrhizobium* sp. Оро-243 были выделены из одного клубенька. Наличие симбиотических генов у этих изолятов было определено на основании анализа полногеномных последовательностей. В изоляте *M. japonicum* Оро-242 были представлены общие гены *nodABC* и другие симбиотические гены, необходимые для нодуляции растения и азотфиксации. Штамм *Bradyrhizobium* sp. Оро-243 не содержал основных *nod*, *nif* и *fix* генов, однако у него были обнаружены пять генов (*nodPQ*, *nifL*, *nolK* и *noeL*), влияющих на специфичность растительно-ризобийных взаимодействий и отсутствующих в изоляте Оро-242. Штамм *Bradyrhizobium* sp. Оро-243 не мог самостоятельно образовывать клубеньков, однако после совместной инокуляции с изолятом *M. japonicum* Оро-242 значительно повышалась скорость образования и размер клубеньков. Таким образом, мы продемонстрировали, что таксономически различные микроорганизмы, формирующие архаичную симбиотическую систему могут быть ко-микросимбионтами, совместно инфицирующими один клубенек, что приводит к ускорению процесса клубенькообразования из-за комплементарных наборов симбиотических генов. Данная работа была выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №16-16-00080). Депонирование штаммов в коллекции ВКСМ осуществлено в рамках Программы ФАНО России по развитию и инвентаризации биоресурсных коллекций научными организациями.

Two rhizobial co-microsymbionts isolated from the relic legume *Oxytropis popoviana* have complementary sets of symbiotic genes and together increase the efficiency of host plant nodulation

¹Kuznetsova I. G., ¹Safronova V. I., ¹Belimov A. A., ¹Sazanova A. L., ¹Chirak E. R., ²Verkhovina A. V., ¹Andronov E. E.,
¹Puhalsky Ya. V., ^{1,3}Tikhonovich I. A.

¹ All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology (ARRIAM), St.- Petersburg, Russia

² Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry (SIPPB), 664033, Irkutsk, Russia

³ Saint Petersburg State University, Department of Genetics and Biotechnology, St.-Petersburg, Russia

Symbiotic systems of relic legume plants are the promising models for studying the evolution of plant-microbe interactions, which is still poorly understood. Ten rhizobial strains were isolated from root nodules of the Miocene-Pliocene relict legume *Oxytropis popoviana* Peschkova, originated from the restricted area of the Baikal Lake region. For identification of the isolates obtained the sequencing of 16S rDNA, ITS region and housekeeping genes *recA*, *glnII* and *rpoB* was used. It was shown that nine fast-growing isolates were *Mesorhizobium*-related: eight strains were identified as *M. japonicum* (99.61 -100% rrs similarity with the type strain MAFF 303099T) and one isolate belonged to *M. kowhaii* (100% rrs similarity with the type strain ICMP 19512T). The only slow-growing isolate was identified as *Bradyrhizobium* sp. due to the difficulty of determining at the species level. Two strains Opo-242 and Opo-243 belonged to *M. japonicum* and *Bradyrhizobium* sp., respectively were isolated from the same nodule and present there in approximately equal proportion. Symbiotic genes of these isolates were searched throughout the whole genome sequences obtained. The common *nodABC* genes necessary for the formation of symbiosis and other *nod*, *noe*, *nif* and *fix* genes required for the plant nodulation and nitrogen fixation were present in the isolate Opo-242. The strain Opo-243 did not contain the principal *nod*, *nif* and *fix* genes, however five genes (*nodPQ*, *nifL*, *nolK* and *noeL*) affecting the specificity of the plant-rhizobium interactions and absent in the isolate Opo-242 were detected. Symbiotic phenotype of the isolates Opo-242 and Opo-243 was studied in sterile plant nodulation assays with *O. popoviana* plants using variants of mono- and co-inoculation. Root nodules were observed in two variants of inoculation: with the isolate Opo-242 and co-inoculation with both strains. It was revealed that the isolate Opo-243 could not independently form a symbiosis, however significantly accelerated the root nodule formation after co-inoculation with the isolate Opo-242. Thus we demonstrated that strains isolated from the archaic symbiotic systems can be co-microsymbionts having complementary sets of symbiotic genes and increasing the efficiency of host plant nodulation. Joint presence of such co-microsymbionts in nodules can promote the recruitment of genes that are important for symbiosis and distributed over different taxa. This work was supported by the Russian Science Foundation (grant 16-16-00080). Deposition of strains in the RCAM collection was supported by the Federal Agency of Scientific Organizations (the Program for the Development and Inventory of Bioresource Collections).

Доместикация отечественных каучуконосов кок-сагыза и крым-сагыза

¹Кулуев Б.Р., ¹Князев А.В., ¹Гумерова Г.Р., ¹Михайлова Е.В., ²Фатерыга А.В., ³Конькова Н.Г., ¹Чемерис А.В.

¹Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

²Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН, Феодосия, Россия

³Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: kuluev@bk.ru

Натуральный каучук является природным сырьем с уникальными свойствами, благодаря которым он широко применяется в промышленности, медицине и других отраслях. Начиная с 19 века и до сегодняшнего дня идет постоянный рост спроса на натуральный каучук. Основным природным источником каучука является гевея бразильская, однако плантации этого дерева весьма уязвимы из-за распространения грибковых заболеваний. Одними из наиболее перспективных каучуконосных растений, которые можно возделывать на территории России являются кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz*) и крым-сагыз (*Taraxacum hybernum*) в корнях которых накапливается до 10-27% каучука на сухой вес, не уступающему по качеству гевейному каучуку. Из этих двух растений на полях широко возделывался лишь кок-сагыз и в конце 1930-х годов в СССР были начаты работы по окультуриванию данного растения. Однако уже через 15-20 лет эти работы были полностью прекращены и кок-сагыз так и не успел стать культурным растением. Начиная с 2010-х годов в мире наблюдается новый всплеск интереса к кок-сагызу и другим альтернативным источникам каучука. Целью нашей работы является доместикация каучуконосных растений кок-сагыза и крым-сагыза. Семена кок-сагыза были получены из ботанического сада г. Бонн (Германия), а также одна линия - из коллекции ВИР (Россия). Семена крым-сагыза были собраны из естественных местообитаний. Наиболее существенными проблемами при выращивании этих двух видов одуванчика остаются плохая всхожесть семян, недружность всходов, необходимость в холодной стратификации, слабость проростков, небольшие размеры корней, сильная разветвленность корней, низкое содержание каучука и т.д. Для решения этих и других проблем необходимо проводить многолетнюю селекцию форм, с признаками культурного растения. Однако на это может потребоваться несколько десятков лет. Чтобы ускорить процесс доместикации кок-сагыза и крым-сагыза нами планируется применить методы гибридизации, полиплоидизации, геномной инженерии и геномного редактирования. Одной из больших проблем в селекции кок-сагыза остается отсутствие значительного полиморфизма в линиях этого растения и небольшое изначальное число этих линий. Поэтому нами были начаты работы по химически индуцированному мутагенезу кок-сагыза и крым-сагыза при помощи азиды натрия.

Domestication of rubber dandelion plants of kok-saghyz and krym-saghyz

¹Kuluev B.R., ¹Knyazev A.V., ¹Gumerova G.R., ¹Mikhaylova E.V., ²Fateryga A.V., ³Konkova N.G., ¹Chemieris A.V

¹Institute of Biochemistry and Genetics UFRS RAS, Ufa, Russia

²The T.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station - Nature Reserve of RAS, Feodosiya, Russia

³Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Saint-Petersburg, Russia

Natural rubber is a natural raw material with unique properties, due to which it is widely used in industry, medicine and other industries. Since the 19th century and until today there has been a steady increase in demand for natural rubber. The main natural source of rubber is *Hevea brasiliensis*, but the plantations of this tree are very vulnerable due to the spread of fungal diseases. One of the most promising rubber plants that can be cultivated on the territory of Russia is the kok-saghyz (*Taraxacum kok-saghyz*) and the krym-saghyz (*Taraxacum hybernum*), in the roots of which up to 10-27% of rubber is stored for dry weight, not inferior in quality to the hevea rubber. Of these two plants, only kok-saghyz was widely cultivated in the fields and in the late 1930s, works on the cultivation of this plant were started in the USSR. However, within 15-20 years these works were completely stopped and the kok-saghyz did not have time to become a cultural plant. Since 2010, a new surge in interest in kok-saghyz and other alternative sources of rubber has been observed in the world. Seeds of kok-saghyz were obtained from the Botanical Garden of Bonn (Germany), as well as one line from the collection of VIR (Russia). Seeds of krym-saghyz were collected from natural habitats. The purpose of our work is the domestication of rubber dandelion plants of kok-saghyz and krym-saghyz. The most significant problems in the cultivation of these two types of dandelions are poor seed germination, unfriendly shoots, the need for cold stratification, the weakness of seedlings, small root sizes, strong branching of the roots, low rubber content, etc. To solve these and other problems, it is necessary to carry out long-term selection of forms, with signs of a cultural plant. However, this may take several decades. To speed up the process of domestication of kok-saghyz and krym-saghyz, we are planning to apply methods of hybridization, polyploidization, genetic engineering and genomic editing. One of the big problems in the selection of kok-saghyz remains the absence of significant polymorphism in the lines of this plant and a small initial number of these lines. Therefore, we began work on the chemically induced mutagenesis of kok-saghyz and krym-saghyz with sodium azide.

Исследование *Triticum sinskajae* на содержание ДНК-маркеров иммуногенных пептидов

Кулуев А.Р., Матниязов Р.Т., Чемерис А.В.

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

E-mail: kuluev.azat91@yandex.ru

Широко известно, что такие виды как пшеница, рис и ячмень содержат в зернах белки глютены, которые относятся к α -глиадинам. Эти белки ответственны за такие патологии как целиакия (CD), пищевая энтеропатия с распространенностью около 0,7-2% в популяции человека у генетически предрасположенных индивидуумов и чувствительность к глютену. Белки α -глиадины содержат три основных иммуногенных пептида: p31-43, который индуцирует врожденную иммунную реакцию; 33-мерный пептид, который вызывает наиболее сильную иммунную реакцию; а также дополнительный эпитоп DQ2.5-glia-a3, который частично перекрывается с 33-мерным пептидом. Мы провели исследование на содержание генов глютенов в растениях *Triticum sinskajae*. Для этого мы подобрали последовательности праймеров к α -глиадинам пшениц. После амплификации мы секвенировали последовательности в ЗАО «Евроген» (г. Москва). По полученным данным выяснилось, что *T. sinskajae* содержит эпитоп DQ2.5-glia-a3, который наименее иммуногенен. Также, обнаружился участок 33-мерного пептида, но он оказался редуцированным, не каноничным. Таким образом, мы предполагаем, что возможно *T. sinskajae* может быть использована в качестве гипоаллергенной культуры (в отношении целиакии и чувствительности к глютену). В исследованиях других исследователей указывается что наиболее аллергенным является *Triticum aestivum*. Исследование других диплоидных пшениц показывает, что у других видов, таких как *T. monococcum* и *T. boeoticum* есть измененные участки 33-мерного пептида. Но, во-первых, нужны более тщательные исследования диплоидных видов на содержание глютенов. Во-вторых, только *T. sinskajae* является единственным легкообмолачиваемым видом среди диплоидных пшениц, поэтому этот вид может быть рекомендован для доместикации в качестве сельскохозяйственной культуры со сниженными аллергенными свойствами.

The research of the *Triticum sinskajae* on the content of DNA markers of immunogenic peptides

Kuluev A.R., Matniyazov R.T., Chemeris A.V.

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

It is widely known that such species as wheat, rice and barley contain in the grains proteins of gluten, which belong to α -gliadins. These proteins are responsible for such pathologies as celiac disease (CD), food enteropathy with a prevalence of about 0.7-2% in the human population in genetically predisposed individuals and sensitivity to gluten. Proteins of α -gliadins contain three main immunogenic peptides: p31-43, which induces a congenital immune response; 33-mer peptide, which causes the most powerful immune response; as well as an additional epitope of DQ2.5-glia-a3, which overlaps partially with the 33-mer peptide. We conducted a study on the content of gluten in plants *T. sinskajae*. To do this, we selected the primer sequences for the α -gliadins of wheat. After amplification, we sequenced the sequences in CJSC "Evrogen" (Moscow). According to the data obtained, it was found that *T. sinskajae* contains the epitope DQ2.5-glia-a3, which is the least immunogenic. Also, a 33-mer peptide region was found, but it turned out to be reduced, not canonical. Thus, we assume that it is possible that *T. sinskajae* can be used as a hypoallergenic culture (for celiac disease and sensitivity to gluten). In studies of other scientists, it is indicated that *T. aestivum* is the most allergenic. A study of other diploid wheat shows that other species, such as *T. monococcum*, *T. boeoticum*, have altered areas of the 33-mer peptide. But, first, more careful studies of diploid species on the content of gluten are needed. Secondly, only *T. sinskajae* is the only easily threshed species among diploid wheat, so this species can be recommended as an agricultural crop with reduced allergenic properties.

Влияние инокуляции семян эндофитными штаммами бактерий *Bacillus subtilis* на микоризацию корней пшеницы

¹Курамшина З.М., ²Хайруллин Р.М.

¹Стерлитамакский филиал Башкирского государственного университета, Стерлитамак, Россия

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

E-mail: kuramshina_zilya@mail.ru

Многие свойства антагонистических бактерий *B. subtilis* остаются все еще не изученными, в том числе особенности их взаимоотношений с образующими микоризу грибами. Нами исследовано влияние эндофитных штаммов *B. subtilis* 26Д и 11ВМ на формирование везикулярно-арбускулярной микоризы в корнях пшеницы. Хорошо известно, что при одинаковой частоте заселения растений грибами, степень распространения микроорганизмов в тканях может быть различной, что определяется ответной реакцией растений на внедрение этих чужеродных агентов и, безусловно, зависит также от обработки растений различными препаратами. При обработке семян бактериями частота встречаемости микоризы (т.е. доля растений пшеницы, сформировавших микоризу) сохранялась на достаточно высоком уровне по сравнению с контрольными не обработанными растениями, при этом другие показатели микоризации заметно уменьшались. Так, интенсивность микоризации корневой системы пшеницы при обработке семян клетками *B. subtilis* падала практически до нуля, количество арбускул уменьшалось до предельно малых величин. Выявленный негативный эффект влияния эндофитных бактерий на микотрофность корней пшеницы, по-видимому, выступает комплексным показателем проявления биологической активности бацилл, например, антагонистической, поскольку известна способность исследуемых штаммов подавлять рост фитопатогенных грибов *in vitro*. С другой стороны, бактерии, продуцируя органические кислоты, способны увеличивать подвижность определенных элементов питания в почве и, тем самым, облегчать их поступление в растения. При этом хорошо известна отрицательная связь между содержанием подвижного фосфора в почве и степенью микоризации растений. Исследования выявили, что инокуляция зерновок пшеницы бактериями стимулирует рост этой культуры, а также увеличивает содержание фосфора в растительных тканях. Таким образом, одним из механизмов стимуляции роста пшеницы эндофитными представителями *B. subtilis* и их влияния на формирование эндомикоризы является улучшение фосфорного питания.

Effect of inoculation of seeds with endophytic strains of *Bacillus subtilis* bacteria on wheat roots mycorrhization

¹Kuramshina Z.M., ²Khairullin R.M.

¹Sterlitamak branch of Bashkir State University, Sterlitamak, Russia

²Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, Russia

Many properties of antagonistic *B. subtilis* bacteria remain still uninvestigated, including the features of their interaction with the mycorrhizae fungi. We investigated the influence of endophytic strains of *B. subtilis* 26D and 11BM on vesicular-arbuscular mycorrhiza formation in wheat roots. It is well known that the frequency the plants lesion by fungi and the degree of spread of microorganisms in tissues may be different, and this is determined by plants response to the introduction of these foreign agents and, of course, depends on the plants treatment with various preparations. When seeds were treated with bacteria, the incidence of mycorrhiza (i.e. the percentage of wheat plants that formed mycorrhizae) was manifested at a sufficiently high level in comparison to control plants that were not treated, while other mycorrhizas indexes decreased markedly. When wheat seeds were treated with *B. subtilis* cells, the intensity of root mycorrhization dropped almost to zero, the number of arbuscules decreased to extremely low values. The detected negative effect of the influence of endophytic bacteria on the mycotrophy of wheat roots appears as a complex indicator of the manifestation of biological activity of bacilli, for example, antagonistic activity, since it is known that these strains can inhibit the growth of phytopathogenic fungi. On the other hand, bacteria, producing organic acids, are able to increase the mobility of certain nutrients in the soil and, thereby, facilitate their entry into plants. The negative relationship between the content of mobile phosphorus in the soil and the degree of plants mycorrhization is well known. Our studies show that inoculation of wheat seeds by bacteria stimulates the growth of this culture, and also increases the phosphorus content in plant tissues. Thus, one of the mechanisms of stimulation of wheat growth by endophytic *B. subtilis* bacteria and their influence on endomycorrhiza formation is the improvement of phosphorus nutrition.

Иммунолокализация цитокинина в клубеньках гороха

Кусакин П.Г., Китаева А.Б., Цыганова А.В., Цыганов В.Е.

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: kussakin@gmail.com

С использованием иммунолокализации, конфокальной и электронной микроскопии было изучено распределение цитокинина транс-зеатина в 2-х и 4-х недельных клубеньках гороха. Были использованы исходные линии SGE и Sprint-2, а также полученные на их основе мутанты: SGEFix--1 (sym40) (гипертрофированные инфекционные капли, нарушения в дифференцировке бактериоидов), SGEFix--2 (sym33) (запертые инфекционные нити), SGEFix--3 (sym26) (преждевременное старение симбиотических компартментов) и Sprint-2Fix- (sym31) (недифференцированные бактериоиды). В 2-х недельных клубеньках исходных линий максимум транс-зеатина наблюдался в меристеме и зоне инфекции, а также в дистальной части зоны азотфиксации. В зоне инфекции метка накапливалась в молодых инфекционных нитях и каплях. В 4-х недельных клубеньках наблюдалось снижение интенсивности метки, особенно в зоне азотфиксации. В 2-х недельных клубеньках мутанта SGEFix--1 (sym40) максимум транс-зеатина наблюдался в меристеме, зоне инфекции и периферических тканях. Метка присутствовала в ядрах инфицированных клеток. В 4-х недельных клубеньках также падала интенсивность метки. В клубеньках Sprint-2Fix- (sym31) наблюдался схожий характер распределения транс-зеатина. В 2-х недельных клубеньках мутанта SGEFix--2 (sym33) максимум транс-зеатина наблюдался преимущественно в меристеме, данный паттерн сохранялся и у 4-х недельных клубеньков. У мутанта SGEFix--3 (sym26) как у 2-х, так и 4-х недельных клубеньков максимум распределения транс-зеатина присутствовал в меристеме, зоне инфекции, а также в дистальной части зоны, соответствующей зоне азотфиксации клубеньков исходной линии.

При электронно-микроскопическом исследовании наблюдалась связь транс-зеатина в симбиотических клубеньках с инфекционными структурами, в основном с симбиосомами, содержащими зрелые бактериоиды. В стареющих бактериоидах количество метки к транс-зеатину снижалось. В матриксе инфекционных нитей и капель наблюдалось меньшее количество метки, по сравнению с симбиосомами. У мутантов количество метки к транс-зеатину было значительно снижено в симбиосомах по сравнению с диким типом.

Таким образом, вероятно на поздних стадиях развития клубенька цитокинин необходим для дифференцировки инфицированных клеток и бактериоидов. Работа поддержана РФФИ 17-76-30016

Cytokinin immunolocalization in pea nodules

Kusakin P.G., Kitaeva A.B., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia

Using immunolocalization, confocal and electron microscopy, the distribution of cytokinin trans-zeatin in 2 and 4-week-old pea nodules of the parental lines SGE and Sprint-2, as well as the corresponding mutants: SGEFix--1 (sym40) (hypertrophied infection droplets, abnormalities in bacteroid differentiation), SGEFix--2 (sym33) (locked infection threads), SGEFix--3 (sym26) (premature degradation of symbiotic compartments), and Sprint-2Fix- (sym31) (no bacteroid differentiation) was analysed.

In 2-week-old nodules of the parental lines the trans-zeatin maximum was observed in the meristem, the infection zone and in the distal part of the nitrogen fixation zone. In the infection zone the label was accumulated in the juvenile infection threads and droplets. In 4-week-old nodules the intensity of labeling was decreased, especially in the nitrogen fixation zone.

In 2-week-old nodules of SGEFix--1 (sym40) mutant the trans-zeatin maximum was observed in the meristem, the infection zone and in the peripheral tissues. The label was present in the nuclei of infected cells. In 4-week-old nodules the label was observed in the meristem and its intensity was decreased. The same pattern was observed in Sprint-2Fix- (sym31) nodules. In 2 and 4-week-old nodules of SGEFix--2 (sym33) mutant the trans-zeatin maximum was observed in the meristem, the infection zone and in the distal part of the zone corresponding to the nitrogen fixation zone in the wild type nodules.

In electron microscopy studies in symbiotic nodules trans-zeatin was associated with infection structures (mainly with symbiosomes containing mature bacteroids). In senescent bacteroids, the amount of trans-zeatin label was decreased. In the matrix of infection threads and droplets, a reduced amount of label was observed, compared with symbiosomes. In mutants, the amount of label corresponding to trans-zeatin was significantly reduced in symbiosomes compared to wild type.

Thus, cytokinin is probably required for differentiation of infected cells and bacteroids during the late stages of nodule development. The study is supported by Russian Science Foundation (17-76-30016).

Оптимизация питательной среды по белковому компоненту для культивирования штамма *Bacillus subtilis* 26Д

Кызин А.А.

ООО "НВП "БашИнком", Уфа, Россия

E-mail: saimonnord@yandex.ru

Повышение выхода целевого продукта путем оптимизации состава и свойств питательной среды является постоянной и одной из самых главных задач микробиологического производства. С этой целью широко применяются различные методы, в том числе и физико-химические.

Процесс кавитации представляет собой физическое явление, при котором в результате гидродинамического или акустического воздействия на жидкость происходит местное понижение давления, приводящее к образованию фазовых пустот – кавитационных пузырьков. Под воздействием переменного местного давления пузырьки могут резко сжиматься и расширяться, в результате чего температура газа внутри пузырьков колеблется в широких пределах, и может достигать нескольких сот градусов по Цельсию. Эффект кавитации широко применяется в промышленности, медицине, военной технике и других смежных областях.

В своей научной работе мы изучали влияние процесса кавитации на ростовые свойства полусинтетической питательной среды для жидкофазного культивирования *Bacillus subtilis*. А именно изменение аминокислотного состава в процессе культивирования бактерий на питательной среде, гомогенизированной на роторном кавитаторе.

По результатам проведения серии экспериментов установлено, что в процессе гомогенизации питательной среды на роторном кавитаторе, даже в течение непродолжительных промежутков времени, происходит снижение концентрации некоторых свободных α -аминокислот. При культивировании *Bacillus subtilis* штамм 26Д на модифицированной кавитацией питательной среде, бациллы вновь синтезируют 8 протеиногенных аминокислот до концентрации близкой, а в некоторых случаях превышающей исходную в питательной среде до обработки, в то время как на питательной среде без обработки преимущественно происходит расход свободных аминокислот. Также в ходе проведения ряда экспериментов установлено, что титр жизнеспособных клеток и спор бактерий *Bacillus subtilis* в культуральной жидкости, полученной на питательной среде, предварительно обработанной на кавитаторе в среднем на порядок выше, чем на обычной среде.

Таким образом, применение эффекта кавитации позволяет оказывать воздействие на компоненты питательной среды, что приводит к повышению ее ростовых свойств и увеличению выхода целевого продукта.

Nutrient medium optimization on protein component to cultivate *Bacillus subtilis* 26D strain

Kyzin A.A.

ООО "NVP" BashInkom", Ufa, Russia

One of the main and permanent objectives of microbiological production is an increase in desired product yield through optimization of medium content and properties. For this purpose, various methods are widely applied, including physical-chemical ones.

Cavitation process is a physical phenomenon in which, as a result of a hydrodynamic or acoustic effect on a fluid, a local pressure decrease occurs, leading to the formation of phase cavities - cavitation bubbles. Under the influence of variable local pressure, bubbles can contract and expand sharply, resulting in a wide gas temperature inside the bubbles, and can reach several hundred degrees Celsius. The effect of cavitation is widely used in industrial, medical, military equipment and other related fields.

In our scientific work, we have studied the effect of cavitation process on growth properties of semisynthetic nutrient medium for liquid phase cultivation of *Bacillus subtilis*, and more specifically the change of amino acid content in the process of bacteria cultivation on the nutrient medium, homogenized rotary cavitator.

As a result of a series of experiments we observed that in the process of medium homogenization with rotary cavitator even within short periods of time concentration of some free α -amino acids decreases. While cultivating *Bacillus subtilis* 26D strain on the cavitation modified medium, the bacilli again synthesize 8 proteinogenic amino acids up to the concentration close to and in some cases exceeding the initial one in the medium prior to processing, while a free amino acid consumption predominates on the nutrient medium without treatment. Also, during a number of experiments it was found that the titre of viable cells and spores of *Bacillus subtilis* bacteria in the culture liquid obtained on a nutrient medium pretreated on a cavitator is on average higher than in a usual medium.

Thus, cavitation can be used to affect nutrient medium components which results in improved growth properties and increased desired product yield.

Новые аспекты получения и применения биопрепаратов для растениеводства

Лактионов Ю.В., Кожемяков А.П.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», г. Санкт-Петербург, Пушкин, Россия
E-mail: Laktionov@list.ru

За последние годы современное сельскохозяйственное производство России в разы увеличило объёмы применения микробиологических препаратов. В связи с этим должны разрабатываться и новые подходы, как при культивировании микроорганизмов, так и получении готовых препаративных форм, которые будут удовлетворять пожеланиям аграриев. Получаемые препараты должны иметь достаточно высокий титр бактерий, пригодны для массового механизированного использования и транспортировки, технологичны. Современные биотехнологические производства уже не могут позволить себе выпуск препаратов «на коленке» с нестабильным титром и не отвечающим современным показателям качества (высокие стабильные титры, отсутствие контаминации и т.д.).

Одной из основных проблем при наработке больших объёмов микробиологических препаратов является опасность контаминации питательной среды посторонней микрофлорой. Прежде всего, это связано со спецификой технологической линии по культивированию микроорганизмов, которая может состоять из ряда ферментёров, соединённых между собой (как правило, 2-4 ферментёра разного объёма в производственной линии).

Нами изучалась возможность использования различных антибиотиков направленного действия на жизнеспособность клубеньковых бактерий и посторонней микрофлоры в процессе культивирования. Показано, что действие антибиотиков, направленных на подавление грамположительной микрофлоры не подавляет развитие клубеньковых бактерий рода *Bradyrhizobium japonicum*. Генетический анализ клонов, изолированных из культуральной жидкости (без антибиотика и в его присутствии) показал, что основные хозяйственно-значимые гены не затронуты и полностью совпадают между собой, их структура не нарушена. Возможно, добавление антибиотиков в готовую препаративную форму в будущем может быть использовано с целью «зачистки» поверхности семенного материала от патогенов и агрессивной аборигенной микрофлоры.

Известно, что оболочка семян бобовых является токсичной для большинства видов клубеньковых бактерий (эволюционный механизм защиты от фитопатогенов). Нами было показано, что использование защитных композиций, включающих в себя водорастворимые полимеры, позволяет значительно снять токсичное влияние семенной оболочки на клубеньковые бактерии. Благодаря этому, процесс инокуляции бобовых растений становится более технологичным и удобным. Использование подобного «протектора» для клубеньковых бактерий позволит значительно увеличить время от инокуляции семенного материала до его посева в почву.

New aspects of production and application of biopreparation for plant growing

Laktionov Y.V., Kojemyakov A.P.

FSBSI "All-Russian Research Institute for agriculture microbiology", Saint-Petersburg, Pushkin, Russia

In recent years, the modern agricultural production in Russia has increased the use of microbiological preparations several times. In this regard, new approaches should be developed, both in the cultivation of microorganisms, and in the preparation of ready-made formulations that will meet the wishes of the agrarians. Obtained drugs should have a sufficiently high titer of bacteria, suitable for mass mechanized use and transportation, and technological. Modern biotechnological production facilities can no longer afford to produce biopreparations "on the knee" with an unstable titer and do not meet modern quality indicators (high stable titres, no contamination, etc.).

One of the main problems in the production of large volumes of microbiological preparations is the danger of contamination by an extraneous microflora. First of all, this is due to the specificity of the technological line for the cultivation of microorganisms, which can consist of a number of fermenters, connected together (usually 2-4 fermentors of different volumes in the production line).

We studied the possibility of using various directed-action antibiotics on the viability of nodule bacteria and extraneous microflora in the process of cultivation. It was shown that the action of antibiotics directed to inhibition of Gram-positive microflora does not suppress the development of nodule bacteria of the genus *Bradyrhizobium japonicum*. Genetic analysis of clones isolated from the culture liquid (without antibiotic and in its presence) showed that the main significant genes are not affected and completely coincide, their structure is not violated. Perhaps the addition of antibiotics to a ready-made formulation in the future can be used to "clean up" the surface of seed from pathogens and aggressive native microflora.

It is known that the shell of legumes is toxic for most species of nodule bacteria (the evolutionary mechanism of protection against phytopathogens). We have shown that the use of protective compositions, including water-soluble polymers, can significantly remove the toxic effect of the seed on nodule bacteria. Due to this, the process of inoculation of legumes becomes more technological and convenient. The use of such a "protector" for nodule bacteria will significantly increase the time from inoculation of the seed material to its sowing into the soil.

**Биоразнообразие и экологическая роль грибов, ассоциированных с короедом-типографом в еловых лесах
Ленинградской области**

¹Леднев Г.Р., ¹Левченко М.В., ^{1,2}Казарцев И.А.

¹Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

²Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: kazartsev@inbox.ru

Для изучения микобиоты, ассоциированной с короедом-типографом, отлов насекомых осуществлялся в Ленинградской области в период их массового лёта (май 2017 г.) ловушками Барьер-500. Оценку таксономического состава грибов проводили как для смывов с кутикулы насекомых, так и гомогенизированных трупов с предварительной стерилизацией их поверхности, с последующим высевом на агаризованные питательные среды (солодовый агар; среда Сабуро). Доля пропагул дрожжей в составе микобиоты, ассоциированной с короедом-типографом, всегда превышала долю филаментных грибов. Идентификацию мицелиальных грибов проводили с помощью световой микроскопии, а также путем секвенирования рДНК методом Сэнгера и дальнейшего сравнения полученных последовательностей с задепонированными в Генбанке. Показано, что микобиота, ассоциированная с короедом-типографом, может быть разделена на четыре трофические группы: ксилотрофы, деревоокрашивающие грибы (сем. Ophiostomataceae), энтомопатогены и неспециализированные сапротрофы. Ксилотрофы были обнаружены исключительно в гомогенизатах насекомых, и их доля составила 9% от общего количества исследованных колоний. Были обнаружены тривиальные виды: *Bjerkandera adusta*, *Fomitopsis pinicola*, *Irpex lacteus*, *Polyporus* sp. Полученные сведения показывают, что короед-типограф переносит не только Ophiostomataceae, но и предположительно мутуалистически не связанные с ним ксилотрофные грибы. Таким образом, проясняются новые особенности распространения дереворазрушающих грибов в лесных экосистемах. Семейство Ophiostomataceae было представлено *Ophiostoma bicolor*, *O. clavatum* complex, *Grosmannia penicillata* и прочими неидентифицированными Ophiostomataceae spp. и превалировало над всеми остальными найденными таксонами грибов как в поверхностных смывах, так и в гомогенизатах (66 и 81% соответственно). Таким образом, доля грибов данной группы была существенно выше во «внутренней» микобиоте короеда в сравнении с «наружной». Энтомопатогенные грибы были представлены родами *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Isaria*. Их встречаемость на поверхности и внутри жуков практически совпадала и составила соответственно 2.5 и 2.2%. Еще одна зафиксированная группа грибов - это сапротрофы с широкой субстратной специализацией (*Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* и отдел Zygomycota). Они в большем количестве (26%) встречались на поверхности экзоскелета и почти не регистрировалась в гомогенизатах. Представленные результаты получены при финансовой поддержке РФФИ (грант 17-04-00474).

Biodiversity and ecological role of the fungi associated with ips typographus in spruce forests stands of the Leningrad region

¹Lednev G.R., ¹Levchenko M.V., ^{1,2}Kazartsev I.A.

¹All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, Russia

²Saint Petersburg State Forest Technical University, St. Petersburg, Russia

To study the mycobiota associated with the European spruce bark beetle mass trapping of these insects was carried out in the period of their spring swarm (May, 2017). Bark beetle traps (Barrier - 500) were placed in eight sites of the Leningrad region. Fungal cultures were isolated from the insect's cuticles washouts, as well as homogenized and previously surface-sterilized insect's corpses on Malt Extract Agar and Sabouraud medium. Proportion of yeast colonies always exceeded the proportion of filamentous fungi. Taxonomical identification of filamentous fungi was conducted with light microscopy and sequencing of rDNA. Mycobiota associated with the European spruce bark was referred to four ecological groups: wood decayers, wood-staining fungi (members of family Ophiostomataceae), entomopathogens and unspecialized saprotrophs. Wood decayers were found only in the homogenized insects and their abundance stood at 9 %. Mainly common wood decayers were found (*Bjerkandera adusta*, *Fomitopsis pinicola*, *Irpex lacteus*, *Polyporus* sp). Received data shows that the bark beetles transfer not only Ophiostomataceae, but also supposedly non-mutualistic wood decayers. The family Ophiostomataceae was presented by *Ophiostoma bicolor*, *Ophiostoma clavatum* complex, *Grosmannia penicillata* and other unidentified Ophiostomataceae spp. prevailed over all other found fungal taxons, both in superficial washouts and in homogenates. Their abundance comprised 66 and 81% respectively. Thus the proportion of this group of fungi was significantly higher in the internal mycobiota of the bark beetle in comparison with the external. Entomopathogenic fungi were presented by genera *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Isaria*. Occurrence of this group in external and internal specimens practically coincided and made respectively 2.5 and 2.2%. Another mentioned group consists of saprotrophic fungi with broad substrate utilization (*Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* and phylum Zygomycota). They in much bigger quantity (26%) revealed on the surface of an exoskeleton and were almost absent in the homogenates. Present research was supported by RFBR (17-04-00474).

Перспективы использования биотехнологических подходов в селекционно-генетических исследованиях мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.)

Леонова И.Н., Стасюк А.И., Сколотнева Е.С., Лихенко И.Е., Салина Е.А.

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

E-mail: leonova@bionet.nsc.ru

Создание новых форм мягкой пшеницы, характеризующихся устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессовым факторам, адаптивностью и урожайностью с помощью классических методов селекции требует длительных временных затрат и не позволяет в полной мере утилизировать генетический потенциал источников и доноров хозяйственно важных признаков. В настоящее время для ускорения селекционного процесса эффективны технологии, основанные на применении ДНК-маркеров. В данной работе представлены результаты использования биотехнологических подходов для получения новых пребридинговых форм и для скрининга мягкой пшеницы по локусам хозяйственно ценных признаков. Полногеномный поиск ассоциаций (GWAS) использован для характеристики коллекции сортов яровой пшеницы по локусам устойчивости к грибным патогенам. По результатам генотипирования с помощью технологии Illumina Infinium 15K на хромосомах 5A, 6D и 1D выявлены информативные SNP маркеры, ассоциированные с эффективными локусами устойчивости к грибным патогенам. Результаты GWAS подтверждены скринингом коллекции сортов с помощью STS, SCAR и SSR маркеров, сцепленных с известными генами устойчивости и рекомендованным для использования в схемах MAS. Ассоциативное картирование, проведенное на основе результатов многолетних оценок сортов по элементам продуктивности, выявило 65 SNP, ассоциированных с числом зерен в колосе, массой зерна с колоса, массой 1000 зерен, урожайностью и числом продуктивных побегов. Идентифицированы локусы на хромосомах 1D, 2D, 5B и 6B, проявляющие достоверные ассоциации с фенотипическим проявлением признаков «масса зерна с колоса», «масса 1000 зерен» и «урожайность». Полученные результаты будут использованы для разработки специфичных маркеров для локусов, детерминирующих продуктивность мягкой пшеницы. Для создания озимых и яровых форм мягкой пшеницы, устойчивых к возбудителям грибных болезней, разработаны схемы маркер-ориентированной селекции (MAS), основанные на гибридизации яровых доноров генов устойчивости с озимыми сортами. Отбор растений, характеризующихся яровым или озимым образом жизни и содержащих локусы устойчивости, проводился с помощью маркеров STS и SSR, специфичных для целевых локусов. Оценка отобранных маркерами потомков по хозяйственно ценным признакам показала эффективность использования MAS-технологий для создания в короткие сроки яровых и озимых линий с низкой восприимчивостью к грибным патогенам. Исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда (грант №16-16-00011).

Perspectives of using biotechnological approaches in genetic and pre-breeding studies of common wheat (*T. aestivum* L.)

Leonova I.N., Stasyuk A.I., Skolotneva E.S., Likhenko I.E., Salina E.A.

The Federal research center Institute of Cytology and Genetics of Siberian branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Development of high yielding forms of bred wheat characterized by resistance to biotic and abiotic stresses and adaptability using conventional breeding requires a long time and does not allow to utilize the genetic potential of sources and donors of agronomically important traits. At present, modern technologies based on the application of DNA markers developed for target loci are used for acceleration of breeding process. This paper presents the results of screening the gene pool of common wheat and creation of pre-breeding lines by means of biotechnological approaches. Genome-wide association study (GWAS) was used to characterize the collection of spring wheat varieties for loci determining resistance to fungal pathogens. Genotyping using Illumina Infinium 15K array technology revealed informative SNP markers on chromosomes 5A, 6D and 1D associated with resistance to fungal diseases. The results of GWAS was confirmed by screening the wheat variety with the help of STS, SCAR and SSR markers linked with known resistance genes and recommended for use in MAS schemes. Association mapping, based on the results of durable phenotyping of wheat varieties on the productivity traits, identified 65 SNPs associated with traits grain number per ear, grain weight per ear, thousand grain weight, yield and number of productive tillers. Loci on chromosomes 1D, 2D, 5B and 6B are identified, showing significant associations with the phenotypic manifestation of the traits grain weight per ear, thousand grain weight and yield. Obtained results will be used for development specific markers for loci determining the productivity of common wheat. For the development of winter and spring wheat lines with resistance to fungal pathogens, schemes of marker-assisted selection (MAS) based on hybridization of spring donors of resistance genes with winter wheat cultivars have been developed. Selection of plants characterized by spring and winter habit and containing resistance genes was carried out using STS and SSR markers specific for target loci. The evaluation of the progenies selected by molecular markers on valuable traits showed the effectiveness of MAS-technologies for the creation in a short time of spring and winter wheat lines characterized by high level of resistance. The research was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 16-16-00011).

Эффективность применения биопрепарата Мегга-1 при выращивании овощных культур

Лисина Т.О., Круглов Ю.В.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: lisina-to@yandex.ru

Среди биологических средств, предназначенных для применения в практике сельского хозяйства, преимущество имеют биопрепараты на основе микроорганизмов, обладающих полифункциональным действием. Ранее нами был выделен штамм *Bacillus megaterium* 501GR, обладающий способностью разлагать ряд фосфорорганических инсектицидов и гербицидов, стимулировать рост сельскохозяйственных растений, проявлять антагонизм к некоторым видам микромицетов, солюбилизировать труднорастворимые фосфаты кальция. Учитывая полифункциональные свойства *B. megaterium* 501GR, на его основе разработан и запатентован способ получения гелевой формы биопрепарата МЕГА-1. В настоящей работе представлены результаты оценки эффективности применения препарата на посевах репы и белокочанной капусты в полевых опытах. Рассадку капусты выращивали на торфяном грунте в теплице. Показано, что обработка грунта биопрепаратом перед пикировкой рассады капусты снижает ее заболеваемость «черной ножкой» на 46%, причем, оздоравливающее действие препарата на рассаду превосходит широко используемый химический фунгицид фундазол. После высадки здоровой рассады и последующим ее выращиванием в поле продуктивность капусты, обработанной МЕГА-1, возросла более чем на 30%, что обусловлено как высоким качеством рассады, так и стимулирующим эффектом биопрепарата на растения. Отмечено, что обработка семян репы МЕГА-1 способствовала повышению их полевой всхожести и интенсивному росту растений. Соответственно, сформировался более высокий урожай репы, превышающий контрольный вариант в 1.5 раза. У корнеплодов контрольного варианта была выявлена сильная поврежденность личинками морковной мухи и проволочником, что обусловило более низкие урожай и качество продукции. В опытном варианте корнеплоды были крупнее и значительно менее поврежденные. Таким образом, испытания гелевой формы биопрепарата, созданного на основе *B. megaterium* 501 GR, (МЕГА-1) в полевых опытах показали высокую эффективность его применения на посевах капусты и репы. Ранее установлено, что МЕГА-1 оказывает положительное действие на рост, развитие и формирование урожая льна-долгунца и картофеля. Это позволяет сделать заключение о перспективах его использования для повышения качества и урожая ряда сельскохозяйственных культур.

Efficiency of the application of Mega-1 on vegetable crops

Lisina T.O., Kruglov Yu.V.

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia

Among biologic agents intended for application in agricultural practice, biopreparation of microorganisms possessing polyfunctional action have an advantage. Previously, we isolated the *Bacillus megaterium* 501GR strain, which has the ability to decompose a number of organophosphorous insecticides and herbicides, stimulate the growth of agricultural plants, display antagonism to certain types of micromycetes, solubilize hardly soluble calcium phosphates. Taking into account the multifunctional properties of *B. megaterium* 501 GR, a method of obtaining the gel form of the MEGA-1 biopreparation was developed and patented on its basis. In the present work results of an estimation of efficiency of application of a preparation on crops of turnip and white cabbage are presented in the conditions of field experiments. Seedlings of cabbage were grown on peat soil in a greenhouse. It has been demonstrated that soil treatment with biopreparation before replanting cabbage reduces the incidence of seedlings by "black leg" on 46%, and the health-improving effect of the preparation on seedlings exceeds the widely used chemical fungicide fundazol. After the planting of healthy seedlings and its subsequent cultivation in the field, the yield of cabbage treated with MEGA-1 increased by more than 30%, which is due to both the high quality of the seedlings and the stimulating effect of the biopreparation on the plants. After treatment of the turnip seeds by the MEGA-1, their higher germination and intensive plant growth were noted. Accordingly, a crop was higher the control variant to 1.5 times. In the rootcrops of the control variant, a strong damage was found by the carrot fly larvae and wireworm, which led to a lower yield and product quality. In the experimental variant the rootcrops were larger and significantly less damaged. Thus, estimation of the gel form of *B. megaterium* 501 GR the biopreparation (MEGA-1) in field experiments showed high efficiency of its application on cabbage and turnip crops. It was previously established that MEGA-1 shows a positive effect on the growth, development and the yield of flax and potato. This allows us to make a conclusion about the prospects of its use for improving the quality and yield of a number of agricultural crops.

Изучение антифунгальных свойств биопрепарата на основе *Pseudomonas aureofaciens*

Лукаткин А. А., Лукаткин А. С.

ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева», Саранск, Россия

E-mail: aslukatkin@yandex.ru

В отличие от химических средств защиты сельскохозяйственных растений, биопрепараты экологически безопасны, оказывают избирательное действие, не нарушают взаимосвязи между компонентами агроэкосистем и не вызывают резистентности у фитопатогенных микроорганизмов. Ризобактерии рода *Pseudomonas* – одна из наиболее эффективных групп микроорганизмов для биологического контроля почвенных фитопатогенов. В работе изучение влияние биопрепарата, созданного на основе послеспиртовой барды и бактерий *Pseudomonas aureofaciens*, на развитие фитопатогенных грибов *Botrytis cinerea* и *Fusarium culmorum*. Материалом служили бактерии *Ps. aureofaciens*, выращенные на жидкой фракции послеспиртовой барды в течение 24 ч, 10, 20 и 30 суток. Совместное культивирование бактерий и фитопатогенов проводили в чашках Петри на картофельной агаризованной среде при $25 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 16 суток. О микопаразитической активности исследуемых бактерий судили по диаметру колонии (измеряемому ежедневно) и структуре мицелия грибов. В качестве контроля использовали грибы, выращенные на среде без добавления биопрепарата. 1-суточный препарат не оказал существенного влияния на развитие гриба *F. culmorum*, полное зарастание чашек Петри наблюдали на 12-е сутки культивирования. Однако рост *B. cinerea* был более медленным на фоне биопрепарата, и к 9-м суткам роста развитие гриба прекратилось. Рост *F. culmorum* на среде с добавлением 10-суточного биопрепарата был несколько замедленным, структура мицелия была рыхлой, нитевидной. Через 9 суток культивирования рост *B. cinerea* практически прекратился, максимальный диаметр колоний составил 11 мм. Использование 20-суточного препарата также ингибировало рост грибов, особенно *B. cinerea*, диаметр колоний к концу периода наблюдений оставался таким же, как и на 7-е сутки роста (10 – 14 мм). При использовании 30-суточного препарата рост грибов сдерживался наиболее сильно, псевдомонады активно росли вокруг фитопатогенов небольшими круглыми колониями. Рост *F. culmorum* наблюдался в виде тонких гиф, стелящихся по поверхности среды. Диаметр колонии *B. cinerea* мало изменялся в ходе культивирования. Полученные результаты позволяют заключить, что как жизнеспособность клеток бактерий, так и антагонистическая активность *Ps. aureofaciens* по отношению к фитопатогенным грибам оставались на высоком уровне в ходе культивирования. Биопрепарат, созданный на основе этого вида, может быть использован для защиты культурных растений от патогенных грибов.

Study of antifungal properties of biopreparate created on the basis of *Pseudomonas aureofaciens*

Lukatkin A.A., Lukatkin A.S.

Mordovia State University, Saransk, Russia

Biological preparations, unlike chemicals for protecting agricultural plants, have a selective effect, do not disrupt the relationship between the components of agroecosystems and do not cause resistance in phytopathogenic microorganisms. Risobacteria of the genus *Pseudomonas* are one of the most effective groups of microorganisms for the biological control of soil phytopathogens. The effect of the biological preparation, created on the basis of the post-alcohol draff and bacteria *Pseudomonas aureofaciens*, on the development of phytopathogenic fungi *Botrytis cinerea* and *Fusarium culmorum* was studied. The stuff was the bacteria *Ps. aureofaciens*, grown on the liquid fraction of the post-alcohol draff for 24 hours, 10, 20 and 30 days. Co-cultivation of bacteria and phytopathogens was carried out in Petri dishes on potato agar medium at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ for 16 days. Mycopathic activity of bacterial preparation was estimated by the diameter of the colony (measured daily) and the structure of the fungal mycelium. As a control, fungi grown on a medium without biopreparation addition were used. The 1-day preparation had no significant effect on the development of fungus *F. culmorum*, complete overgrowth of Petri dishes was observed on the 12th day of cultivation. However, the growth of *B. cinerea* was slower on the biopreparation, and by the 9th day the fungus development ceased. The growth of *F. culmorum* on medium supplemented with a 10-day biopreparation was somewhat delayed, the mycelium structure was loose, filamentous. After 9 days of cultivation the growth of *B. cinerea* practically ceased, the maximum diameter of the colonies was 11 mm. The use of a 20-day preparation also inhibited fungal growth, especially *B. cinerea*, the colony diameter remained the same at the end of the observation period as on the 7th day of growth (10-14 mm). With the use of a 30-day preparation, the growth of fungi was suppressed most strongly; the pseudomonads actively grew around the phytopathogens as small round colonies. The growth of *F. culmorum* was observed in the form of thin hyphae, along the surface of the medium. The diameter of *B. cinerea* colony changed little during the cultivation. The results obtained allow us to conclude that both the viability of bacterial cells and the antagonistic activity of *Ps. aureofaciens* in relation to phytopathogenic fungi remained at a high level during the cultivation. Biopreparation created on the basis of this species, can be used to protect cultivated plants from pathogenic fungi.

Молекулярно-генетический анализ формирования нерегулярных меристем на примере опухолевого роста у растений

Лутова Л.А., Азарахш М., Ганчева М.С., Додуева И.Е., Лебедева М.А., Маловичко Ю.В., Правдина О.Ю., Самородова А.П., Творогова В.Е., Ткаченко А.А.

Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург

E-mail: krubaza@mail.ru

Растения, наряду с так называемыми регулярными меристемами, необходимыми для существования, при определенных условиях могут формировать нерегулярные меристемы. К последним относятся меристемы клубеньков и клубней, меристемоподобные структуры генетических и индуцированных опухолей, а также меристемы, формирующиеся в ходе регенерации. Растения контролируют возникновение и развитие меристем с помощью фитогормонов и широкого спектра транскрипционных факторов. Индуцированные опухоли и клубеньки возникают в результате взаимодействия с микроорганизмами, гены которых участвуют в регуляции как генов транскрипционных факторов, так и генов, контролирующих гормональный метаболизм. Гомеодомен-содержащие транскрипционные факторы из групп WOX и KNOX контролируют формирование регулярных меристем. Целью наших исследований является изучение роли этих транскрипционных факторов, а также фитогормонов, в формировании нерегулярных меристем. В частности, нами было показано, что транскрипционный фактор KNOX3 участвует в формировании клубеньков у *Medicago truncatula*, а также регулирует биосинтез цитокининов и их переход в активную форму. Для другого транскрипционного фактора, WOX5, мы показали участие в формировании различных нерегулярных меристем, формирующихся в корневой части растения: в клубеньках у *M. truncatula* и *Pisum sativum*, в агробактериальных опухолях у *P. sativum* и генетических опухолях у *Raphanus sativus*. Также нами были обнаружены гены из семейства WOX, участвующие в процессах регенерации. Было показано, что *MtWOX9-1* является стимулятором соматического эмбриогенеза у *M. truncatula*: сверхэкспрессия *MtWOX9-1* увеличивает число образующихся соматических эмбрионов в суспензионной культуре. Пептидные гормоны из группы CLE являются хорошо известными регуляторами работы генов WOX. Активируя или подавляя их транскрипцию по принципу обратной связи, они участвуют в системном контроле формирования нерегулярных меристем, в частности - заложения клубеньков. Согласно нашим данным, у *P. sativum* агробактериальные опухоли способны вмешиваться в регуляторную сеть системного контроля клубенькообразования и подавлять развитие клубеньков. Анализ экспрессии генов CLE в агробактериальных опухолях позволил предположить, что CLE-пептиды являются участниками взаимодействия между формирующимися опухолями и клубеньками. Полученные нами данные свидетельствуют об универсальности регуляции различных типов меристем у растений с помощью транскрипционных факторов KNOX и систем WOX-CLE.

Molecular and genetic analysis of irregular meristem formation through the example of tumor growth in plants

Lutova L.A., Azarakhsh M., Gancheva M.S., Dodueva I.E., Lebedeva M.A., Malovichko Y.V., Pravdina O.Y., Samorodova A.P., Tvorogova V.E., Tkachenko A.A.

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Along with so-called regular meristems, which are indispensable for life, plants are able to form irregular meristems in certain conditions. The latter include meristems of nodules and tubers, meristem-like structures in spontaneous and induced tumors, and also the meristems forming during regeneration processes. Plants regulate initiation and development of meristems using phytohormones and wide range of transcription factors. Induced tumors and nodules arise as a result of interaction with microorganisms, whose genes participate in the regulation of both plant transcription factor genes and genes, controlling plant hormonal metabolism. Homeodomain-containing transcription factors belonging to WOX and KNOX groups control formation of regular meristems. The goal of our research is the investigation of the roles of this transcription factors, as well as phytohormones, in the formation of irregular meristems. In particular, we have shown that KNOX3 transcription factor participates in nodule formation in *Medicago truncatula*, and also regulates cytokinin biosynthesis and activation. Another transcription factor, WOX5, was shown to take part in the formation of different irregular meristems, arising in the root part of plant: *M. truncatula* and *Pisum sativum* nodules, *P. sativum* agrobacterial tumors, *Raphanus sativus* genetic tumors. Also we've found some genes from WOX family, functioning in regeneration processes. In particular, *MtWOX9-1* was shown to stimulate somatic embryogenesis in *M. truncatula*: overexpression of *MtWOX9-1* increases the number of forming somatic embryos in suspension culture. Peptide hormones from CLE group are well-known regulators of WOX genes functioning. They activate or repress WOX genes transcription according to feedback loop principle and take part in systemic control of irregular meristem formation, for example – in nodule formation. According to our data, in *P. sativum*, agrobacterial tumors are able to interfere with regulatory network of nodule formation systemic control and to repress initiation of nodules. Analysis of CLE genes expression in agrobacterial tumors allowed us to suggest that CLE peptides participate in the interaction between forming tumors and nodules. Taken together, our results speak for universal regulation of different kinds of meristems in plants with transcription factors KNOX and WOX-CLE systems.

Геном за пределами ядра: пластом, его особенности и возможности использования в биотехнологии

Лысенко Е.А.

Институт физиологии растений РАН, Москва, Россия

E-mail: genlysenko@mail.ru

Характерной особенностью эукариотической клетки является её внутренняя подразделенность. Эукариотический геном, как правило, располагается в нескольких компартментах клетки. У растений одна из частей генома располагается в пластидах, там же находится и соответствующий аппарат для экспрессии этих генов. Считается, что во всех типах пластид геном одинаковый, а вот его реализация сильно различается и в основном изучена только для хлоропластов. В докладе будут рассмотрены особенности организации пластома растений и основные комплексы, обеспечивающие экспрессию генов. Будут изложены современные представления о транскрипции, сплайсинге, редактировании РНК и трансляции. Коротко будут описаны основные комплексы деградации белков в хлоропластах. Введение генов в пластом сопряжено с рядом трудностей и даёт ряд преимуществ для последующего использования. Интересными являются возможность введения генов в определенную позицию пластома, возможность введения и экспрессии нескольких генов в виде оперона, возможность параллельного введения гена-регулятора в ядро для более гибкой регуляции экспрессии целевого гена в хлоропластах. Эти возможности будут рассмотрены в докладе.

Genome outside a nucleus: Plastome, its features and application in biotechnology

Lysenko E.A.

Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia

The compartmentalization is a characteristic feature of eukaryotic cell. Eukaryotic genome is usually distributed over several compartments in cell. A part of plant genome is located in plastids; there is apparatus that provides gene expression inside plastids. We believe that plastids of all type contain the same genome; however, expression abilities are diverse and studied primarily for chloroplasts. The lecture will consider main features of plastome of plant species, and primary components of gene expression machinery. We will review contemporary knowledge of transcription, RNA splicing and editing, and translation in chloroplasts of plants. The major systems of protein degradation will be discussed shortly. New genes can be introduced into plastome that give some advantages for further utilization of such plants. Genes can be inserted precisely in a chosen site of plastome. Several genes can be introduced and expressed as one operon. A gene-regulator can be inserted in nucleus simultaneously for sophisticated regulation of target gene in plastome. All the possibilities will be reviewed.

Промоторы pro-SmAMP1 и pro-SmAMP2 из растения *Stellaria media* для генетической инженерии двудольных растений

Маджарова Н.В., Казакова К.А., Стрельникова С.Р., Бабаков А.В., Комахин Р.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии”, Москва, Россия

E-mail: komakhin@gmail.com

Ранее нами с коллегами было установлено, что в растениях мокрицы (*Stellaria media* L.) экспрессия генов антимикробных пептидов pro-SmAMP1 и pro-SmAMP2 находится на высоком уровне. Эти результаты заинтересовали нас в связи с возможностью обнаружения сильных и конститутивных промоторов для биотехнологии растений. Нуклеотидные последовательности промоторов pro-SmAMP1 (MF461278) и pro-SmAMP2 (KX196447) были клонированы. Коровая и примыкающая к ней проксимальная области до -455 п.н. относительно сайта инициации транскрипции (TSS) у обоих промоторов идентичны на 94 % и различаются точечными заменами или инсерциями/делециями. По мере удаления от TSS дополнительно к точечным добавляются более протяженные участки несоответствия, в том числе инсерции. Сравнительные результаты исследования эффективности промоторов были получены в различных видах культурных растений при транзientной экспрессии и в стабильных репортерных линиях. Эффективность различных делеционных вариантов промоторов оценивали по экспрессии репортерного гена *uidA* путем измерения активности его белкового продукта GUS. При транзientной экспрессии в растениях *Nicotiana benthamiana* (Domin) самый короткий делеционный вариант промотора pro-SmAMP1 (-119 п.н.) оказался в два раза сильнее, чем аналогичный по размеру промотор pro-SmAMP2 (-121 п.н.). Короткие делеционные варианты обоих промоторов при транзientной экспрессии в *N. benthamiana* (Domin) в 2-4 раза превосходили вирусный промотор CaMV35S, а в растениях рапса (*Brassica napus* L.) и сахарной свёклы (*Beta vulgaris* L.) были сопоставимы с ним. Функциональность промотора pro-SmAMP2 показана в каллусах растений льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.). В гомозиготных линиях трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) промоторы pro-SmAMP1 и pro-SmAMP2 в 2 раза сильнее, чем вирусный промотор CaMV35S. Короткие варианты обоих промоторов по эффективности контроля гена неомидинфосфотрансферазы II при селекции трансгенных растений табака и арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) на средах с антибиотиком канамицином в рекомендованных концентрациях не уступают дублированному вирусному промотору 2xCaMV35S. Короткие делеционные варианты промоторов pro-SmAMP1 и pro-SmAMP2 рекомендуются для использования в биотехнологии культурных растений в качестве сильных и конститутивных промоторов.

Promoters pro-SmAMP1 and pro-SmAMP2 from the weed *Stellaria media* for genetic engineering of dicots

Madzharova N.V., Kazakova K.A., Strelnikova S.R., Babakov A.V., Komakhin R.A.

All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

Earlier we with colleagues found that in chickweed (*Stellaria media* L.) plants the expression of pro-SmAMP1 and pro-SmAMP2 genes is high. These results interested us in connection with the possibility of finding strong and constitutive promoters for plant biotechnology. The nucleotide sequences of the pro-SmAMP1 (MF461278) and pro-SmAMP2 (KX196447) promoters were cloned. The core and adjacent proximal regions up to -455 bp relative to the transcription start site (TSS) are identical by 94 % in both promoters and differ by point replacements or insertions/deletions. As distance from the TSS grows, more extended non-compliance areas, including insertions, appear in addition to the point differences. The efficacies of the promoters were compared for various types of cultivated plants under transient expression and in stable transformants. The efficacies of various deletion promoter variants were evaluated through the expression of the reporter *uidA* gene by measuring the activity of its GUS protein product. In transient expression in *Nicotiana benthamiana* (Domin) plants, the shortest deletion variant of the pro-SmAMP1 promoter (-119 bp) was twice as strong as the pro-SmAMP2 (-121 bp) promoter. The short deletion variants of both promoters during transient expression in *N. benthamiana* were 2-4 times more effective than the CaMV35S promoter and in rape (*Brassica napus* L.) and sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants were comparable to it. The functionality of the pro-SmAMP2 promoter was shown in the calluses of flax (*Linum usitatissimum* L.) plants. In the homozygous lines of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants, the pro-SmAMP1 and pro-SmAMP2 promoters are twice as strong as the CaMV35S promoter. Short variants of both promoters are at least as effective as the duplicated CaMV35S promoter for neomycin phosphotransferase II gene control in the selection of transgenic tobacco and arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* L.) plants on media with antibiotic kanamycin at recommended concentrations. Short deletion variants of the pro-SmAMP1 and pro-SmAMP2 promoters are recommended for use in the biotechnology of cultivated plants as strong and constitutive promoters.

Липопептиды эндофитов и фитоиммунитет: перспективы практического использования

Максимов И.В., Черепанова Е.А.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

E-mail: maksimov@ufaras.ru

В сообщении обсуждаются механизмы регуляции иммунных процессов в растениях с участием стимулирующих рост растений эндофитных штаммов бактерий. Обсуждаются вопросы, связанные с развитием механизма прайминга в тканях растений подвергнутых предварительной обработке клетками эндофитных бактерий, заключающегося в сенсibilизации защитных систем растений и проявляющегося исключительно в присутствии вредного объекта. Особенности индуцированного запуска липопептидами эндофитных микроорганизмов защитной системы растений, в связке с противомикробным их воздействием, позволяют использовать активные штаммы для создания современных биопрепаратов для защиты растений от вредных организмов и стимулирования продуктивных свойств. Работа выполнена в рамках научного проекта РФФИ № 17-29-08014 (2018).

Lipopeptides of endophytes and phytoimmunity: prospects for practical use

Maksimov I.V., Cherepanova E.A.

Institute of Biochemistry and genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

In the report the mechanisms of regulation of immune processes in plants with participation of endophytic strains of the bacteria stimulating growth of plants are considered. The issues related to the development of the mechanism of priming in the tissues of plants subjected to pretreatment by cells of endophytic bacteria, consisting in sensitization of plant defense systems and manifested exclusively in the presence of pathogen or pest, are discussed. Features induced start of endophytes of plant defense system in conjunction with antimicrobial effects of lipopeptides, allow the use of active strains for advanced bio-products for protection of plants from pests and stimulate productive properties. The work is done in the framework of the project RFBR № 17-29-08014 (2018).

Элементы технологии массового разведения микроспоридии *Nosema pyrausta*

Мальш Ю.М., Игнатьева А.Н., Володарцева Ю.В., Токарев Ю.С.

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: malyshjm@mail.ru

Задача массового разведения микроспоридий высоко актуальна и имеет большую практическую значимость. Во всем мире целенаправленные исследования по культивированию микроспоридий как *in vivo*, так и *in vitro*, носят единичный характер. Разработка технологий массового разведения энтомопатогенных микроспоридий *in vivo* включает ряд важных моментов, таких как 1) поиск природных изолятов патогена; 2) подбор восприимчивых видов насекомых-хозяев и оценка их пригодности для разведения в лаборатории; 3) получение свободной от инфекций культуры целевых насекомых; 4) оптимизация условий заражения и содержания насекомых для получения максимального урожая спор; 5) тестирование инфекционности спор в зависимости от условий наработки и хранения.

Споры микроспоридии *Nosema pyrausta* (изолят Npyr1) из природной популяции типового хозяина, кукурузного мотылька *Ostrinia nubilalis* (Краснодарский край), были протестированы на *Ostrinia* spp., *Loxostege sticticalis*, *Galleria mellonella*, *Lymantria dispar*, *Aporia crataegi* и др. Гусеницы *L. sticticalis*, оказались наиболее восприимчивыми, погибая при низких дозировках в короткие сроки. Напротив, массовое развитие паразита в *G. mellonella* было возможно только на фоне иммуносупрессивного состояния, занимало длительный срок; заражённость не превышала 10 %. Пассирование через *G. mellonella* на протяжении трёх последовательных поколений не приводило к повышению инфекционности Npyr1 к данному хозяину. Протестированные виды чешуекрылых из других семейств также оказались непригодными для массового размножения *N. pyrausta*.

Наилучшие результаты получены на трёх видах стеблевых мотыльков рода *Ostrinia*. Культуры насекомых создавали на основе природного материала после проверки на отсутствие бакуловирусов, альфапротеобактерий и микроспоридий. Для заражения микроспоридиями опытным путём были подобраны дозировки 10^5 и 5×10^5 спор на гусеницу II и III возраста, соответственно. В серии экспериментов установлено, что температурный оптимум для массового размножения паразита совпадает с температурным оптимумом для развития насекомого-хозяина (+24 °C). В течение 12 месяцев споры сохраняют инфекционность в засушенных трупах насекомых при комнатной температуре, либо в виде охлаждённой водной суспензии, либо в замороженном виде в 50%-ном водном растворе глицерина. Исследование поддержано РФФИ, проект № 16-14-00005.

Technology elements of mass propagation of microsporidia *Nosema pyrausta*

Malysh Y.M., Ignatieva A.N., Volodartzeva Y.V., Tokarev Y.S.

All-Russian Institute of Plant Protection, St-Petersburg, Russia

Mass propagation of microsporidia is actual and practically important. The works devoted to microsporidia cultivation both *in vivo* and *in vitro* are scarce. Development of technologies for mass-scale production of insect pathogenic microsporidia *in vivo* include a series of important points, such as: 1) searching for natural isolates of the pathogen; 2) choosing vulnerable insect hosts and their evaluation for lab cultivation; 3) providing an infection-free culture of target insects; 4) optimizing conditions for infection and maintenance of insects to obtain maximal spore yield; 5) testing infectivity of spores depending upon storage conditions. Spores of microsporidium *Nosema pyrausta* (isolate Npyr1) from a natural population of corn borer *Ostrinia nubilalis* (Krasnodar Territory), were assayed against *Ostrinia* spp., *Loxostege sticticalis*, *Galleria mellonella*, *Lymantria dispar*, *Aporia crataegi* etc. *L. sticticalis* larvae were found the most susceptible, dying at low dosages during short time. In contrast, mass development of the parasite in *G. mellonella* was possible only in case of immunosuppression and took long time while infestation rate didn't exceed 10 %. Passing through *G. mellonella* for three consequent generations didn't cause any increase in infectivity of Npyr1 to this host. Lepidoptera species from other families assayed were also non-suitable for mass rearing of *N. pyrausta*.

Best results were obtained using three species of stem borer of the genus *Ostrinia*. Insect cultures were designed on the basis of natural material after checking for the absence of baculoviruses, alphaproteobacteria and microsporidia. For microsporidia infection, empirically chosen dosages of 10^5 and 5×10^5 spores per II and III instar larvae were used, respectively. In a series of experiments it was found that the temperature optimum for mass propagation of the parasite coincides with that for insect (+24 °C). Within 12 months infective spores can be stored in dry host cadavers at room temperature, as a refrigerated water suspension or frozen in 50 % water solution of glycerol. The research is supported by Russian Science Foundation, grant # № 16-14-00005.

Индукция морфогенеза *Galanthus woronowii* Losinsk. в условиях культуры *in vitro*

Малыаровская В.И., Самарина Л.С., Рахмангулов Р.С., Конинская Н.Г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур», Сочи, Россия

E-mail: malyarovskaya@yandex.ru

Исследование морфогенетических путей в культуре *in vitro* представляет особый интерес, так как отсутствие организменного контроля развития и использование регуляторов роста позволяет получить широкий спектр морфогенетических реакций, моделирующих процессы формообразования растений *in vivo*. В связи с этим целью исследований являлось изучение индукции морфогенеза *Galanthus woronowii* Losinsk. в условиях культуры *in vitro*.

На этапе инициации эксплантов *G. woronowii* использовали питательную среду МС дополненную регуляторами роста в различных концентрациях: 1-вариант (6-БАП 1,0 мг/л и ИМК 0,5 мг/л), 2-вариант (6-БАП 2,0 мг/л и НУК 1,0 мг/л), 3-вариант (ТДЗ 0,25 мг/л), 4-вариант (кинетин 0,5 мг/л) и контроль основа по прописи МС без регуляторов роста. Установлено, что добавление в питательную среду регуляторов роста индуцировало регенерацию в тканях чешуй *G. woronowii*, по сравнению с безгормональной средой. При этом наибольшая частота регенерации адвентивных микролуковичек (65,7 %) и среднего количества образовавшихся микролуковичек *de novo* (3,4 шт./экспл.) была на питательной среде содержащей 6-БАП и НУК в концентрации 2,0 и 1,0 мг/л, соответственно. Выявлено различие регенерационного потенциала чешуй в зависимости от их части (базальной, медиальной, апикальной). Активная регенерация отмечена в области донца, в базальной части чешуи, а наименьший регенерационный потенциал отмечен у чешуй взятых с верхней апикальной части луковички. Установлены различия по скорости морфогенеза в зависимости от типа и концентрации регуляторов роста в питательной среде. Так, наиболее раннее изменение поверхности сегмента чешуи *G. woronowii* в виде выпячивания бугорков, отмечено на питательной среде с содержанием 6-БАП и ИМК (1,0 и 0,5 мг/л, соответственно) на 23-25 день, в сравнении с контрольной безгормональной средой (65-70 день). На этапе инициации культуры *in vitro*, на 1 и 2-ом вариантах питательных сред, регенерация адвентивных микролуковичек проходила по пути прямого органогенеза. В тоже время, развитие каллусной ткани и ризогенеза отмечали на средах содержащих такие регуляторы роста, как ТДЗ и кинетин в концентрации 0,25 и 0,5 мг/л, соответственно. Частота морфогенного каллуса составляла 27,8 и 31,2 %. Таким образом, использование в питательной среде экзогенных регуляторов роста на этапе инициации культуры *in vitro* *G. woronowii* сопровождалось увеличением активности морфогенеза, в сравнении с контрольной безгормональной средой.

Morphogenesis induction of *Galanthus woronowii* Losinsk. under *in vitro* conditons

Malyarovskaya V.I., Samarina L.S., Rakhmangulov R.S., Koninskaya N.G.

Federal State Budgetary Scientific Institution "Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops", Sochi, Russia

The study of morphogenetic pathways under *in vitro* conditions is of particular interest, since the absence of developmental control at organism level and the use of growth regulators allows obtaining a wide range of morphogenetic pathways which can be a model of plant development *in vivo*. Therefore, the aim of present study was to investigate the induction of morphogenesis of *Galanthus woronowii* Losinsk. under *in vitro* conditions. At the stage of tissue culture initiation of *G. woronowii* explants, MS nutrient medium supplemented with growth regulators of various concentrations was used: 1-treatment (6-BAP 1.0 mg / L and IBA 0.5 mg / L), 2-treatment (6-BAP 2.0 mg / l and NAA 1.0 mg / l), 3-treatment (0.25 mg / l TDZ), 4-treatment (kinetin 0.5 mg / l) and control basal media MS without growth regulators. It has been established that addition of growth regulators to the medium enhances regeneration of *G. woronowii* bulb scales in comparison with the control medium without plant growth regulators. The highest frequency of morphogenesis of adventitious microbulbs (65.7%) and the average number of microbulbs *de novo* (3.4 units / explant) formed was on a nutrient medium containing 6-BAP and NAA in a concentration of 2.0 and 1.0 mg / l, respectively. Regeneration potential of scales was depended on their part (basal, medial, apical). Better regeneration was observed from the basal part of the scales, and the low regeneration capacity was observed in the scales taken from the upper apical part of the bulb. Differences in morphogenesis rate were established depending on the type and concentration of growth regulators in the nutrient medium. Thus, the earliest change in the surface of the explant of *G. woronowii* scales in the form of protrusions of tubercles was observed on a nutrient medium containing 6-BAP and IBA (1.0 and 0.5 mg / L, respectively) on 23-25 day, compared to control medium (65-70 days). At the *in vitro* culture initiation stage, on the 1st and 2nd Treatments of nutrient media, the regeneration of adventitious microbulbs proceeded along the path of a direct organogenesis. Moreover, the development of callus tissue and rhizogenesis was obtained on media containing TDZ and kinetin in a concentration of 0.25 and 0.5 mg / L, respectively. The frequency of the morphogenic callus was 27.8 and 31.2%. To conclude, the use of exogenous growth regulators in the nutrient medium at the initiation stage for *G. woronowii* *in vitro* culture was accompanied by an increase in the activity of morphogenesis, in comparison with the control medium without growth regulators.

Ростовая и морфогенетическая способность каллусных клеток пшеницы и проявление инфицированности при селекции на жаростойкость.

Мамедова М.Г., Карагезов Т.Г., Алисой Ф.А.

Институт молекулярной биологии и биотехнологии НАНА, Баку, Азербайджан

E-mail: gamira2010@mail.ru

Самоклональная вариабельность, в основе которой лежат механизмы генетической и эпигенетической изменчивости растений *in vitro* составляет основу технологий клеточной селекции *in vitro*. Несмотря на очевидный прогресс по клеточной селекции различных культур, и в частности, пшеницы, разработке теоретических основ каллусообразования, эмбриогенеза, морфогенеза в культуре злаков, установлению факторов, определяющих успех нетрадиционных подходов для увеличения полезных, наследуемых вариаций *in vitro* при селективном отборе, еще остаются нерешенные проблемы, связанные с резким снижением пролиферации клеточных культур после стрессорного воздействия абиотических факторов, и потерей способности к регенерации.

Целью настоящего исследования явилось изучение отдельных схем отбора термоустойчивых клеточных линий пшеницы. Исходным материалом служили незрелые зародыши 6-ти сортов мягкой и твердой пшеницы. Каллусную ткань получали на среде MS, с добавлением 2мг/л 2,4Д. Каллус культивировался при температуре 25-26°C. Пересадку осуществляли каждые 4 недели, субкультивировали только морфогенный каллус. Клеточную селекцию проводили после 2-го пассажа по двум схемам. 1 - воздействие повышенной температурой 45°C в течение 20-60 мин. После прогревания экспланты помещали на свежую питательную среду, и культивировали в стандартных условиях. По 2-схеме каллус культивировали в течение 2 пассажей при температуре 36-37°C. Стрессорные воздействия в обоих случаях значительно снижали интенсивность ростовых процессов, что коррелировало с длительностью тепловой обработки по схеме-1 и снижением морфогенного потенциала, различно проявляющимся у твердых и мягких сортов.

У двух сортов культивируемых по 2-ой схеме, после перенесения в стандартные условия происходили значительные морфологические изменения каллусных клеток, а также резкое снижение морфогенного потенциала. Отмечалась гибель 30% штаммов. В 4-ом пассаже у оставшихся штаммов обнаружено проявление ранее скрытой эндофитной инфекции. Бактериальная контаминация увеличивалась с числом пассажей и обнаруживалась еще у двух сортов, которые характеризовались наименьшей морфогенной способностью. Таким образом, бактериальные микроорганизмы, ассоциированные с изолированными тканями растений, в культуре *in vitro* негативно влияют на процессы морфогенеза, и этот факт следует учитывать при исследованиях по клеточной селекции.

Growth and morphogenetic ability of wheat callus cells and manifestation of infection in selection for heat resistance.

Mamedova M.G., Garagozov T.G., Alisoy F.A.

Institute of Molecular Biology and Biotechnology ANAS. Baku, Azerbaijan

Samoclonal variability, which is based on mechanisms of genetic and epigenetic variability of plants *in vitro*, forms the basis of *in vitro* cell selection technologies. Despite the obvious progress in the cell selection of different cultures, and wheat in particular, the development of the theoretical foundations of callus formation, embryogenesis, morphogenesis in cereal culture, the establishment of factors determining the success of non-traditional approaches for increasing useful, inherited *in vitro* variations in selective selection, there are still unsolved problems associated with a sharp decrease in the proliferation of cell cultures after the stressful effects of abiotic factors and the loss of ability to regenerate. The purpose of this study was to study individual schemes for selecting heat-resistant wheat cell lines. The starting material was immature embryos of 6 varieties of soft and hard wheat. Callus tissue was prepared on MS medium with addition of 2 mg / L of 2,4D. Callus was cultivated at a temperature of 25-26°C. The transplant was performed every 4 weeks, only the morphogenic callus was subcultured. Cell selection was carried out after 2 passages according to two schemes. Scheme-1 - exposure to an elevated temperature of 45°C for 20-60 minutes. After warming up, the explants were placed on a fresh nutrient medium, and cultured under standard conditions. Under the scheme-2, the callus was cultivated for 2 passages at a temperature of 36- 37°C. Stress effects in both cases significantly reduced the intensity of growth processes that correlated with the duration of heat treatment under scheme-1 and a decrease in the morphogenic potential, which is manifested differently in hard and soft varieties. In two varieties cultivated according to the second scheme, after transferring to standard conditions, significant morphological changes of callus cells occurred, as well as a sharp decrease in the morphogenic potential. The death of 30% of the strains was noted. In the fourth passage, the manifestation of a previously latent endophytic infection was detected in the remaining strains. Endophytic pathogens were mainly observed on the surface, and in the thick of callus cells. Transplantation of infected callus cells to the hormone-free medium changed the morphology of unidentified pathogens. Bacterial contamination increased with the number of passages and was found in two more varieties, which were characterized by the least morphogenic ability. Thus, bacterial microorganisms associated with isolated plant tissues in culture *in vitro* negatively affect the processes of morphogenesis, and this fact should be taken into account in studies on cell selection.

Изучение анатомо-морфологической структуры каллусной ткани *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. и *Eleuterococcus senticosus* Maxim. полученной в культуре *in vitro*

Марамохин Э.В., Зонтиков Д.Н., Малахова К.В.

Костромской государственной университет, Кострома, Россия

E-mail: maramokhin91@mail.ru

Изучение каллусных тканей в практической биотехнологии занимает одно из ведущих мест по получению БАВ. Культуры клеток *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. и *Eleuterococcus senticosus* Maxim могут служить возобновляемым источником ценных вторичных метаболитов, однако до настоящего времени известны лишь единичные примеры их коммерческого применения. Объектом исследования - различные виды каллусных тканей, полученные из маточных растений *S. chinensis* и *E. senticosus*. Каллусогенез у *S. chinensis* был индуцирован из части листовой пластинки, междоузлия микропобега, а также из нижней части маточного культивируемого побега. Из нижней части микропобега был получен каллус *E. senticosus*. Для получения каллусных тканей применялся метод культивирования *in vitro* на различных типах питательных сред. Для стимуляции каллусогенеза у *S. chinensis*, ткани пассивировали на питательную среду MS и QL, а для *E. senticosus* использовалась среда MS. Обе эти среды содержали мезоинозит в концентрации 100 мг/л, глицина - 2 мг/л, тиамина - 0.5 мг/л, пиридоксина - 0.5 мг/л, сахарозы - 20 мг/л, агара - 5.0 мг/л. В качестве регуляторов роста в среде QL применялся 6-БАП - 1.0 мг/л и ИМК - 0.1 мг/л. В среде MS - ТДЗ - 0.1 мг/л. После 30-35 дней культивирования, производилась морфологическая и анатомическая оценка каллуса. У *S. chinensis* получено три типа каллусных тканей из разных частей растения, отличающихся по окраске, рыхлости, морфогенности, наличию почек геммогенеза. Каллусная ткань из междоузлия *S. chinensis* оказалась наиболее перспективной для культивирования с целью получения БАВ и в частности схизандрина. Эта ткань была рыхлой и неморфогенной, имела бледно-зеленую окраску, на питательной среде росла произвольно, при длительном культивировании распадалась. При анатомическом изучении были обнаружены почки геммогенеза - путь для соматического эмбриоидогенеза. Рыхлость ткани позволяет выращивать её в промышленных масштабах с использованием биореакторов. У *E. senticosus* получен каллус бледно-желтого цвета, представляющий из себя конгломерат рыхлой ткани быстро погибающей при культивировании. При анатомическом исследовании почек геммогенеза обнаружено не было. В целом исследования каллуса изучаемых растений выявили значительную вариабельность в расположении, размере, наличии очагов некроза, цвете у клеток каллуса, полученного из разных частей культивируемого растения. При этом удалось подобрать каллус, как для промышленной биотехнологии так и для получения соматических эмбрионидов.

Study of anatomo-morphological structure of callus tissue *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Eleuterococcus senticosus* Maxim. obtained in *in vitro* culture

Maramokhin E.V., Zontikov D.N., Malakhova K.V.

Kostroma State University, Kostroma, Russia

The study of callus tissues in practical biotechnology is one of the leading places in the production of BAS. Cell cultures *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. and *Eleuterococcus senticosus* Maxim can serve as a renewable source of valuable secondary metabolites, but so far only a few examples of their commercial use have been known. The object of the study is various kinds of callus tissues obtained from the uterine plants of *S. chinensis* and *E. senticosus*. Callusogenesis in *S. chinensis* was induced from a part of the leaf blade, the interstice of the microscope, and also from the lower part of the mother cultivated shoot. The callus *E. senticosus* was obtained from the lower part of the microscope. For the production of callus tissues, the *in vitro* cultivation method was used on various types of nutrient media. To stimulate callusogenesis in *S. chinensis*, the tissues were passivated on the nutrient medium MS and QL, and for *E. senticosus*, MS medium was used. Both these media contained mesoinositol at a concentration of 100 mg / l, glycine 2 mg / l, thiamine 0.5 mg / l, pyridoxine 0.5 mg / l, sucrose 20 mg / l, agar 5.0 mg / l. As growth regulators in the QL medium, 6-BAP-1.0 mg / l and IMA-0.1 mg / l were used. In the environment of MS - TDZ - 0.1 mg / l. After 30-35 days of cultivation, a morphological and anatomical evaluation of the callus was performed. *S. chinensis* obtained three types of callus tissues from different parts of the plant, differing in color, friability, morphogenicity, and the presence of gemmogenesis kidneys. Callus tissue from the interstitial site of *S. chinensis* was the most promising for cultivation for the production of BAS and, in particular, schisandrane. This tissue was loose and non-morphogenic, had a pale green color, grew arbitrarily on the nutrient medium, disintegrated with prolonged cultivation. In the anatomical study, kidney gemmogenesis was discovered - a pathway for somatic embryoidogenesis. The looseness of the tissue allows it to be grown on an industrial scale using bioreactors. In *E. senticosus* a callus of pale yellow color is obtained, which is a conglomeration of loose tissue that quickly perishes during cultivation. In an anatomical study of the kidneys, gemmogenesis was not detected. In general, callus studies of the studied plants revealed significant variability in the location, size, presence of necrosis foci, color in callus cells obtained from different parts of the cultivated plant. At the same time, it was possible to select callus, both for industrial biotechnology and for obtaining somatic embryoids.

Растительно-микробные ассоциации как источник бактерий, перспективных для биотехнологического использования

Маркова Ю.А., Беловежец Л.А., Третьякова М.С., Турская А.Л., Быбин В.А., Макарова Л.Е.
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия
Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Иркутск, Россия
E-mail: juliam06@mail.ru

Растения являются источником микроорганизмов, которые могут быть полезны для использования в составе микробиологических препаратов для биоремедиации почв, увеличения урожайности или борьбы с фитопатогенами. К числу наиболее распространённых загрязнителей окружающей среды относятся нефть и нефтепродукты. Для очистки от загрязнённых нефтью и её продуктами территорий в последнее время все больше внимания уделяется разработке биопрепаратов на основе углеводородокисляющих микроорганизмов, состоящих из различных штаммов, способных окислять углеводороды нефти. Преимуществами этого метода является экономичность, экологическая безопасность, отсутствие вторичных загрязнений. Ассоциации микроорганизмов способны гораздо эффективнее разлагать нефть, чем индивидуальные штаммы. Это связано, прежде всего, с разнообразием ферментов, вырабатываемых каждым микроорганизмом, что приводит к более полному разрушению сложных химических структур, составляющих нефть. Целью настоящей работы явилось изучение активности аборигенных углеводородокисляющих микроорганизмов, а также изучение деструктирующей активности подобранных ассоциаций (консорциумов) микроорганизмов. Объектами исследования стали штаммы микроорганизмов, выделенные из ризосферы и эндосферы растений, произрастающих на нефтезагрязненной территории Иркутского региона. Полученные микроорганизмы были проверены на способность разлагать сырую нефть. Для этого штаммы выращивали в жидкой минеральной среде с нефтью в качестве единственного источника углерода. Деструкция нефти за 2 месяца культивирования, составила от 11 до 28 %. Для изучения биодеградационных свойств консорциума микроорганизмов, были подобраны различные по видовому составу композиции. Установлено, что убыль нефти при применении ассоциаций микроорганизмов через 2 месяца культивирования была на уровне 25-30 %, исходная концентрация нефти в питательной среде также составляла 10 %. Наилучшей нефтеструктурирующей активностью обладали совместно культивируемые штаммы р. *Acinetobacter*. Таким образом, в результате лабораторных экспериментов проверены аборигенные углеводородокисляющие микроорганизмы, а также созданные ассоциации бактерий на способность разлагать нефть в жидкой минеральной среде. Деградация нефти при использовании инди-видуальных штаммов составила 11-28%, а при внесении в питательную среду ассоциаций микроорганизмов до 32 %, что подтверждает тезис о том, что при совместном использовании микроорганизмов степень деградации нефти усиливается.

Plant-microbial associations as a source of bacteria, promising for bio-technological use

Markova Yu. A., Belovezets L.A., Tretyakova M.S., Turskaya A.L., Bybin V.A., Makarova L.E.
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Irkutsk, Russia

Irkutsk Institute of Chemistry of A.E. Favorsky, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

Plants are a source of microorganisms that can be useful for use in microbiological preparations for bioremediation of soils, increasing productivity or phytopathogens controlling. Among the most common pollutants of the environment are oil and oil products. More and more attention to the development of biological preparations based on hydrocarbon oxidizing microorganisms, consisting of various strains capable of oxidizing hydrocarbons of oil has recently been paid for the purification of areas contaminated with oil and its products. Advantages of this method are economy, ecological safety, absence of secondary pollution. Associations of microorganisms are capable of much more efficient decomposition of oil than individual strains. This is due, first of all, to the variety of enzymes produced by each microorganism, which leads to a more complete destruction of the complex chemical structures that make up oil. The purpose of this work was to study the activity of aboriginal hydrocarbon oxidizing microorganisms, as well as to study the destructive activity of selected associations (consortia) of microorganisms. The objects of research were strains of microorganisms isolated from the rhizosphere and endosphere of plants growing in the oil-polluted territory of the Irkutsk region. The microorganisms obtained were tested for the ability to decompose crude oil. For this, the strains were grown in a liquid mineral medium with oil as the sole carbon source. The destruction of oil for 2 months of cultivation was from 11 to 28%. To study the biodegradation properties of a consortium of microorganisms various compositions were selected according to the composition of the species. It was established that the oil loss at application of microorganisms associations after 2 months of cultivation was at the level of 25-30%, the initial concentration of oil in the nutrient medium was also 10%. The best oil-destructive activity was shared by cultivated strains of genus *Acinetobacter*. Thus, as a result of laboratory experiments, aboriginal hydrocarbon oxidizing microorganisms were tested, as well as created associations of bacteria for the ability to decompose oil in a liquid mineral environment. Oil degradation with the use of individual strains was 11-28%, and when the association of microorganisms is introduced into the nutrient medium, up to 32%, which confirms the thesis that the degree of oil degradation increases with the joint use of microorganisms.

Характеристика новых штаммов клубеньковых бактерий, супрессирующих мутации в поздних симбиотических генах гороха посевного (*P. sativum*)

^{1,2}Масликова Т.И., ²Афонин А.М., ²Сулима А.С., ²Жуков В.А., ^{1,2}Тихонович И.А.

¹Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

²ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

E-mail: kosha44@yandex.ru

Недостаток азота – один из основных лимитирующих факторов развития растений. Дополнительными поставщиками азота для бобовых растений служат симбиотические клубеньки, образованные азотфиксирующими бактериями из группы ризобий. Развитие клубеньков контролируется генетической программой растения и зависит от особенностей штамма бактерий. Клубеньки, не способные к фиксации азота (по причине мутации в симбиотическом гене растения или из-за несовместимости штамма, попавшего в клубенек, с данным растением), подвергаются раннему старению и отмирают. В исключительных случаях некоторые штаммы ризобий способны образовывать клубеньки, успешно фиксирующие азот, на корнях мутантных растений, таким образом супрессируя мутации. Мутанты Р61 и Р63 гороха посевного (*Pisum sativum* L.), несущие мутации в генах *Sym25* и *Sym26*, при взаимодействии со многими известными штаммами клубеньковых бактерий образуют неэффективные (Fix–, т.е. не фиксирующие азот), преждевременно стареющие клубеньки. Более 20 лет назад были обнаружены штаммы, способные супрессировать эти мутации, вследствие чего на корнях растений образовывались эффективные клубеньки, однако в дальнейшем эти штаммы были утрачены. Целью настоящей работы является поиск новых штаммов бактерий, способных супрессировать мутации в поздних симбиотических генах *Sym25* и *Sym26* у линий гороха посевного Р61 и Р63, и их генетическая характеристика. Растения линий Р61 и Р63 выращивали в течение месяца в нестерильных условиях в трёх различных почвах из Ленинградской области, в результате чего на корнях у них образовались белые (неэффективные) и красные (эффективные) клубеньки. Из клубеньков были выделены бактериальные изоляты, которыми в аксеничных условиях (стерильные вегетационные микробоксы) повторно инокулировали растения тех же линий. Из образовавшихся наиболее крупных эффективных клубеньков были выделены в чистую культуру отдельные штаммы (9 для Р61, и 14 для Р63), способные к супрессии мутаций в генах *Sym25* и *Sym26*. В настоящее время проведено секвенирование геномов трёх супрессорных штаммов, результаты которого будут обсуждены в докладе. Наличие в геномах определенных детерминант, способствующих проявлению супрессорного фенотипа, позволит сделать вывод о механизмах, посредством которых бактерии расширяют круг растений-хозяев, преодолевая генетически обусловленные «блоки» со стороны растения. Работа поддержана грантами РФФ 17-76-30016 и 16-16-00118 и грантом РФФИ 18-34-00844.

Characteristic of new strains of nodule bacteria suppressing mutations in the late symbiotic genes of pea (*P. sativum*)

^{1,2}Maslikova T.I., ²Afonin A.M., ²Sulima A.S., ²Zhukov V.A., ^{1,2}Tikhonovich I.A.

¹Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

²All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Pushkin, Russia

Lack of nitrogen is one of the main limiting factors in plant development. Additional nitrogen suppliers for legumes are symbiotic nodules formed by nitrogen-fixing bacteria from the group of rhizobia. The development of nodules is controlled by the genetic program of the plant and depends on the characteristics of the bacterial strain. Nodules that are not capable of fixing nitrogen (due to a mutation in the symbiotic plant gene or because of the incompatibility of the strain that has permeated the nodule with this plant) are exposed to early senescence and die off. In exceptional cases, some strains of rhizobia are able to form nodules that successfully fix nitrogen on the roots of mutant plants, thus suppressing their mutations. *Pisum sativum* L. mutants P61 and P63, carrying mutations in the *Sym25* and *Sym26* genes, form ineffective (Fix-, i.e. non-fixing), prematurely aging nodules when interacting with many known strains of nodule bacteria. More than 20 years ago, strains were found capable of suppressing these mutations and forming the effective nodules, but later these strains were lost. The aim of this work is to search for new strains of bacteria that can suppress mutations in the late symbiotic genes *Sym25* and *Sym26* in the lines P61 and P63, and to conduct their genetic characteristic. Plants of lines P61 and P63 were grown for a month under non-sterile conditions in three different soils from the Leningrad Oblast, which resulted in forming of white (ineffective) and red (effective) nodules on their roots. Bacteria isolated from these nodules were then used for the repeated inoculation of plants of the same lines in sterile microboxes. From the largest effective nodules formed in microboxes, the bacterial strains capable of suppressing mutations in the *Sym25* and *Sym26* genes were isolated in axenic cultures (9 for P61 and 14 for P63). To date, sequencing of the genomes of the three suppressor strains has been carried out, the results of which will be discussed in the report. The presence of certain determinants contributing to the manifestation of the suppressing phenotype in the genomes of these strains will lead to a conclusion about the mechanisms helping bacteria expand the range of host plants by overcoming genetically-caused "blocks" from the plant side. This work was supported by the Russian Science Foundation (grants # 16-16-00118 and # 17-76-30016) and Russian Foundation for Basic Research (grant # 18-34-00844 mol_a).

Устойчивость микроорганизмов к белому фосфору¹Миндубаев А.З., ¹Волошина А.Д., ²Бабынин Э.В.¹ИОФХ им. А.Е. Арбузова, Казань, Россия²Казанский федеральный университет, Казань, Россия*E-mail: mindubaev-az@yandex.ru*

Белый фосфор P4 является одним из самых опасных загрязнителей окружающей среды. Тем не менее, он применяется в промышленности и в военных целях, поэтому не исключается попадание данного вещества в окружающую среду. Следовательно, требуются методы детоксикации данного вещества, в том числе биологические.

Нами впервые произведены посеы микроорганизма (плесневого гриба из рода *Aspergillus*) в культуральную среду, содержащую белый фосфор в качестве единственного источника фосфора. В данной среде микроорганизм рос и не испытывал фосфорное голодание. То есть окислял белый фосфор до фосфата, необходимого для жизнедеятельности! Аспергилл растет в среде с содержанием белого фосфора до 1%. Это превышение ПДК в сточных водах в 5000 раз! Это первый в мире пример включения белого фосфора в биосферный круговорот элемента фосфора.

Мы идентифицировали данный микроорганизм, как новый штамм *A. niger*. Ему мы присвоили номер *A. niger* AM1. Нуклеотидная последовательность штамма опубликована в базе данных GenBank, где ей присвоен номер KT805426.

Resistance of microorganisms to white phosphorus¹Mindubaev A.Z., ¹Voloshina A.D., ²Babynin E.V.¹A.Z. Arbuzov IOPC, Kazan, Russia²Kazan Federal University, Kazan, Russia

White phosphorus P4 is one of the most dangerous pollutants of the environment. Nevertheless, it is used in industry and for military purposes, so it cannot be ruled out that this substance is exposed to the environment. Consequently, methods of detoxifying P4 are needed, including biological means.

For the first time, we have successfully cultured microbes (mold fungus of the genus *Aspergillus*) in a medium containing P4 as the sole source of phosphorus. In this novel medium, the microorganism grew and did not experience phosphorous starvation. That is, the fungus oxidized white phosphorus to phosphate, which is a primary necessity for life! *Aspergillus* grows in a medium with white phosphorus concentration of up to 1%. This exceeds the TLC of P4 in wastewater by about 5000 times! Across the Globe, this is the first example regarding the inclusion of white phosphorus into the biospheric cycle of elemental phosphorus.

We identified this microorganism as a new strain of *A. niger*. The strain was designated as *A. niger* AM1. The nucleotide sequence of the strain is published in the GenBank database, where it is assigned the number KT805426.

Изучение динамики роста и антагонистической активности культуральной жидкости штамма *Bacillus subtilis* 1K в периодическом гомогенном глубинном культивировании

Минлигареева Е.В.

ООО "НВП "БашИнком", Уфа, Россия

E-mail: saimonnord@yandex.ru

В настоящее время основным средством повышения урожая сельскохозяйственной продукции является использование химических средств защиты растений от болезней и вредителей. Однако возрастающее загрязнение окружающей среды, рост заболеваний животных и человека, рост наследственных и онко-заболеваний, требуют незамедлительного снижения их применения. Наиболее перспективным направлением в разработке экологически безопасных средств защиты растений является использование биологических препаратов, действующим началом которых являются живые бактерии, выделенные из эндотканей здоровых растений и обладающие высокой антагонистической активностью к фитопатогенным грибам и бактериям. Использование препаратов из «полезных» эндофитных бактерий совершенно безопасно для окружающей среды. Штамм *Bacillus subtilis* 1K выделен из здорового растения пшеницы в Уфимском районе, непатогенен, не вирулентен, обладает широким спектром антагонистической активности к патогенным бактериям и грибам, вызывающих заболевания растений: *Fusarium avenaceum*, *Alternaria alternate*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis aclada* F-81, *Penicillium lividum*.

Депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (VKPM) ФГУП Гос. НИИ Генетика, г.Москва под № В-11353 23.11.2012. Целью нашего исследования являлась отработка условий культивирования штамма *Bacillus subtilis* 1K на синтетической питательной среде с добавлением белковых компонентов В качестве белковых компонентов использовали пептон, казеин, соевую муку, гидролизат рыбной муки, порошки ламинарии, свеклы, капусты, топинамбура. На протяжении всего процесса культивирования брались почасовые пробы культуральной жидкости, определялся титр КОЕ, антагонистическая активность биомассы в отношении фитопатогенных грибов методом «лунок» и фитопатогенных бактерий – методом штриха. По завершению культивирования отбирали арбитражные пробы, которые в дальнейшем анализировали на стабильность титра, антагонистическую активность и проводили оценку биологической эффективности полученного продукта на способность подавлять фитопатогены и ростстимулирующую активность на проростках пшеницы методом рулонов (ГОСТ 12044-93) Наилучший результат получен на солевой питательной среде с добавлением казеина и дрожжевого экстракта в качестве ростстимулирующей добавки.

The study of growth dynamics and antagonistic activity of the culture *Bacillus subtilis* 1K strain in periodic homogeneous deep cultivation

Minligareyeva E.V.

ООО "NVP" BashInkom", Ufa, Russia

Presently, chemical preparations protecting plants from diseases and pests are the main means to increase the yield of agricultural products. However, the increasing pollution of the environment, growing number of animal and human diseases, including hereditary and oncological diseases, require an immediate reduction in their use. The most promising direction in the development of environmentally safe plant protection products is the use of biological preparations, the active principle of which is living bacteria recovered from endo-tissues of healthy plants with high antagonistic activity to phytopathogenic fungi and bacteria. The use of preparations with "beneficial" endophytic bacteria is absolutely safe for the environment. The *Bacillus subtilis* 1K strain is recovered from a healthy wheat plant in the Ufimsky region, it is non-pathogenic, not virulent and it has a wide spectrum of antagonistic activity against pathogenic bacteria and fungi that cause plant diseases: *Fusarium avenaceum*, *Alternaria alternate*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis aclada* F-81, *Penicillium lividum*. It was deposited under No. B-11353 on 23.11.2012 in Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) in FGUP (Federal State Unitary Enterprise) State Research Institute Genetika, Moscow. To obtain a biopreparation it is necessary to obtain a highly effective strain and develop a technology for its cultivation to maximize CFU biomass titer and the level of antagonistic activity. The purpose of our research was to adjust the cultivation conditions of the *Bacillus subtilis* 1K strain on a synthetic nutrient medium with protein components. Peptone, casein, soy flour, fish oil hydrolysate and powders of laminaria, beets, cabbage, Jerusalem artichoke were used as protein components. Throughout the whole cultivation process samples of the culture liquid were taken hourly to define the CFU titer and antagonistic activity of biomass against phytopathogenic fungi by the volume displacement method and phytopathogenic bacteria - by the streak planting method. When the cultivation was completed, official samples were selected, which were further analyzed for titer stability, antagonistic activity, and the product was evaluated for the biological effectiveness to suppress phytopathogens and for growth stimulating activity on wheat sprouts by the roll method (GOST 12044-93) The best result was obtained from a salt nutrient medium with casein and yeast extract as a growth-stimulating additive.

Мобилизация фосфора ризосферными бактериями

Миннебаев Л.Ф.

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

E-mail: linar00711@gmail.com

Важным элементом биосферы является фосфор. По своему влиянию на развитие растений он занимает второе место после азота. Большие количества фосфора входят в состав почвенных минералов и недоступны или слабо доступны для растений. Многие микроорганизмы способны переводить такие соединения в растворимые формы.

Исследования по способности мобилизации фосфора ризосферными бактериями проводили в условиях модельного эксперимента на песке (рН 7.44). Песок массой 2 кг поместили в вегетационные сосуды и увлажняли до 60% от полной влагоемкости. В сосуд помещали дренаж, добавляли 0,5 % навеску Ca₃(PO₄)₂ от массы грунта и 100 мл питательной среды с содержанием сахарозы 20 г/л. В опытные варианты вносили инокулят в количестве 50 мл, в контрольный вариант - 50 мл стерильной воды.

Для обработки грунта использовали жидкую культуру штаммов микроорганизмов стимулирующих рост растений. Бактерии культивировали на питательной среде, среде 40 и на среде Кинг В в колбах Эрленмейера (250 мл) со 100 мл среды, на качалке при 180 об/мин в течение 72 ч, при температуре 28 °С, *Paenibacillus ehimensis* ИБ-739 – при 35 °С. Титр инокулята и среда культивирования для различных штаммов: *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 – 3×10⁹ КОЕ/мл, среда 40; *Paenibacillus ehimensis* ИБ-739 – 8,7×10⁸ КОЕ/мл, среда питательная; *Pseudomonas* sp. ИБ-182 – 2,3×10⁹ КОЕ/мл, среда Кинг В; *Pseudomonas* sp. ИБ-56 – 1,2×10⁹ КОЕ/мл, среда Кинг В; *Pseudomonas* sp. ИБ-17-1.4×10⁹ КОЕ/мл, среда Кинг В; *Bacillus mucilaginosus* – 8,2×10⁸ КОЕ/мл, среда питательная; *Bacillus subtilis* 26Д – 1,3×10⁹ КОЕ/мл, среда питательная.

Результаты эксперимента выявили положительную активность исследуемых ризосферных бактерий. При начальной концентрации подвижного фосфора 9,1 мг/кг конечные результаты за 12 недель получились следующие: контроль 25 мг/кг, *Bacillus mucilaginosus* 57 мг/кг, *Bacillus subtilis* 26Д 40,3 мг/кг, *Pseudomonas putida* ИБ-17 37,2 мг/кг, *Pseudomonas aerofaciens* ИБ-51 41,2 мг/кг, *Pseudomonas aerofaciens* ИБ-56 39,5 мг/кг, *Pseudomonas* sp. ИБ -182 45,1 мг/кг, *Paenibacillus ehimensis* ИБ-739 30,6 мг/кг, *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 38,7 мг/кг.

Phosphorus mobilization by rhizosphere bacteria

Minnebaev L.F.

Ufa Institute of Biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

An important element of the biosphere is phosphorus. In its influence on the development of plants, it occupies the second place after nitrogen. Large quantities of phosphorus are part of soil minerals and are inaccessible or poorly accessible to plants. Many microorganisms are able to convert such compounds into soluble forms.

Studies on the ability of phosphorus mobilization by rhizosphere bacteria were carried out under the conditions of a model experiment on sand (pH 7.44). Sand weighing 2 kg was placed in the vegetation vessels and moistened to 60% of the total moisture capacity. A drainage was placed in the vessel, 0.5% of the sample of Ca₃(PO₄)₂ was added to the ground mass and 100 ml of nutrient medium with a sucrose content of 20 g / l. In experimental versions, inoculum was added in an amount of 50 ml, in the control variant - 50 ml of sterile water.

To process the soil, a liquid culture of strains of microorganisms stimulating plant growth was used. Bacteria were cultured on nutrient medium, medium 40 and on King B medium in Erlenmeyer flasks (250 ml) with 100 ml of medium, on a shaker at 180 rpm for 72 hours, at a temperature of 28 °С, *Paenibacillus ehimensis* ИБ-739 at 35 °С. Inoculum titer and culture medium for various strains: *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 - 3 × 10⁹ CFU / ml, medium 40; *Paenibacillus ehimensis* ИБ-739 - 8.7 × 10⁸ cfu / ml, nutrient medium; *Pseudomonas* sp. ИБ-182 2.3 × 10⁹ cfu / ml, medium King B; *Pseudomonas* sp. ИБ-56 - 1.2 × 10⁹ cfu / ml, medium King B; *Pseudomonas* sp. ИБ-17-1.4 × 10⁹ CFU / ml, medium King B; *Bacillus mucilaginosus* - 8.2 × 10⁸ cfu / ml, the medium is nutritious; *Bacillus subtilis* 26D - 1.3 × 10⁹ cfu / ml, the medium is nutritious.

The experimental results revealed a positive activity of the investigated rhizosphere bacteria. At the initial concentration of mobile phosphorus 9.1 mg / kg, the final results for 12 weeks were the following: control 25 mg / kg, *Bacillus mucilaginosus* 57 mg / kg, *Bacillus subtilis* 26D 40.3 mg / kg, *Pseudomonas putida* ИБ-17 37.2 mg / kg, *Pseudomonas aerofaciens* ИБ-51 41.2 mg / kg, *Pseudomonas aerofaciens* ИБ-56 39.5 mg / kg, *Pseudomonas* sp. ИБ-182 45.1 mg / kg, *Paenibacillus ehimensis* ИБ-739 30.6 mg / kg, *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 38.7 mg / kg.

Биодеградация ароматических соединений - возможная причина влияния *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* на состав этих соединений в корневых экссудатах растений гороха (*Pisum sativum* L.)

Мориц А.С., Макарова Л.Е., Гончарова А.М.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия

E-mail: makarova@sifibr.irk.ru; aconitkaaco@gmail.com

Известна способность бактерий подвергать деструкции ароматические соединения до нециклических кислот, используемых ими далее в общем обмене своих клеток. Представители родов *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* также могут катаболизировать фенольные соединения, включая флавоноидные индукторы экспрессии nod-генов. В составе ароматической фракции в корневых экссудатах бобовых растений наряду с фенольными соединениями, регулируемыми началом симбиотических взаимодействий с микросимбиотом (хемотаксис, активация ризобияльных nod-генов), присутствуют ароматические компоненты негативного действия, вероятно, способствующие селекции состава микробиомы в ризосфере растения-хозяина. В число таких компонентов у бобовых растений могут входить N-фенил-2-нафтиламин и фталаты, обнаруженные нами ранее у этих растительных культур. Целью настоящего исследования было установление возможности катаболизма N-фенил-2-нафтиламина в клетках микросимбионта гороха - *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Для этого исследовали состав ароматических соединений в полученных при помощи этилацетата экстрактах из ростовой среды и из разрушенных бактерий, росших в жидкой минимальной среде в присутствии N-фенил-2-нафтиламина. Полученные результаты указывают на способность ризобий катаболизировать N-фенил-2-нафтиламин по фталатному пути. Однако для данного соединения этот путь не имеет завершения с образованием протокатеховой кислоты и расщеплением ее до муконатов. Подтверждением этого могут служить результаты определения активности одного из ключевых ферментов, участвующих в расщеплении протокатеховой кислоты до 6-карбокси-цис-цис- муконата: протокатехоат-3,4-диоксигеназы, активность которого нами не выявлена в бактериях, росших на N-фенил-2-нафтиламин. Полученные результаты указывают на возможное участие ризобий в поддержании общего уровня фталатов в составе корневых экссудатов наряду с растением-хозяином. По-видимому, это участие осуществляется посредством деструкции N-фенил-2-нафтиламина.

Исследования проведены при частичной поддержке гранта РФФИ, проект № 18-34-00295 мол_а.

Biodegradation of aromatic compounds is a possible cause of the influence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* on the composition of these compounds in the root exudates of pea plants (*Pisum sativum* L.)

Morits A.S., Makarova L.E., Goncharova A.M.

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

The ability of bacteria to decompose aromatic compounds to non-cyclic acids, used by them further in the general exchange of their cells, is known. Representatives of the genera *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* can also catabolize phenolic compounds, including flavonoid inducers of nod gene expression. As part of the aromatic fraction in the root exudates of leguminous plants together with phenolic compounds that regulate the beginning symbiotic interactions microsymbiotants (chemotaxis, activation *Rhizobium* nod-gene), present aromatic components negative action is likely to promote selection microbiome composition in the rhizosphere of the plant host. Among such components, legumes can include N-phenyl-2-naphthylamine and phthalates, which we detected earlier in these plant cultures. The purpose of this study was to establish the possibility of catabolism of N-phenyl-2-naphthylamine in the cells of the pea microsymbiote - *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. For this purpose, the composition of the aromatic compounds in ethyl acetate-derived extracts from the growth medium and from destroyed bacteria growing in a liquid minimal medium in the presence of N-phenyl-2-naphthylamine was investigated. The obtained results indicate the ability of rhizobia to catabolize N-phenyl-2-naphthylamine by phthalate pathway. However, for a given compound, this pathway does not end with the formation of protocatechic acid and its cleavage into muconates. Proof of this can serve for determining the activity of one of the key enzymes involved in the cleavage of protocatechic acid and β -carboxy-cis, cis-muconate: protocatechuate 3,4-dioxygenase, which contact the activity was not detected in bacteria grown on N-phenyl-2-naphthylamine. The results indicate a possible involvement of rhizobia in maintaining the overall level of phthalates in the composition of the root exudates along with the plant host. Apparently, this participation is carried out by the destruction of N-phenyl-2-naphthylamine. This work was partially supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 18-34-00295 мол_а).

Разработка препаратов для биоконверсии (утилизации) жиродержащих стоков

Морозов В.Н.

ООО "НВП "БашИнком", Уфа, Россия

E-mail: saimonnord@yandex.ru

В настоящее время разработка новых препаратов на основе микроорганизмов, обладающих липолитической активностью, обусловлена непрерывным ростом объемов мясомолочной, пищевой и других отраслей промышленности. Увеличение объема хозяйственно-бытовых и промышленных стоков, поступающих на очистные сооружения, которые, ввиду отсутствия средств на их модернизацию, не справляются с необходимыми уровнями очистки и являются источником загрязнения водных объектов.

Традиционно для локальной очистки жиродержащих сточных вод используют механические, химические и физико-химические методы (отстойники, жируловители, с использованием коагулянтов, с последующей механической очисткой). В настоящее время исследователями разных стран мира все больше внимания уделяется биологической очистке жиродержащих сточных вод, так как данный метод имеет ряд преимуществ: широкий спектр удаляемых органических и неорганических соединений, в том числе токсичных; отсутствие вторичного загрязнения воды, что снижает экологическую нагрузку на водоемы; наличие действующего компонента биологической очистки - самовоспроизводящегося активного ила.

Вместе с тем для эффективного функционирования сооружений биологической очистки необходимо строгое соблюдение технологических параметров, таких как температура, значение pH сточной воды, наличие биогенных элементов, концентрация растворенного кислорода в сооружениях аэробной очистки. Все это делает актуальным постоянный поиск активных микроорганизмов-деструкторов жиров и технологичных форм препаратов на их основе, которые работали бы в более широком диапазоне технологических параметров и обеспечивали при этом высокую биоконверсию.

В свете вышеизложенного разработано несколько вариантов препаратов, в состав которых входят ферменты различной природы, штаммы бацилл (*Bacillus subtilis*, *Bacillus lichiniiformis*) с активными липазами, а также дрожжи с повышенной липолитической активностью. Новые препаративные формы (жидкая, твердая, гелевая, порошковая) дают ряд преимуществ, таких как: защита действующих начал препарата от резких колебаний параметров среды; дополнительная функция солубилизации жиров; сглаживание колебаний кислотности среды; увеличение срока хранения.

Разработано несколько эффективных схем обработки жировых стоков для предприятий общепита и мясо-молочного направления. Данные технологии позволяют снизить капитальные затраты предприятий на обслуживание систем сточных коммуникаций и значительно снизить выброс загрязняющих природу веществ.

Development of preparations for bioconversion (utilization) of grease-containing waste waters

Morozov V.N.

ООО "NVP" BashInkom" Ufa, Russia

Nowadays, the development of new preparations based on microorganisms with lipolytic activity is conditioned by a steady growth of meat and dairy, food and other industries. An increased volume of utility and industrial waste waters incoming to waste treatment facilities, which due to lack of funds for modernization are not capable of treating water properly and within the norm, results in water pollution.

Traditionally, in order to treat greasy waste waters locally mechanical, chemical and physics-chemical methods are applied (sewage water tanks, grease traps using coagulating agents with further mechanical treatment). Currently, researches from different countries worldwide are paying more and more attention to biological greasy water treatment as this method has a number of advantages: a wide range of organic and inorganic compounds disposal including toxic ones; prevention from secondary water pollution which decreases environmental pressure on reservoirs; presence of active components for biological treatment – self-reproducing activated sludge.

Together with that, effective operation of biological treatment facilities requires strict compliance with technological parameters such as temperature, value of pH of waste water, presence of biogenic elements, dissolved oxygen level in aerobic treatment facilities. The abovementioned make it essential to constantly search for active microorganisms destroying fats and technological forms of preparations based on them which could be applied in a wider range of technological parameters and along with that would provide with high bioconversion.

Of all the aforesaid, several variants of preparations have been created which include ferments of different nature, bacilli strains (*Bacillus subtilis*, *Bacillus lichiniiformis*) with active lipases, as well as yeasts with increased lipolytic activity. New preparation forms (liquid, solid, gel, powder) provide with a number of advantages such as protection of the active agents of the preparation against abrupt fluctuations in environmental parameters; additional function of solubilization of fats; smoothing of fluctuations in the acidity of the medium; increase in shelf life.

For public catering facilities and meat-dairy industries several effective schemes for grease wastewater treatment were worked out. This technology enables to reduce general costs on the maintenance of sewage water systems and significantly decrease emission of pollutants into the environment.

Микробные сообщества кишечника личинок *Acanthocinus aedilis* (Cerambycidae)

Мохаммед В.Ш., Зиганшина Э.Э., Булынина С.С., Зиганшин А.М.
Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия
E-mail: waleed.shaapan@yahoo.com

Личинки жуков семейства Cerambycidae (Усачи) в основном развиваются в деревьях (питаются здоровыми или мертвыми тканями растений) и также могут нанести ущерб лесным насаждениям. Насекомые-ксилофаги продуцируют необходимые ферменты для расщепления ряда компонентов древесного материала самостоятельно. Дополнительно часть древесной биомассы может быть подвержена деструкции в результате активности их кишечного микробиома.

В данном исследовании всесторонне были исследованы личинки вида жуков *Acanthocinus aedilis* (Серый длинноусый усач), питающиеся древесными компонентами. Морфологическая идентификация личинок жука была подтверждена секвенированием гена субъединицы I цитохром с-оксидазы (COI). Далее тотальная ДНК из семи образцов кишечника личинок экстрагировалась с помощью набора для выделения ДНК FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, США) согласно инструкциям производителя. Ген бактериальной 16S рРНК амплифицировали методом ПЦР с тотальной ДНК, используя пару универсальных праймеров. Высокопроизводительное секвенирование фрагментов гена 16S рРНК было выполнено с помощью системы MiSeq (Illumina, США). После секвенирования, все прочтения обрабатывались и анализировались с использованием программы QIIME (версия 1.9.1). Всего было получено более 700 тысяч ридов высокого качества. Различные представители бактериального семейства Enterobacteriaceae были обнаружены в значительном количестве во всех образцах кишечника личинок *A. aedilis*; однако бактериальное сообщество всех личинок различалось. В состав микробного сообщества дополнительно входили члены Streptococcaceae и Streptophyta, а также и другие представители (в зависимости от индивидуальной личинки). Выявленные микробные сообщества потенциально могут быть использованы в различных биотехнологиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации в рамках научного проекта МД-100.2017.4.

Microbial communities of intestinal larvae of *Acanthocinus aedilis* (Cerambycidae)

Mohammed W.S., Ziganshina E.E., Bulynina S.S., Ziganshin A.M.
Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

The larvae of the beetles of the family Cerambycidae mainly develop in trees (they feed on healthy or dead plant tissues) and may also damage forest plantations. Xylophagous insects produce the necessary enzymes for the cleavage of some components of wood material themselves. Also, a part of woody biomass can be prone to destruction as a result of the activity of their intestinal microbiome. In this study, larvae of the *Acanthocinus aedilis* species, feeding on wood components, were comprehensively investigated. Morphological identification of beetles larvae was confirmed by sequencing the gene of the subunit I with cytochrome c-oxidase (COI). Next, total DNA from seven larval gut samples was extracted using the FastDNA SPIN Kit for Soil DNA Extraction Kit (MP Biomedicals, USA) according to the manufacturer's instructions. The bacterial 16S rRNA gene was amplified by PCR with total DNA using a pair of universal primers. High-performance sequencing of fragments of the 16S rRNA gene was performed using the MiSeq system (Illumina, USA). After sequencing, all reads were processed and analyzed using QIIME (version 1.9.1). In total, more than 700,000 of high-quality reads were obtained. Various representatives of the bacterial family Enterobacteriaceae were found in a significant number of all specimens of *A. aedilis* larvae; However, the bacterial community of all larvae was different. The microbial community also included members of Streptococcaceae and Streptophyta, as well as other representatives (depending on the individual larva). Identified microbial communities can potentially be used in various biotechnologies. This work was supported by the Council for Grants of the President of the Russian Federation in the framework of the scientific project MD-100.2017.4.

Анализ коровых и аксессуарных маркерных локусов у хозяйственно-ценных штаммов – симбионтов люцерны

Мунтян В.С., Черкасова М.Е., Саксаганская А.С., Румянцева М.Л.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин-8, Россия

E-mail: mroumiantseva@yandex.ru

В современном мире экологически чистые биопрепараты на основе бактерий приобретают всё большее популярность. Для производства биопрепаратов первостепенную важность имеет отбор хозяйственно-ценных (ХЦ) штаммов, обладающих повышенной конкурентоспособностью и симбиотической эффективностью в условиях региона применения, что приводит к экономически значимому повышению продуктивности растений-хозяев. В традиционной практике поиск ХЦ штаммов клубеньковых бактерий, проводят по результатам трудозатратных многолетних вегетационных и полевых опытов. Для этого оценивают влияние штаммов на биометрические (высота растений, развитие корневой системы и т.д.), биохимические (содержание азота) и симбиотрофные (зеленая масса) показатели растений. Далее к таким штаммам применяли методы поддерживающей селекции. Указанные выше характеристики подчас являлись единственными «маркерами» отобранных штаммов. Нередко со временем прибавки от инокуляции ХЦ штаммами могли снижаться. Причиной снижения эффективности штаммов, согласно современным представлениям симбиогенетики, могло быть то, что гены, детерминирующие симбиотические свойства являющиеся потенциально нестабильными, поскольку локализованы, как правило, на плазмидных репликациях. Согласно анализу баз данных референс-штаммов разных видов клубеньковых бактерий, нами выявлены группы генов, имеющих приоритетное хозяйственно-ценное значение для молекулярного скрининга и поддерживающей селекции перспективных для практики штаммов. Искомые маркерные последовательности (МП) локализованы на разных репликациях и относятся к разным функционально-значимым группам. Данные «маркерные» последовательности могут быть использованы для оценки стабильности наследования хозяйственно-ценных характеристик и многокомпонентного генома клубеньковых бактерий. Согласно данным сопряженного анализа комбинации аллельных типов маркерных последовательностей, например, генов, вовлеченных в контроль эффективности, конкурентоспособности, стрессоустойчивости, а также маркерных генов хромосомы и/или геномных островов, выполненных нами в результате анализа 400 природных симбиотически активных штаммов *Sinorhizobium meliloti*, выявлен набор молекулярно-генетических маркеров, анализ которых методом ПЦР позволяет проводить паспортизацию ХЦ штаммов клубеньковых бактерий и оценивать их генетическую стабильность, а следовательно гарантировать генетическую устойчивость штаммов, используемых для приготовления биопрепаратов. Исследования поддержаны грантом ФНЦП № 14.607.21.178.

Analysis of the core and accessory marker loci in economically valuable strains - alfalfa inoculants

Muntyan V.S., Cherkasova M.E., Saksaganskaia A.S., Roumiantseva M.L.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Pushkin-8, Russia

In the modern world, environmentally friendly biologics based on bacteria are becoming increasingly popular. For the production of biopreparations, selection of economically valuable (EV) strains having increased competitiveness and symbiotic efficacy in the conditions of the particular region of application is of primary importance, which leads to an economically significant increase in the productivity of host plants. In traditional practice, the search for EV strains of nodule bacteria is carried out according to the results of labor-intensive plant-tests and long-standing field experiments. For this purpose, the influence of strains on biometric (plant height, development of the root system, etc.), biochemical (nitrogen content) and symbiotrophic (green mass) plant parameters are evaluated. Further, supportive selection methods were applied to such strains. The above characteristics were sometimes the only "markers" of selected strains. Often over time, the increments from inoculation of EV strains could be reduced. The reason for the decrease in the effectiveness of strains, according to modern symbiogenetic concepts, could be that genes that determine symbiotic properties are potentially unstable, since they are localized, as a rule, on plasmid replicons. According to the analysis of databases of reference strains of different species of rhizobia, we have identified groups of genes that have priority economically valuable value for molecular screening and supports selection of promising strains for practice. The desired marker sequences (MPs) are localized on different replicons and belong to different functionally important groups. These "marker" sequences can be used to assess the stability of the inheritance of EV parameters and the multicomponent genome composition stability of nodule bacteria. By the linked analysis of the allelic types of marker genes combinations, for example, genes involved in the control of efficacy, competitiveness, stress resistance, and marker genes of chromosome and / or genomic islands, done by us through the analysis of 400 native symbiotically active strains of *S. meliloti*, a set of molecular-genetic markers was designed. The express PCR analysis of those set of markers allows to carry out the certification of EV strains of rhizobia and consequently guarantee the genetic stability of the strains used for the preparation of biological products. The studies are supported by the grant of the FNCP "State support of integration of higher education and fundamental science" No. 14.607.21.178.

Оценка генетического разнообразия природных популяций *Melilotus* spp. на территориях, подвергшихся техногенному и антропогенному воздействию

¹Мунтян А.Н., ¹Мунтян В.С., ²Антонова Е.В., ¹Румянцева М.Л.

¹ФГБНУ ВНИИСХМ, г. Санкт-Петербург-Пушкин, Россия

²ИЭРиЖ УрО РАН, Екатеринбург, Россия

E-mail: allmuntyan@gmail.com

В представленной работе оценено генетическое разнообразие природных популяций донников, относящихся к трем диплоидным видам *Melilotus officinalis* (L.) Pall. (2n=16), *Melilotus albus* Medic. (2n = 16, 24, 36) и *Melilotus dentatus* (Waldst. et Kit.) Pers. (2n=16), произрастающим в 4-х географически удаленных регионах. Первый регион является частью территории первичного центра разнообразия донников, относящегося к Переднеазиатскому центру происхождения культурных растений (популяция СКГ). Второй регион расположен на севере Казахстана, подвергнувшись вторичному засолению и примыкающему к Среднеазиатскому центру происхождения культурных растений (популяция ПАГ). Третий регион – агроценозы Ленинградской области Северо-Западного экономического района РФ (популяция АЦ). Четвертый изученный регион – территория в Свердловской области, вблизи заброшенного вольфрамового рудника (популяция ВУРС). В первом регионе произрастали представители видов *Melilotus officinalis* (L.) Pall. и *Melilotus dentatus* (Waldst. et Kit.) Pers., во втором - *Melilotus dentatus* (Waldst. et Kit.) Pers., в третьем - *Melilotus officinalis* (L.) Pall. и *Melilotus albus* Medic., в четвертом - *Melilotus officinalis* (L.) Pall. и *Melilotus albus* Medic. Оценку генетического разнообразия 140 генотипов растений проводили с помощью адаптированного для данного объекта метода RAPD (англ. Random Amplified Polymorphic DNA). Выявлено 14 различных RAPD-генотипов. Установлено, что по выявленным RAPD-генотипам наиболее разнообразными были популяции донников из СКГ и ПАГ, представленные 9 и 7 RAPD-генотипами, тогда как численность RAPD-генотипов в популяциях из АЦ и ВУРС была вдвое ниже. Установлено, что все изучаемые популяции растений достоверно различались по распределению RAPD-генотипов (величина χ^2 составила: наибольшая $\chi^2 = 40,48$, при $P=2,96 \cdot 10^{-5}$ при сравнении популяций ПАГ/СКГ; наименьшее значение $\chi^2 = 45,549$, при $P=9,22 \cdot 10^{-9}$ – для АЦ/ВУРС). В результате впервые проведенной оценки уровня внутривидовой и популяционной изменчивости генотипов донников показано, что уровень генетической изменчивости изученных растений был выше в популяциях из генцентров бобовых растений. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ 17-04-02011 и РНФ 17-16-01095.

Assessment of the genetic diversity of indigenous *Melilotus* spp. populations on the territories affected by technological disaster and by anthropogenic impact

¹Muntyan A.N., ¹Muntyan V.S., ²Antonova E.V., ¹Roumiantseva M.L.

¹ARRIAM, Saint-Petersburg-Pushkin, Russia

²Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia

The genetic diversity of the indigenous sweet clover populations belonging to the three diploid species such as *Melilotus officinalis* (L.) Pall. (2n = 16), *Melilotus albus* Medic. (2n = 16, 24, 36) and *Melilotus dentatus* (Waldst. Et Kit.) Pers. (2n = 16), grown up in 4 geographically faraway regions were evaluated by us. The first region is part of the territory of the primary center of the sweet clover diversity, belonging to the North Caucasian gene center (the NCG population). The second region is located in the north part of Kazakhstan, which has undergone secondary salinization and adjacent to the Central Asian center of the origin of cultivated plants (the PAG population). The third region is agroecosystems of the Leningrad Region of the North-West Economic Region of the Russian Federation (the AC population). The fourth studied region is the territory in the Sverdlovsk Region, near the abandoned tungsten mine (the EURT population). Representatives of the species *Melilotus officinalis* (L.) Pall and *Melilotus dentatus* (Waldst. et Kit.) Pers. grew in the first region, in the second they were *Melilotus dentatus* (Waldst. et Kit.) Pers., in the third they were *Melilotus officinalis* (L.) Pall. and *Melilotus albus* Medic., and in the fourth they were *Melilotus officinalis* (L.) Pall. and *Melilotus albus* Medic. Estimation of genetic diversity of 140 plant genotypes was carried out using the RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) method adapted for this object. There were 14 different RAPD genotypes. It was found that the most diverse according to the RAPD genotypes identified were sweet clover populations from the NCG and PAG, represented by 9 and 7 RAPD genotypes, while the number of RAPD genotypes in the populations from the AC and the EURT were two times lower. It was established that all the studied indigenous sweet clover populations significantly differed in the distribution of RAPD genotypes (the value of χ^2 was: the largest $\chi^2 = 40.48$, with $P = 2.96 \cdot 10^{-5}$ when comparing the populations of PAG / NCG, the smallest value of $\chi^2 = 45.549$, with $P = 9.22 \cdot 10^{-9}$ - for the AC / EURT). As a result of the first assessment of the level of intraspecific and population variability of the sweet clover genotypes, it was shown that the level of genetic variability of the studied plants was higher in populations from the centers of leguminous plants. The work was supported by RFBR 17-04-02011 and RSF 17-16-01095.

Анализ структуры хромосом клубеньковых бактерий рода *Sinorhizobium* spp.

Мунтян В.С., Черкасова М.Е., Румянцева М.Л.
ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург-Пушкин, Россия
E-mail: vucovar@yandex.ru

Геном клубеньковых бактерий рода *Sinorhizobium* spp. является мультипартитным то есть, состоящим из нескольких частей. Геном, как правило, включает в себя кольцевые хромосомы и различное количество плазмид, значительно различающихся по размеру. Нами проведен анализ геномов 9 штаммов клубеньковых бактерий видов *Sinorhizobium meliloti*, *S.medicae*, *S.arboris* и *S.fredii*, выделенных из клубеньков растений, собранных в географически различных регионах (Германия, Италия, Франция, Казахстан, Австралия, Алжир, Судан, Амурская область РФ). Целью исследования был поиск нуклеотидных последовательностей, которые могут являться потенциальными сайтами гомологической рекомбинации, что в конечном результате может приводить к встройкам или делециям протяженных последовательностей в структуру хромосомы, и соответственно обуславливать изменения в структуре и размерах геномов. В работе были применены следующие методы: сравнительная геномная гибридизация (CGH) общей ДНК с биочипами SM6kOligo/SM14kOligo, сконструированными на основе полногеномных данных референсного штамма *S.meliloti* Rm1021, полногеномное секвенирование и сравнение нуклеотидных последовательностей, а также методы сравнительной компьютерной геномики и on-line ресурсы (Islander, Artemis, Rhizogate, Emma, Rast). Установлено, что размеры хромосом указанных штаммов варьировали от 3.65 до 3.91 млн.п.н., при том, что гибридизационное сходство хромосом штаммов *S.meliloti* с хромосомой референс-штамма достигало 96.0-99.3% (по данным CGH).

Показано, что рибосомальные опероны клубеньковых бактерий рода *Sinorhizobium* локализованы в консервативных областях хромосом штаммов. Выявлено, что не детектируемые гены достоверно чаще локализованы в геномных островах ризобий, на которые также приходится основная разница в размере и структуре хромосом штаммов. Всего выявлено не менее 12 типов структурных точек возможного встраивания островов. Таким образом, в хромосомах клубеньковых бактерий рода *Sinorhizobium* локализованы горячие точки рекомбинации и маркеры консервативных областей, что можно использовать для мониторинга изменений внутривидовой структурной организации геномов хозяйственно-значимых бактерий.

Работа поддержана грантами РФФИ 18-04-01278, РФФИ 17-16-01095.

Analysis of the genus *Sinorhizobium* spp nodule bacteria chromosome structure

Muntyan V.S., Cherkasova M.E., Roumiantseva M.L.
ARRIAM, Saint-Petersburg-Pushkin, Russia

The genome of nodule bacteria of the genus *Sinorhizobium* spp. is multipartite, that is, consisting of several parts. The genome, as a rule, includes ring chromosomes and a different number of plasmids, which differ significantly in size. We analyzed genomes of the 9-th genomes of referens strains belonging to species: *Sinorhizobium meliloti*, *S.medicae*, *S.arboris* and *S.fredii*. Those strains were isolated from plant nodules collected in geographically different regions (Germany, Italy, France, Kazakhstan, Australia, Algeria, Sudan, Amurskaya region of the Russian Federation). The aim of the study was to search nucleotide sequences that can be potential sites for homologous recombination, which in the end result can lead to insertions or deletions of extended sequences into the structure of the chromosome, and, accordingly, cause changes in the structure and size of the genomes. The following methods were applied in the work: comparative genomic hybridization (CGH) of the total DNA with SM6kOligo / SM14kOligo biochips, constructed on the basis of the genome data of the reference strain *S.meliloti* Rm1021, full genomic sequencing and comparison of nucleotide sequences, as well as comparative computer genomics and on-line methods resources (Islander, Artemis, Rhizogate, Emma, Rast). It was established that the chromosome sizes of the strains was varied greatly from 3.65 to 3.91 million bp, while the hybridization similarity of chromosomes of strains of *S. meliloti* with the chromosome of the reference strain reached 96.0-99.3% (according to CGH).

It is shown that ribosomal operons of nodule bacteria of the genus *Sinorhizobium* are localized in the conservative regions of the chromosomes of the strains. It was revealed that non-detectable genes are significantly more often localized in the genomic islands of rhizobia, which also account for the main difference in the size and structure of the chromosomes of the strains. In total, no less than 12 types of structural points of possible embedding of islands were identified. Thus, in the chromosomes of nodule bacteria of the genus *Sinorhizobium*, recombination hot spots and markers of the conservative regions are localized, which can be used to monitor changes in the intraspecific structural organization of the genomes of economically significant bacteria.

The work is supported by grants from RFBR 18-04-01278, RSF 17-16-01095.

Влияние *Azospirillum brasilense* на аккумуляцию кадмия и активность антиоксидантных ферментов растений *Sorghum bicolor*

Муратова А.Ю., Любунь Е.В., Сунгурцева И.Ю.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

E-mail: amuratova@yahoo.com

Тяжелые металлы являются одними из наиболее опасных загрязнителей окружающей среды, отличающиеся длительным периодом полураспада, кумулятивным действием и выраженной токсичностью для живых организмов. Способность растений аккумулировать тяжелые металлы ограничивает использование загрязненных территорий для выращивания сельскохозяйственных культур, с одной стороны, но с другой, дает возможность для разработки зеленой технологии очистки земель от этих поллютантов. Поэтому исследование взаимодействия тяжелых металлов с растениями является актуальным, как с точки зрения защиты растений, так и с точки зрения разработки приемов фиторемедиации загрязненных земель. На накопление тяжелых металлов в растениях могут оказывать влияние стимулирующие их рост ризобактерии (PGPR). Учитывая это, целью наших исследований являлась оценка аккумуляции кадмия (II) и динамики активности ферментов антиоксидантной защиты (ФАЭ) у растений сорго веничного (*Sorghum bicolor* L. (Moench)) в условиях хронического кадмиевого стресса (20 мкмоль/кг) и в присутствии устойчивого к кадмию PGPR штамма *Azospirillum brasilense* Cd.

Установлено, что бактериализация растений штаммом *A. brasilense* Cd стимулировала рост корней и повышала фитоекстрагирующую способность сорго, увеличивая содержание кадмия в корнях на 158, а в побегах на 214% по сравнению с небактеризованным контролем. Анализ активности ФАЭ (супероксиддисмутазы, каталазы, аскорбатпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы) показал, что присутствие кадмия вызывало ингибирование всех исследованных ферментов в корнях, но стимулировало их активность в побегах сорго. Бактериализация растений оказывала выраженный эффект на активность ФАЭ, предположительно связанный как с непосредственным присутствием в системе микроорганизма и/или его метаболитов, так и с опосредованным инокулянтном повышением концентрации металла в растении. К концу эксперимента активность всех ФАЭ резко увеличивалась и у бактеризованных растений была значительно выше по сравнению с небактеризованными, что отчетливо коррелировало с увеличением концентрации кадмия в растительных тканях. В целом, изучение особенностей взаимодействия штамма PGPR с сорго веничным в условиях хронического кадмиевого стресса позволило продемонстрировать влияние микроорганизма на устойчивость растения, миграцию и распределение металла в его органах. Результаты исследования предполагают возможность использования штамма *A. brasilense* Cd при восстановлении загрязненных кадмием почв.

Effect of *Azospirillum brasilense* on cadmium accumulation and antioxidant enzymes activity in *Sorghum bicolor*

Muratova A.Yu., Lyubun E.V., Sungurtseva I.Yu.

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

Heavy metals are some of the most dangerous environmental pollutants, which have a negative impact on humans. They have a long half-life in nature, produce a cumulative effect, and retain their toxic properties in the tissues of living organisms. The ability of plants to accumulate heavy metals limits the use of contaminated lands for the cultivation of crops, but it also provides an opportunity to develop a green technology for the cleanup of lands from these inorganic pollutants. In this context, the study of the interaction of heavy metals with plants is relevant, both in terms of plant protection and in terms of phytoremediation of contaminated soil. The accumulation of heavy metals in plants may be affected by plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Therefore, this research aimed to estimate the accumulation of cadmium (II) and the activity of antioxidant enzymes in *Sorghum bicolor* L. (Moench) under chronic cadmium stress (20 $\mu\text{mol/kg}$) and in the presence of a cadmium-resistant PGPR *Azospirillum brasilense* Cd. Inoculation of plants with *A. brasilense* Cd stimulated the growth of plant roots and enhanced the metal extracting ability of sorghum, increasing the cadmium content in roots and shoots by 158 and 214%, respectively, in comparison with the uninoculated control. Analysis of the activity of six antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase, and glutathione-S-transferase) after 2, 4, and 6 weeks of cultivation showed that cadmium inhibited all the enzymes in roots but stimulated their activity in shoots. Inoculation of sorghum with PGPR had a pronounced effect on the activity of the antioxidant enzymes. That was presumably associated both with the direct presence of the microorganism or its metabolites and with the inoculants-mediated increase in the metal concentration in the plant. By the end of the experiment, the activity of all antioxidant enzymes had increased sharply and was significantly higher in inoculated than in uninoculated plants. This findings correlated with an increase in the concentration of cadmium in plant tissues. Overall, the study of the interaction of the PGPR *A. brasilense* Cd with *Sorghum bicolor* under chronic cadmium stress has led us to find an effect of the microorganism on plant resistance to heavy metal pollution and on metal migration and distribution in plant organs. The results of the study suggest that *A. brasilense* Cd can be used in the remediation of cadmium-contaminated soils.

Химический мутагенез бородачатых корней витании и табака

¹Мусин Х.Г., ²Михайлова Е.В., ²Гумерова Г.Р., ²Чемерис А.В., ^{1,2}Кулуев Б.Р.

¹Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

E-mail: lu2666@yandex.ru

Бородачатые корни растений (hairy roots) - это корни, получаемые путем генетической трансформации растений почвенными бактериями *Agrobacterium rhizogenes*. Наиболее ценные преимущества бородачатых корней - способность к неограниченному росту в питательных средах без добавления гормонов, генетическая стабильность и синтез корнеспецифических БАВ, возможность получить генно-модифицированную культуру корней, продуцирующую целевой белок или пептид. В качестве объекта нашего исследования выступали бородачатые корни витании снотворной (*Withania somnifera*) и табака (*Nicotiana tabacum*), что были получены нами ранее путем трансформации семядольных эксплантов с помощью *A. rhizogenes* штаммов А4 и 15834. В состав витании входят более 12 различных алкалоидов, флавоногликозиды, лигнаны, стероидные лактоны группы витанолидов. Метаболиты витании применяют при лечении туберкулеза, ревматизма, рака, воспалительных заболеваний, заболеваний сердечно-сосудистой системы. Поэтому представляется актуальным создание высокопродуктивных линий бородачатых корней витании с использованием методов индуцированного мутагенеза. Для генетического мутагенеза корней нами были использованы азид натрия и колхицин. Колхицин является популярным мутагеном, обладающим сильной антимитотической активностью и его применение может способствовать полиплоидизации и увеличению продуктивности корней. Азид натрия вызывает точечные мутации без сдвига рамки считывания, что способствует повышению уровня генетической гетерогенности. Для исследований нами были отобраны здоровые культуры корней, не имеющие деформированные части. При обработке колхицином, кончики корней, длиной 1-2 см, вместе с апикальной частью переносились в стерильный раствор колхицина, концентрациями конечного вещества 0,8, 1,25, 2 и 4 мМ. В случае с азидом натрия бородачатые корни пересаживались в чашки Петри, куда была предварительно нанесена твердая (7 г/л агара) среда МС содержащая мутаген в концентрациях 5, 25 и 50 мкМ. В результате была подобрана наиболее оптимальная доза азид натрия которая уменьшала скорость роста корней в 2 раза. Показано улучшение ростовых характеристик культур бородачатых корней, после обработки их различными дозами колхицина, что может быть связано с полиплоидизацией. Продолжается отбор бородачатых корней по морфологическим признакам для выявления мутационных изменений произошедших в геноме после обработки азидом натрия. Планируется провести расчет количества хромосом в клетках культур корней, подвергшихся действию колхицина.

Chemical mutagenesis of the hairy roots of *Withania somnifera* and *Nicotiana tabacum*

¹Musin Kh.G., ²Mikhaylova E.V., ²Gumerova G.R., ²Chemeris A.V., ^{1,2}Kuluev B.R.

¹Bashkir State University, Ufa, Russia

² Institute of Biochemistry and genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

Hairy roots obtained by genetic transformation of plants by soil bacteria *Agrobacterium rhizogenes*. Among the most valuable advantages of hairy roots, include the ability for unlimited growth in nutrient media without the addition of hormones, genetic stability and synthesis of root-specific biological active substances, the possibility of obtaining a gene-modified root culture that produces the desired protein or peptide. As the object of our study were the roots of *Withania somnifera* that were obtained previously by transformation of cotyledonary explants using *A. rhizogenes* A4 and 15834 strains. The roots of *W. somnifera* includes more than 12 different alkaloids, flavonoglycosides, lignans, steroid lactones of the group of vitanolides. Metabolites *W. somnifera* apply in the treatment of tuberculosis, rheumatism, cancer, inflammatory diseases, diseases of the cardiovascular system. Therefore, the creation of highly productive lines of hairy roots of *W. somnifera* looks to be actual, for which the methods of induced mutagenesis can be used. For the genetic mutagenesis of the roots, we used sodium azide and colchicine. Colchicine is a mutagen having strong antimitotic activity and its use can promote polyploidization and increase in the productivity of the roots. Sodium azide causes local mutations without shifting the reading frame, which increases the level of genetic heterogeneity. For our studies, we selected healthy root cultures that did not have deformed parts. When treated with colchicine, the root tips of a long 1-2 cm along with the apical part were transferred to a sterile solution of colchicine. The concentrations of colchicine in the final solution were 0.8, 1.25, 2 and 4 mM. In the case of sodium azide, the roots were transplanted into Petri dishes with MS medium (7 g / L agar) containing a mutagen at a concentration of 5, 25 and 50 μM. As a result of the work, the most optimal dose of sodium azide was selected, which inhibited the rate of root growth by twice. An improvement in the growth characteristics of bearded root cultures was shown, after treatment with various doses of colchicine, which may be due to polyploidization. The selection of hairy roots for morphological features continues to reveal mutational changes in the genome after treatment with sodium azide. It is planned to estimate the number of chromosomes in the cells of root cultures exposed to colchicine.

О проблеме изучения биологических особенностей редких видов рода *Iris* в Республике Башкортостан

¹Мустафина А.Н., ²Михайлова Е.В., ¹Голованов Я.М., ¹Крюкова А.В.

¹Южно-Уральский Ботанический сад-институт УФИЦ РАН, Уфа, Россия

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

E-mail alfverta@mail.ru

Семейство *Iridaceae* включает свыше 200 видов, распространенных в большей части Северного полушария. Виды семейства освоили широкий диапазон местообитаний – от прибрежных до пустынных, поднимаясь и до высокогорий. В Республике Башкортостан представлено 6 видами и 2 родами (*Iris* L. и *Gladiolus* L.), из которых наиболее распространенный род Касатик – *Iris* включает 5 видов. На настоящий момент в Красную книгу РБ (2011) входит 4 вида рода. Особый интерес представляет изучение двух степных видов рода – *Iris scariosa* и *I. pumila*, находящихся на северной границе распространения. Они обладают значительной фенотипической вариабельностью на протяжении своего ареала в республике и сопредельных территориях. С точки зрения таксономии интерес вызывает комплекс близкородственных видов (собственно *Iris scariosa* Willd. ex Link. и *Iris glaucescens* Bunge), зачастую в широком смысле объединяемые в один вид – *Iris scariosa* Willd. ex Link. Также в местах совместного произрастания *Iris scariosa* и *I. pumila* возможно присутствие гибридогенных популяций видов.

В России исследованиям представителей рода *Iris* посвящен ряд работ. Так многолетние исследования данной группы растений ведутся в БИН РАН. Г.И. Родионенко и Н.И. Алексеевой. В европейской части России представители рода *Iris* также были предметом исследования в Республике Калмыкия, на Юго-Западе Черноземья, на Кавказе, помимо этого виды рода активно изучаются в Сибири. Как правило, данные работы касаются изучения морфологических, биологических, таксономических особенностей и охраны видов рода. Популяционно-генетическим исследованиям уделено меньшее внимание. Изучение ирисов ISSR- и RAPD- методами проводится в России (г. Новосибирск) и за рубежом (США, Китай, Южная Корея). В Республике Башкортостан изучение биологических особенностей рода *Iris* в культуре проводится в течение ряда лет сотрудниками Южно-Уральского Ботанического сада-института УФИЦ РАН. Тем не менее, состояние природных популяций ирисов в Башкортостане практически не изучено, не исследованы вопросы генетического разнообразия, изменчивости и экология видов семейства, что не позволяет совершенствовать их охрану на Южном Урале в соответствии с современными требованиями МСОП.

Исходя из всего вышеперечисленного, применение молекулярно-генетических методов позволит решить вопросы таксономии представителей рода *Iris* в пределах региона Южного Урала. Это позволит разработать рекомендации по охране генофонда редких видов рода *Iris*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00022 мол_а.

About a problem of studying of biological features of rare species of the sort *Iris* in the Republic of Bashkortostan

¹Mustafina A.N., ²Mikhaylova E.V., ¹Golovanov Ya.M., ¹Kryukova A.V.

¹South Ural Botanical garden-institute Ufa federal scientific centre RAS, Ufa, Russia

²Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, Ufa, Russia

The *Iridaceae* family includes over 200 species widespread in the most part of the Northern hemisphere. Species of family have acclimated the wide range of habitats – from coastal to desert, rising also to highlands. In the Republic of Bashkortostan it is presented by 6 species and 2 genus (*Iris* L. and *Gladiolus* L.), from which the most widespread genus *Iris* – includes 5 species. Currently the Red List of RB (2011) includes 4 species of a genus. Studying of two steppe species of a genus – *Iris scariosa* and *I. pumila* which are on northern border of distribution is of special interest. They have considerable phenotypical variability throughout the area in the republic and adjacent territories. From the point of view of taxonomy interest is attracted by a complex of closely related species (*Iris scariosa* Willd. ex Link. and *Iris glaucescens* Bunge), often in a broad sense united in one look – *Iris scariosa* Willd. ex Link. Also in places of common growth of *Iris scariosa* and *I. pumila* presence of hybrid populations of this species is possible.

In Russia a number of works is devoted to researches of the genus *Iris*. So long-term researches of this group of plants are conducted in Botanical institute of RAS (St. Peterburg). G.I. Rodionenko and N.I. Alekseeva. In the European part of Russia genus *Iris* were also an object of research in the Republic of Kalmykia, in the Southwest of the Chernozemye, in the Caucasus, in addition species of a genus are actively studied in Siberia. As a rule, these works concerned studying of morphological, biological, taxonomical features and protection. Smaller attention is paid to genetic researches. Studying of genus *Iris* by ISSR- and RAPD- methods is carried out in Russia (Novosibirsk) and abroad (the USA, China, South Korea). In the Republic of Bashkortostan studying of biological features of the genus *Iris* in culture is carried out for a number of years in South-Ural Botanical garden-institute UFRC RAS. Nevertheless, the condition of natural populations in Bashkortostan is almost not studied, questions of a genetic variety, variability and ecology of species of family aren't investigated that doesn't allow to improve their protection in South Ural according to modern requirements of IUCN.

Application of genetic methods will allow to resolve issues of species taxonomy within the region of South Ural. It will allow to develop recommendations about protection of a gene pool of rare species of the genus *Iris*.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-34-00022.

Гемагглютинирующая способность стрептомицетов из ризосферы некоторых представителей *Solanaceae*

¹Назарова Я.И., ¹Бакулина А.В., ²Безмельцева О.М., ²Сергушкина М.И., ¹Широких И.Г.

¹Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого, Киров, Россия

²Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар, Россия

E-mail: drugaeann1@rambler.ru

Создание высокоэффективных препаратов на основе ассоциативных микроорганизмов и их активных метаболитов имеет огромное значение для развития современных фитосанитарных технологий. Одной из интереснейших в этом плане групп почвенных микроорганизмов являются стрептомицеты – спорообразующие, грамположительные актинобактерии, способные к формированию ветвящегося мицелия и обладающие обширным потенциалом биоконтрольного и фиторегуляторного действия, реализацию которого, в значительной мере, определяет их способность колонизировать корни и ткани растения-хозяина. Лектины представляют собой гликопротеины, способные обратимо и избирательно связывать углеводы и углеводные детерминанты биополимеров без изменения их структуры. Это свойство лежит в основе многочисленных биологических функций лектинов, и на нем основана их способность агглютинировать эритроциты. Среди почвенных стрептомицетов ранее гемагглютинирующая активность была обнаружена у антагонистов фитопатогенов и устойчивых к тяжелым металлам штаммов. В данной работе изучали гемагглютинирующую способность ризосферных стрептомицетов и выясняли возможную связь лектинов с колонизацией растительных тканей. Объектами исследования служили 10 выделенных из ризосферы растений томата и табака культур рода *Streptomyces*, которые в лабораторных условиях проявили высокую фунгицидную активность в отношении грибов рода *Fusarium* и/или способность к синтезу ауксинов в присутствии триптофана. В результате проведенных исследований гемагглютинирующая активность была обнаружена в супернатантах культуральных жидкостей (СКЖ) у выращенных на синтетической среде штаммов с биоконтрольными (*S. clavuligerus* 8-16, *S. cinereorectus* 8-3, *S. polychromogenes* K8-9) и фиторегуляторными (*S. polychromogenes* K8-9, *S. levoris* bn 6-4, *S. ramulosus* 34.2-3, *S. albolongus* 34-5, *S. wedmorensis* ТК-5) свойствами. Титр гемагглютинации изменялся от 1:25 до 1:100, что позволяет сделать заключение о наличии лектинов в СКЖ этих культур. Выявленная способность образовывать лектины у стрептомицетов дает основание предполагать участие этих метаболитов в формировании ассоциативного взаимодействия мицелиальных прокариот с растением. Далее, в инокуляционном эксперименте с картофелем *in vitro*, колонизирующая активность лектин-продуцирующего штамма *S. wedmorensis* ТК-5 была сопоставлена с таковой у штамма *S. fulvoviridis* T-2-20, не проявившего гемагглютинирующей активности.

The ability of the rhizosphere streptomycetes of some *Solanaceae* to hemagglutination

¹Nazarova Y.I., ¹Bakulina A.V., ²Bezmeltseva O.M., ²Sergushkina M.I., ¹Shirokikh I.G.

¹Federal scientific agricultural center of the North-East, Kirov, Russia

²Institute of Physiology the Komi Science Center of the Ural Division RAS, Syktyvkar, Russia

The development of highly effective preparations of associative microorganisms and their active metabolites is of great importance for modern phytosanitary technologies progress. Along with the identification and allocation of new promising producers of significant interest is a detailed study of their metabolic potential. One of the most interesting groups of soil microorganisms in this respect is streptomycetes – spore-forming, gram-positive actinobacteria that form a branching mycelium. Due to synthesis of biologically active compounds complex, they have extensive potential for biocontrol and phyto regulatory action, the implementation of which to a largely determines their ability to colonize the roots and tissues of the host plant. Lectins are glycoproteins capable of reversibly and selectively binding carbohydrates and carbohydrate determinants of biopolymers without changing their structure. This property is the basis of numerous biological functions of lectins and their ability to agglutinate red blood cells. Although lectins are widespread in nature, their functional role in different organisms is not the same. Previously, the hemagglutinating activity of soil streptomycetes were found in plant pathogens antagonists and strains resistant to heavy metals (Valagurova et al., 1996). In this study we researched the hemagglutinating ability of rhizospheric streptomycetes and the possible relationship of lectins with plant tissues colonization. The study objects were 10 strain of the *Streptomyces* sp. isolated from the rhizosphere of *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana tabacum* plants, which in laboratory conditions showed high fungicidal activity against *Fusarium* and/or the ability to synthesize auxins in the presence of tryptophan. Hemagglutinating activity was detected in culture liquid supernatants of strains grown on synthetic medium with antagonistic (*S. clavuligerus* 8-16, *S. cinereorectus* 8-3, *S. polychromogenes* K8-9) and phyto regulatory (*S. polychromogenes* K8-9, *S. levoris* bn 6-4, *S. ramulosus* 34.2-3, *S. albolongus* 34-5, *S. wedmorensis* ТК-5) properties. Hemagglutination titer varied from 1:25 to 1:100, which allows us to conclude about the presence of lectins in culture liquid supernatants of these strains. The identified ability to produce lectins in streptomycetes suggests the participation of these metabolites in associative interaction formation of mycelial prokaryotes with the plant. Further, in the inoculation experiment with *Solanum tuberosum* *in vitro* the colonizing activity of the lektin-producing strain *S. wedmorensis* ТК-5 was compared with that of the strain *S. fulvoviridis* T-2-20, which did not show hemagglutination.

Фенотипический анализ разнообразия возбудителя парши яблони *Venturia inaequalis*

Насонов А.И.

Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства и виноделия, Краснодар, Россия
E-mail: nasoan@mail.ru

Парша яблони – главное заболевание этой садовой культуры, вызывающей значительный экономический ущерб. Источником болезни служит микроскопический аскомицет *Venturia inaequalis*. Создания эффективных приёмов регулирования распространения и численности фитопатогена требует обширных знаний о его изменчивости, особенностях динамики популяции, её структуры. Литературный анализ показывает, что биологические особенности патогена характеризуются разнообразием в различных зонах садоводства. Целью исследования являлась оценка фенотипического разнообразия патогенного гриба в различных по сортовому и географическому происхождению садовых насаждениях Краснодарского края на основе анализа морфолого-культуральных признаков его моноспоровых изолятов. Выделение моноспоровых изолятов осуществляли из аскоспоровой стадии возбудителя парши яблони по оригинальной методике. Образцы прошлогоднего листового опада для выделения изолятов, собирали с конца марта по конец мая 2016 года, по одному листу под каждым деревом. Чистую культуру гриба получали на картофельно-глюкозном агаре. Морфолого-культуральные характеристики описывали через 30 суток роста изолята при 20°C, при этом оценивали его диаметр, край, форму, плотность, фактуру и цвет основного мицелия, характер и соотношение воздушного и субстратного мицелиев, спороношение. В процессе исследования двух садовых насаждений было выделено 80 моноспоровых изолятов *V. inaequalis*. Оценка морфолого-культуральных признаков показало их значительную вариабельность. Размер изолятов патогена варьировал от 4-5 мм до 26 мм. Основной воздушный мицелий мог быть рыхлым или плотным и характеризовался бархатистой, войлочной и шерстистой фактурой. Субстратный мицелий также отличался разной степенью плотности. Цвет изолятов представлял собой различные оттенки серого, от светлых до тёмных вариантов с различными холодными или тёплыми тонами. Реже встречались культуры с двумя или более цветами, которые в силу радиального роста колонии, образовывали концентрические зоны. Спорношение было представлено 4 вариантами признака: слабое, среднее, сильное или отсутствовало. На основе совокупности морфолого-культуральных признаков было выделено 25 морфологических типов (17 были описаны впервые). 16 морфотипов встречались в обоих садах, 9 остальных оказались уникальными для одного из них. Изученные популяции патогена характеризовались высоким внутривидовым разнообразием, однако имели незначительные различия между собой.

Phenotypic analysis of the diversity of apple scab pathogen *Venturia inaequalis*

Nasonov A.I.

North Caucasus Federal Scientific Center for Horticulture, Viticulture and Wine-making, Krasnodar, Russia

Apple scab is the main disease of this garden culture, causing significant economic damage. The source of the disease is a microscopic Ascomycetum *Venturia inaequalis*. The creation of effective methods for regulating the distribution and abundance of the phytopathogen requires extensive knowledge of its variability, the dynamics of the population, its structure. Literary analysis shows that the biological characteristics of the pathogen are characterized by diversity in various areas of horticulture. The aim of the study was to assess the phenotypic diversity of the pathogenic fungus in various plantations of the Krasnodar Territory, based on the analysis of the morphological and cultural features of its monospore isolates, according to varietal and geographical origins. Isolation of monospore isolates was carried out from the ascospore stage of the apple scab pathogen according to the original technique. Samples of last year's leaf litter to isolate isolates were collected from the end of March to the end of May 2016, one sheet under each tree. A pure culture of the fungus was obtained on potato-glucose agar. Morphological and cultural characteristics were described after 30 days of growth of the isolate at 20 °C, while assessing its diameter, edge, shape, density, texture and color of the main mycelium, the nature and ratio of air and substrate mycelia, sporulation. In the process of studying two garden plantings, 80 monosporous isolates of *V. inaequalis* were isolated. Evaluation of morphological and cultural features showed their considerable variability. The size of the isolates of the pathogen varied from 4-5 mm to 26 mm. The main aerial mycelium could be loose or dense and characterized by velvety, felt and woolly texture. The substrate mycelium also differed in varying degrees of density. The color of the isolates was a variety of shades of gray, from light to dark variations with various cold or warm tones. Less often there were cultures with two or more flowers, which, due to the radial growth of the colony, formed concentric zones. Spore was represented by 4 variants of the characteristic: weak, medium, strong or absent. Based on the set of morphological and cultural features, 25 morphological types were identified (17 were described for the first time). 16 morphotypes were found in both gardens, 9 others were unique for one of them. The studied populations of the pathogen were characterized by a high intrapopulation variety, but had insignificant differences between themselves.

Оценка экспрессии генов *SIIAA1* и *SIIAA9* у томата (*Solanum lycopersicum* L.) при взаимодействии с *Burkholderia* sp. 418.

Некрасевич Н.А., Яцевич К.К., Кильчевский А.В.
Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
E-mail: N.Nekrashevich@igc.by

Возделывание овощных культур с использованием микробиологических препаратов является перспективным направлением органического земледелия. Бактеризация растений вызывает широкий спектр физиологических реакций, сдвиг гормонального баланса и изменение экспрессии гормонозависимых генов. Целью данного исследования стала оценка относительной экспрессии ранних ауксин-индуцируемых генов семейства *Aux/IAA* у томата при инокуляции семян ризосферным штаммом *Burkholderia* sp. 418. Растительным материалом служили 4 генотипа томата с различной реакцией на бактеризацию. РНК выделяли набором Total RNA Purification Kit (Jena Bioscience) из проростков на 10 и 14 день закладки эксперимента. Перед реакцией обратной транскрипции пробы РНК обрабатывали ДНКазой (Thermo Scientific). Синтез кДНК осуществляли набором Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific) с соблюдением NRT и NTC контролей. Количественную ПЦР проводили на амплификаторе BIO-RAD CFX 96Real-Time System с обязательным этапом считывания кривой плавления для подтверждения специфичности синтеза фрагмента. Относительную количественную оценку экспрессии изучаемых генов *SIIAA1* (GenBank, JN379431) и *SIIAA9* (GenBank, JN379437) нормализовали по экспрессии гена фактора элонгации *EF-lá* (GenBank, XM004240531), расчет проводили методом $\Delta\Delta C_t$. Оценка экспрессии изучаемых генов в контрольном варианте без бактеризации и варианте опыта с инокуляцией семян штаммом *Burkholderia* sp. 418 позволила подтвердить достоверную сортовую специфику. На 10 день эксперимента сорт Калинка характеризовался низкими уровнями экспрессии генов *SIIAA1* и *SIIAA9*, вдвое уступающими данным экспрессии в контроле. К 14 дню опыта отмечено незначительное усиление экспрессии обоих генов в варианте с инокуляцией семян. У образца Линия 164 на протяжении всего исследования наблюдалась стабильная, близкая к контролю, экспрессия изучаемых генов. Сорт Зорка показал увеличение (в 1,24 раза) экспрессии гена *SIIAA1* при взаимодействии с *Burkholderia* sp. 418 к 14 дню эксперимента. Уровень экспрессии гена *SIIAA9* оставался близким к уровню экспрессии в контрольном варианте. Линия 7 характеризовалась высокой экспрессией обоих изучаемых генов в варианте с бактеризацией (в 1,3 и 1,62 раза) при дальнейшем снижении к 14 дню проведения исследований. Следовательно, изменение экспрессии ранних ауксин-индуцируемых генов *SIIAA1* и *SIIAA9* отражает процесс формирования растительно-микробного взаимодействия через сортовую специфику ауксинового ответа на бактеризацию.

Evaluation of expression of *SIIAA1* and *SIIAA9* genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) by interaction with *Burkholderia* sp. 418.

Nekrashevich N.A., Yatsevich K. K., Kilchevsky A.V.
Institute of Genetics and Cytology of NAS of Belarus, Minsk, Belarus

The cultivation of vegetable crops using microbiological preparations is a promising area of organic farming. Bacterization of plants causes a wide range of physiological reactions, a shift in the hormonal balance and a change in the expression of hormone-dependent genes. The aim of this study was to evaluate the relative expression of early auxin-induced genes of the *Aux/IAA* family in tomato when seeds were inoculated with the rhizosphere strain *Burkholderia* sp. 418. The plant material contained 4 genotypes of tomato with different reactions to bacterization. RNA was isolated with a Total RNA Purification Kit (Jena Bioscience) from seedlings on the 10th and 14th day of the experiment. Before the reverse transcription reaction, the RNA samples were treated with DNase (Thermo Scientific). The synthesis of the cDNA was performed by the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific) with NRT and NTC controls. Quantitative PCR was performed on a thermocycler BIO-RAD CFX 96Real-Time System Amplifier with the required step of reading the melting curve to confirm the specificity of the fragment synthesis. The relative quantitative evaluation of the expression of the studied genes *SIIAA1* (GenBank, JN379431) and *SIIAA9* (GenBank, JN379437) was normalized by the expression of the elongation factor gene *EF-lá* (GenBank, XM004240531) calculated by the $\Delta\Delta C_t$ method. Evaluation of the expression of the studied genes in the control variant without bacterization and a variant of the experiment with inoculation of seeds with *Burkholderia* sp. 418 allowed to confirm the authentic varietal specificity. On the 10th day of the experiment, the Kalinka variety was characterized by low expression levels of the *SIIAA1* and *SIIAA9* genes, which were twice as large as the expression data in the control. By the 14th day of the experiment, there was a slight increase in the expression of both genes in the variant with seed inoculation. At the sample Line 164 throughout the study, stable, close to control expression of the studied genes was observed. The Zorka variety showed an increase (by 1.24 times) of the expression of the *SIIAA1* gene upon interaction with *Burkholderia* sp. 418 to the 14th day of the experiment. The level of expression of the *SIIAA9* gene remained close to the level of expression in the control variant. Line 7 was characterized by high expression of both studied genes in the variant with bacterization (in 1.3 and 1.62 times) with further decrease on the 14th day of the studies. Consequently, the change in expression of the early auxin-inducible genes *SIIAA1* and *SIIAA9* reflects the process of formation of plant-microbial interaction through the specificity of the auxin response to bacterization.

Новые биопрепараты для биодеструкции растительных остатков и оздоровления почвы

Новикова И.И., Титова Ю.А., Краснобаева И.Л., Бойкова И.В.

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России) Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР), Санкт-Петербург, Россия

E-mail: juli1958@yandex.ru

За последнее десятилетия почвы всех климатических зон потеряли значительный запас гумуса. В связи с этим чрезвычайно актуальным становится решение вопроса об организации эффективного использования растительных остатков, особенно в тех почвенно-климатических зонах, где до 5-и месяцев в году холодно и количество осадков не превышает 360 мм. Применение биопрепаратов – деструкторов стерни позволяет значительно ускорить процесс минерализации растительных остатков, улучшить плодородие за счет обогащения почвы природными БАВ и микроэлементами, уничтожить патогенов, попадающих в почву с растительными остатками, и тем самым увеличить продуктивность сельскохозяйственных культур на 10–30%. Наиболее перспективны в качестве биодеструкторов растительных отходов виды *Trichoderma* – их аборигены. Новые биопрепараты для биодеструкции стерни и оздоровления почвы разработаны на основе отселектированных штаммов *T. asperellum* с использованием глубинно-поверхностной ферментации: торфяные формы Фитолар, П и Виридин, П; мультиконверсионная форма Виридин Ш, Г. В основе Фитолара – живые клетки и комплекс метаболитов мезофильного штамма, а в основе Виридинов – психрофильного штамма *T. asperellum*, поэтому последние биопрепараты активны при низких температурах. Исходный титр всех биопрепаратов составил $\times 10^{10}$ КОЕ/г. При проведении мелкоделяночных полевых испытаний по биодеструкции пожнивных остатков кукурузы опытные партии были стандартизованы по титрам – не менее $\times 10^8$ КОЕ/г. Оценили полевую эффективность трех биопрепаратов после их воздействия на растительные остатки кукурузы в течение 30-и суток при норме расхода 15 кг/га. Эффективность мезофильного биопрепарата Фитолар, П составила более 30% потерь биомассы, на 8% снизилось содержание целлюлозы и на 10% лигноцеллюлозного комплекса в целом по отношению к контролю. Эффективность низкотемпературных Виридинов, П и Ш, Г составила 23% и 19% потерь биомассы, на 11.6% и 11.9% снизилось содержание целлюлозы в остатках кукурузы по отношению к контролю, соответственно. Высокая биологическая активность препаратов позволила обогатить почву подвижными питательными веществами и получить экологически чистую сельскохозяйственную продукцию.

New biologics for cover residues' biodestruction and soil hygienics

Novikova I.I., Titova J.A., Krasnobaeva I.L., Boykova I.V.

¹Federal agency for scientific organizations Federal state budget scientific institution All-russian institute of plant protection (FSBSI VIZR), Saint-Petersburg, Russia

Over the last decade, the soils in all climatic zones have lost a significant supply of humus. In this regard, it is extremely urgent to resolve the issue of organizing effective use of plant residues, especially in those soil and climate zones where it is cold up to 5 months a year and the amount of precipitation does not exceed 360 mm. The use of biologics – stubble destructors can significantly accelerate the process of plant residues' mineralization, improve fertility by enriching the soil with natural BAS and trace elements, eliminate pathogens falling into the soil with cover residues, and thereby increase the crops' productivity up to 10–30%. The most promising as plant wastes' biodestructors are *Trichoderma* species – their aborigines. New biologics for biodegradation of stubble and soil hygienics are developed on the basis of selected *T. asperellum* strains using deep-surface fermentation: peat forms – Fitolar, P and Viridin, P; multibiorecycled form Viridin SH, G. Phytolar's base are living cells and metabolome of mesophilic strain, Viridins' base is the same of psychrophilic *T. asperellum* strain, therefore the latter biologics are active at low temperatures. The initial titer of all biologics was $\times 10^{10}$ CFU/g. In small plot field trials on stubble corn residues' biodegradation, pilot lots were standardized by titre – not less than $\times 10^8$ CFU/g. The field efficacy of the three biologics was assessed after their effect on maize remains for 30 days at expenditure rate of 15 kg/ha. The mesophilic biologic Fitolar, P effectiveness was more than 30% of the biomass loss, the cellulose content and the lignocellulose complex as a whole were reduced by 8% and 10% correspondingly relative to the control. The efficacy of low-temperature Viridines, P and SH, G was 23% and 19% of biomass loss, 11.6% and 11.9% decreased cellulose content in maize residues relative to control, respectively. High biological activity of the biologics allowed enriching the soil with mobile nutrients and obtaining environmentally friendly agricultural crops.

Перспективы использования иммобилизованных на шунгите микроорганизмов рода *Azotobacter* для стимуляции процессов роста и развития растений

¹Нуколова А.Ю., ²Савушкин А.И.

¹Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

²ООО "Микробиом", Москва, Россия

E-mail: a.nukolova@yandex.ru

Исследование биологических эффектов шунгита и его производных остаётся актуальным в связи с широким спектром его применения в сельском хозяйстве. Действие шунгита на биологические процессы объясняется его природными антиоксидантными (блокада перекисного окисления липидов), адсорбирующими, адаптогенными свойствами. Порода обладает сорбционными, каталитическими характеристиками, биологической активностью в отношении микробиоты почвы. Высокую значимость в настоящее время приобретает разработка технологических приёмов иммобилизации промышленно значимых микроорганизмов на различных носителях, позволяющих стабилизировать и стимулировать их антагонистическую и биопленкообразующую активность. Перспективными, в данном контексте, являются исследования группы бактерий, стимулирующих рост и развитие сельскохозяйственных культур в присутствии новых сорбентов, таких, как шунгит. В рамках плановой НИР курса микробиологии ПетрГУ были выполнены исследования возможности использования карельского шунгита различного фракционного состава и разного происхождения (месторождения: «Залебязь», «Максово» и «Зажогино») в качестве носителя для иммобилизации аборигенных штаммов *Azotobacter chroococcum*, имеющихся в генетической коллекции курса. Для стимуляции прорастания семян ржи обрабатывались в течение 2-4 часов стимулятором роста «Эпин-Экстра» различных концентраций. Наилучшей оказалась концентрация препарата 0.025 мл/100 мл воды. Затем обработанные семена переносились на субстрат для проращивания, состоящий из модифицированного шунгита и иммобилизованных на нём культур различных штаммов *A. chroococcum*. В результате получены данные свидетельствующие о значительной стимуляции процессов роста и развития проростков ржи на шунгите, по сравнению с контрольными вариантами.

Prospects of using immobilized on shungite microorganisms of the genus *Azotobacter* for stimulation of growth and development of plants

¹Nukolova A.Yu., ²Savushkin A.I.

¹Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

²"Microbiom" Ltd, Moscow, Russia

The study of the biological effects of schungite and its derivatives remains relevant in connection with the wide range of its applications in agriculture. The action of schungite on biological processes is explained by its natural antioxidant (blockade of lipid peroxidation), adsorptive, adaptogenic properties. The rock has sorption, catalytic characteristics, biological activity with respect to soil microbiota. The development of technological methods of immobilization of industrially significant microorganisms on various carriers, which allows to stabilize and stimulate their antagonistic and biofilm-forming activity, acquires high significance at the present time. Promising, in this context, are studies of a group of bacteria that stimulate the growth and development of crops in the presence of new sorbents, such as schungite. Within the framework of the planned research work of the microbiology course of PetrSU, studies were carried out of the possibility of using the Karelian schungite of various fractional composition and different origins (deposits: Zalebyazhye, Maksovo and Zazhogino) as a vehicle for immobilizing native *Azotobacter chroococcum* strains in the genetic collection of the course. To stimulate germination, the seeds of rye were processed for 2-4 hours by a stimulator of growth of "Epin-Extra" of various concentrations. The concentration of the drug was 0.025 ml / 100 ml of water. The treated seeds were then transferred to a germination substrate consisting of a modified schungite and immobilized cultures of various strains of *A. chroococcum*. As a result, data were obtained indicating significant stimulation of the growth and development of rye seedlings on the schungite, in comparison with the control variants.

Конкуренция ризобий за образование клубеньков: генетический контроль, эволюция и практическое значение

Онищук О.П.

ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: olony@yandex.ru

Способность клубеньковых бактерий – N₂-фиксирующих симбионтов бобовых растений конкурировать за образование клубеньков (нодуляцию) – важнейший адаптивный признак этих микроорганизмов, определяющий их распространение в почвенных экосистемах, эволюционную динамику и практическое использование. Cmp-гены (от англ. competitiveness), контролирующие нодуляционную конкурентоспособность (НКС), выполняют широкий спектр функций, реализуемых на уровне как индивидуальных штаммов (усвоение различных источников питания, развитие поверхностных структур, подвижность, хемотаксис), так и микробных сообществ (сигнальные процессы, в том числе и определяемые механизмом Quorum Sensing, формирование биопленок, антибиоз). Адаптивное значение cmp-генов заключается в контроле перехода ризобий из прикорневой зоны (инокулома) в эндосимбиотические ниши, который обеспечивает резкое возрастание численностей конкурентоспособных штаммов в экосистемах “растение-почва”. Этот переход характеризуется нелинейной зависимостью между численностями конкурирующих штаммов в инокуломе и клубеньках, определяющей действие в популяциях ризобий частотно-зависимого отбора. Математическое моделирование популяционной динамики ризобий позволило предположить, что этот отбор, обеспечивая закрепление в популяциях редких генотипов, играет ключевую роль в прогрессивной (усложнение структуры генома) и адаптивной (повышение симбиотической эффективности) эволюции бактерий. Обсуждаются перспективы использования cmp-генов для конструирования хозяйственно ценных генотипов ризобий, основанного на амплификации позитивных регуляторов НКС, инактивации ее негативных регуляторов, а также на введении генов, контролирующих высокий уровень НКС, в активно фиксирующие N₂ штаммы.

Competition of rhizobia for the nodule formation: genetic control, evolution and practical significance

Onishchuk O.P.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St-Petersburg, Russia

The ability of nodule bacteria - N₂-fixing symbionts of leguminous plants to compete for the nodulation) is the most important adaptive feature of these microorganisms, which determines their distribution in soil ecosystems, evolutionary dynamics and practical use. Cmp genes that control nodulation competitiveness (NC) perform a wide range of functions realized at the levels of individual strains (assimilation of various sources of nutrition, development of surface structures, motility, chemotaxis) and microbial communities (signaling processes including those determined by the mechanism of Quorum Sensing, the formation of biofilms, antibiosis). The adaptive value of cmp genes is determined by the control of the rhizobium transition from the root zone (inoculum) to the endosymbiotic niches, which provides a sharp increase in the numbers of competitive strains in the “plant-soil” ecosystems. This transition is characterized by a nonlinear relationship between the numbers of competing strains in the inoculum and nodules, which determines the effect of frequency-dependent selection in populations of rhizobia. Mathematical simulation of the population dynamics of rhizobia suggested that this selection, ensuring the fixation of rare genotypes in populations, plays a key role in the progressive (complication of the structure of the genome) and adaptive (increasing symbiotic effectiveness) in the evolution of bacteria. The prospects of using cmp genes for the construction of economically valuable rhizobium genotypes based on amplification of positive NC regulators, inactivation of its negative regulators, as well as on the introduction of genes controlling high NC levels into the strains actively fixing N₂ are discussed.

Бактерии - биодеструкторы растительных полифенолов^{1,2}Павлова Ю.А., ²Халитова А.И., ^{1,2}Максимов А.Ю.¹ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

E-mail: pavlova_ua@mail.ru

Растения являются источником огромного количества фенольных соединений, таких как фенольные кислоты, кумарины, флавоноиды, лигнаны, танины, стильбены, гетерогенный полифенольный полимер - лигнин. В результате переработки органических продуктов в процессе почвообразования в почве накапливаются полифенольные гуминовые кислоты и фульвокислоты. Селекция и исследование микроорганизмов, способных к биотрансформации или биодеструкции этих соединений, имеет значение как для понимания фундаментальных вопросов круговорота веществ в природе, их метаболизма в живых системах и процессов почвообразования, так и для разных областей биотехнологии – переработки растительного сырья, улучшения структуры и плодородия почв, биодеструкции растительных (в т.ч. кородревесных) отходов и решения других экологических проблем. Данная работа направлена на селекцию бактерий, способных к использованию труднометаболизируемых полифенолов и полупродуктов их биогенной и абиогенной деградации.

Из почвенной среды выделены сообщества микроорганизмов, способных использовать лигнин а также поли- и монофенольные соединения в качестве единственного источника углерода. Проведен метагеномный анализ выделенных сообществ. Проведена селекция активных культур бактерий обладающих способностью к биодegradации полифенолов. Среди активных изолятов, использующих полифенольные соединения в качестве единственного субстрата, методами полифазной таксономии, а также анализа генов 16S рРНК, идентифицированы штаммы *Rhodococcus jostii*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. Это согласуется с данными литературы, из которых известно, что деградацию лигнина осуществляют некоторые культуры бактерий *Rhodococcus jostii*, *Bacillus ligniniphilus*, *Streptomyces viridosporus*, представители родов *Nocardia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Sphingobium*.

Bacteria are biodestructors of plant polyphenols^{1,2}Pavlova YuA, ²Khalitova AI, ^{1,2}Maksimov AYu¹PFIC UB RAS, Perm, Russia²Perm State University, Perm, Russia

Plants are the source of a big number of phenolic compounds, such as phenolic acids, coumarins, flavonoids, lignans, tannins, stilbenes, heterogeneous polyphenol polymer - lignin. As a result of processing of organic products, polyphenolic humic acids and fulvic acids accumulate in the soil during soil formation. The selection and research of microorganisms that are capable to biotransformation or biodegradation of these compounds is important both for understanding the fundamental issues of the cycle of substances in nature, their metabolism in living systems and soil formation processes, and for various areas of biotechnology - processing plant material, improving the structure and fertility of soils, biodegradation of plant raw materials and solving other environmental problems. This work is aimed at the selection of bacteria capable of using hard-metabolizable polyphenols and semi-products of their biogenic and abiogenic degradation.

From the soil environment, communities of microorganisms capable of using lignin as well as poly- and monophenolic compounds as the sole source of carbon have been identified. Metagenomic analysis of isolated communities was carried out. Selection of active cultures of bacteria with polyphenols biodegradation ability was carried out. Among the active isolates using polyphenol compounds as a single substrate, by the methods of polyphase taxonomy, as well as analysis of 16S rRNA genes, strains of *Rhodococcus jostii*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. This is consistent with literature data, of which it is known that some cultures of the bacteria *Rhodococcus jostii*, *Bacillus ligniniphilus*, *Streptomyces viridosporus*, representatives of the genera *Nocardia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Sphingobium* carry out lignin degradation.

Стероидные регуляторы морфогенеза и столонообразования у растений-регенерантов картофеля в аквакультуре

¹Плюснин И.Н., Головацкая И.Ф., ¹Бойко Е.В., ¹Видершпан А.Н., ²Кабил Ф

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

²Каирский университет, факультет сельского хозяйства, Гаммаа, Египет

E-mail: korok94@bk.ru

Известно, что морфогенез растений находится под контролем гормональной системы. Стероидные гормоны brassinosteroids (БР) эффективно воздействуют на рост и развитие растений в малых концентрациях, что имеет большое экологическое значение. Недостаточно изучена роль БР в образовании столонов картофеля. В связи с этим целью работы было изучение действия БР на морфогенез и формирование столонов у оздоровленных растений-регенерантов *Solanum tuberosum* L. раннеспелого сорта Жуковский ранний в условиях аквакультуры. В ходе эксперимента получали оздоровленные материнские микроклоны картофеля из проверенных на отсутствие вирусов апикальных регенерантов. Микроклоны культивировали в течение 25 суток в пробирках на агаризованной безгормональной половинной питательной среде Мурасиге-Скуга (½МС) с добавлением сахарозы и витаминов на белом свете (200±50 мкмоль квантов /м2с) и получали растения-регенеранты. Растения-регенеранты последовательно адаптировали к жидкой среде ½ МС (4 дня) и среде Прянишникова с аэрацией (10 дней). Затем корни обрабатывали в течение 9 ч растворами, содержащими БР (24-эпибрасинолид – ЭБЛ, Эпин-экстра – Эп) в трех концентрациях (0.001, 0.1 и 10 нМ). Корневую систему растений промывали водой, растения высаживали в сосуды с аэрацией и выращивали при температуре 18 (день) и 14 оС (ночь) в течение 21 суток. В результате исследований обнаружили, что обработка корней БР изменила интенсивность ростовых процессов растений. Все концентрации ЭБЛ увеличивали растяжение поверхности листьев на 25–42% относительно контроля, тогда как 0.1 нМ Эп стимулировал рост на 40%, а 10 нМ Эп ингибировал на 40%. Изменение длины побега происходило с той же закономерностью. Наибольший прирост ярусов отметили при действии 10 нМ Эп и ЭБЛ – 15–17%. Масса опытных растений увеличивалась на 20–44%. Наиболее активными были 10 нМ ЭБЛ и 0.1 нМ Эп. 10 нМ Эп тормозил ростовые процессы. Масса листьев увеличивалась 2-кратно при действии 10 нМ ЭБЛ. Объем корней увеличивался на 70% и снижался на 60 % при действии 0.1 нМ Эп и 10 нМ Эп соответственно. Столоны формировались быстрее на 28% при действии 0.001 нМ Эп. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях снижалось в связи с растяжением их поверхности. Таким образом, обработка корней стероидными гормонами активировала столонообразование и увеличивала массу и размеры оздоровленных растений картофеля сорта Жуковский ранний в условиях аквакультуры. Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РФФИ №17-54-61016_Египет_a.

Steroid regulators of morphogenesis and stolonization in potato regenerating plants in aquaculture

¹Plyusnin I.N., ¹Golovatskaya I.F., ¹Boyko E.V., ¹Vidershpán A.N., ²Kabil F.

¹National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

²Cairo University, Department of Vegetable Crops, Faculty of Agriculture, Gammaa, Egypt

It is known that the morphogenesis of plants is under the control of the hormonal system. Steroid hormones brassinosteroids (BR) effectively affect the growth and development of plants in small concentrations, which is of great ecological significance. The role of BR in the formation of potato stalks has not been adequately studied. In this case the object of this work is to study the BR effect on morphogenesis and the stolons formation in the regenerated *Solanum tuberosum* L. regeneration plants of the early ripening variety Zhukovsky early in aquaculture. In the course of the experiment, we received a healthy maternal microclone of potatoes from tested for virus-free apical regenerants. Microclones were cultured for 25 days in test tubes on an agarized hormone-free half-life medium of Murashige-Skooga (½MS) supplemented with sucrose and vitamins in white light (200 ± 50 μmol quanta / m2s) and regenerated plants were obtained. The regenerative plants were subsequently adapted to a liquid medium of ½ MS (4 days) and Pryanishnikov medium with aeration (10 days). The roots were then treated for 9 h with solutions containing BR (24-epibrasinolide-EBL, Epin-extra-Ep) in three of this concentrations 0.001, 0.1 and 10 nM. The root system of the plants was washed with water; the plants was set down in vessels with aeration and was grown at the temperature 18 оС (at day) and 14 оС (at night) for 21 days. As a result of the research, it was found that the treatment of the roots of BR changed the intensity of plant growth processes. All EBL concentrations increased the leaf surface extension by 25-42% relative to the control, while 0.1 nM Ep stimulated growth by 40%, and 10 nM Ep inhibited by 40%. The change in the length of the shoot occurred with the same pattern. The greatest increase in tiers was noted with the action of 10 nM Ep and EBL - 15-17%. The weight of experimental plants increased by 20-44%. The most active were 10 nM EBL and 0.1 nM Ep. 10 nM Ep slowed the growth processes. The weight of the leaves increased 2-fold under the action of 10 nM EBL. The volume of roots increased by 70% and decreased by 60% with the action of 0.1 nM Ep and 10 nM Ep, respectively. Stolons were formed faster by 28% under the action of 0.001 nM Ep. The content of photosynthetic pigments in the leaves was reduced due to the stretching of their surface. Thus, the treatment of the roots with steroid hormones activated stolon formation and increased the mass and size of the improved potato plants of the variety Zhukovsky early in aquaculture. The work was supported by the RFBR project No. 17-54-61016_Egypt_a.

Дегградация ПАУ в несимбиотических растительно-грибных системах

Позднякова Н.Н., Дубровская Е.В., Бондаренкова А.Д., Голубев С.Н., Баландина С.А., Турковская О.В.
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия
E-mail: pozdnyakova_n@ibppm.ru

Грибы являются важным компонентом функционирования экосистем, регулируя почвообразовательные процессы и играя значимую роль в дегградации и детоксикации поллютантов, в том числе персистентных, таких как полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Грибы, разрушающие в природе лигниновый компонент древесины, продуцируют внеклеточную неспецифическую окислительную ферментную систему, в результате каталитического действия которой образуются полярные и водорастворимые продукты, более доступные для природного почвенного биоценоза. Почвообитающие базидио- и аскомицеты в естественных экосистемах могут существовать рядом с растениями и вступать с ними во взаимодействия различного характера, от паразитизма до симбиоза. ПАУ и продукты их грибной дегградации могут оказывать существенное влияние на рост и развитие растений, а также являться объектами действия окислительных ферментов, экссудиремых корнями в ризосфере, в первую очередь пероксидаз. Окисленные производные ПАУ могут проникать в растительную клетку и подвергаться там дальнейшим превращениям также с участием пероксидаз. Нами проведено изучение несимбиотических растительно-грибных взаимодействий в процессе дегградации ПАУ. Модельными объектами были почвообитающие грибы: базидиомицет *Stropharia rugosoannulata* и аскомицет *Fusarium oxysporum*, а также сорго веничное (*Sorghum bicolor*). Показана схожесть метаболических путей дегградации флуорантена и флуорена у исследованных грибов, включая образование 9-гидроксифлуорена, 2-карбоксібензальдегида и фталевой кислоты. Обнаружено, что естественные метаболиты базидиомицета *S. rugosoannulata* и продукты его дегградации ПАУ ингибировали развитие проростков сорго, тогда как метаболиты *F. oxysporum* стимулировали их, что указывает на различный тип взаимодействия исследованных грибов с растением. Наличие в среде ПАУ, продуктов их дегградации и грибных метаболитов повышало активность внутриклеточных пероксидаз сорго, что можно расценивать как реакцию растения на стресс. Выявленные катионные и анионные пероксидазы сорго окисляли метаболиты ПАУ, но различались по ряду каталитических свойств. Это указывает на то, что исследованные растительные пероксидазы могут участвовать на разных этапах детоксикации ПАУ. Таким образом, в случае несимбиотической растительно-грибной системы возможна сопряженная дегградация поллютантов. Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 16-14-00081– в части, касающейся грибов; при поддержке грантом РФФИ № 16-04-00351 в части, касающейся растений.

The degradation of PAHs by non-symbiotic plant-fungal systems

Pozdnyakova N.N., Dubrovskaya E.V., Bondarenkova A.D., Golubev S.N., Balandina S.A., Turkovskaya O.V.
Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

Fungi are an important component of ecosystems. They regulate the soil-forming processes and play a significant role in the degradation and detoxification of pollutants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Fungi, which degrade the lignin component of the wood, produce extracellular nonspecific oxidative enzymes. The result of their catalytic action is polar and water-soluble products which are more accessible to the soil microorganisms. In natural ecosystems soil-inhabiting basidio- and ascomycetes grow beside plants and interact with them; and these interactions vary from parasitism to symbiosis. PAHs and products of its fungal degradation can effect to the growth and development of plants. It can be the substrate of oxidative enzymes (primarily peroxidase), which roots exuded to rhizosphere. Oxidized metabolites of PAHs can penetrate to plant cells and undergo to transformations by peroxidases. During the study of non-symbiotic plant-fungal interactions, the comparative study of the metabolic pathways of PAH degradation by soil-inhabiting fungi: basidiomycete *Stropharia rugosoannulata* and ascomycete *Fusarium oxysporum* was conducted. The possibility of participation of *Sorghum bicolor* in this process was evaluated too. The similarity of metabolic pathways of degradation of fluoranthene and fluorene by the studied fungi, including the formation of 9-hydroxyfluorene, 2-carboxybenzaldehyde and phthalic acid, was showed. The natural metabolites of *S. rugosoannulata* and the products of degradation of PAHs by this fungus inhibited the development of sorghum sprouts, whereas metabolites of *F. oxysporum* stimulated them. It can indicate a different type of interaction of the studied fungi with plant. The PAH degradation products and fungal metabolites increased the activity of intracellular peroxidases of sorghum, which can regarded as a plant reaction to stress. The cationic and anionic forms of sorghum peroxidases oxidized PAH metabolites, but differed in some catalytic properties. Perhaps the studied plant peroxidases can participate in different steps of PAH detoxification. Thus, in the case of a non-symbiotic plant-fungal system, the coupled degradation of the pollutants is possible. This research was supported by a grant from the Russian Science Foundation, project no. 16-14-00081 (fungi experiments) and grant from Russian Foundation of Basic Researches, project no. 16-04-00351 (plant experiments).

Эволюционная география клубеньковых бактерий: молекулярные, популяционные и генно-инженерные аспекты

Проворов Н.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (ФГБНУ ВНИИСХМ), Санкт-Петербург, Россия

E-mail: provorovnik@yandex.ru

Клубеньковые бактерии (ризобии) характеризуются широчайшим географическим распространением и экологическим разнообразием, которые определяют интенсивную эволюцию их геномов, детектируемую на молекулярном, популяционном и филогенетическом уровнях. Ключевым фактором этой эволюции является воздействие на ризобии растений-хозяев, которые активируют возникновение новых микробных генотипов (мутагенные и рекомбиногенные эффекты), их закрепление в экосистемах (естественный отбор, генетико-автоматические процессы), а также продвижение в новые экологические зоны. Действие этих факторов будет рассмотрено нами на примере симбиосистем, образуемых бобовыми трибы Fabaea (роды *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus*, *Lens*, *Vavilovia*), которые вступают в симбиоз с видом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* и с некоторыми другими представителями пор. Rhizobiales. Будет показано, что эволюция ризобий определяется их циркуляцией в системах «растение-почва», а также совместной с хозяевами миграцией в новые географические зоны. Действие этих факторов сопряжено с внутригеномными перестройками ризобий и с горизонтальным переносом генов, причем их механизмы различаются на уровне макроэволюции (включает усложнение структурной организации микробного генома) и микроэволюции (ограничена изменениями первичных структур суп-генов, входящих в аксессуарную часть ризобияльного генома). Показана возможность использования бобово-ризобияльного симбиоза как модели для разработки ряда фундаментальных проблем эволюционной биологии, включая соотношение микроэволюции, видообразования и макроэволюции, а также роль естественного отбора в становлении новых типов структурно-функциональной и генетической организации (прогрессивной эволюции). Выявление общих и видоспецифичных закономерностей эволюции ризобий открывает перспективы развития симбиотической инженерии, направленной на повышение эффективности уже существующих симбиозов, а также и на создание принципиально новых надвидовых систем биотехнологического и природоохранного назначения.

Evolutionary geography of nodule bacteria: molecular, population and genetic engineering aspects

Provorov N.A.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia

Nodule bacteria (rhizobia) are characterized by the enormous geographical distribution and broad ecological diversity, which determine the intensive evolution of their genomes detected at the molecular, population and phylogenetic levels. The key factor for the intensive rhizobia evolution is the impact of their host plants, which elicit the emergence of new microbial genotypes (mutagenic and recombinogenic effects), their fate in the ecosystems (selective and stochastic processes) and migration into the novel ecological areas. The effects of these factors will be considered using the model symbioses formed by the legumes from Fabaea tribe (the genera *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus*, *Lens*, *Vavilovia*) associated with the species *Rhizobium leguminosarum* (bv. *viciae*) and with some other representatives of the Rhizobiales. In these symbioses, evolutionary processes are elicited by circulation of rhizobia in “plant-soil” systems and by the joint partners’ migration into new geographic zones. It will be shown that the rhizobia evolution activated by these factors is associated with intragenomic rearrangements and horizontal gene transfer, although their specific mechanisms differ at the levels of macroevolution (including the structural complication of the microbial genomes) and microevolution (limited by changes in the primary structures of sym genes representing the accessory parts of the rhizobial genomes). The possibility of using the legume-rhizobia symbiosis as a model for developing a number of fundamental problems of evolutionary biology, including the trade-off between microevolution, speciation and macroevolution, as well as the role of natural selection in the formation of new types of structural-functional and genetic organization (progressive evolution) will be considered. The identification of general and species-specific patterns of rhizobia evolution opens the prospects for the development of symbiotic engineering, aimed not only at increasing the effectiveness of existing symbiosis, but also on creating the essentially novel biosystems to be used in the biotechnological and environment-protective programs.

Нитрогеназная активность штаммов - азотфиксаторов и ее влияние на показатели содержания азота в грунте без растений

Рафикова Г.Ф., Четвериков С.П.
УИБ УФИЦ РАН, Уфа, Россия
E-mail: biolab316@yandex.ru

Фиксация азота и перевод его в доступные для растений соединения осуществляется благодаря жизнедеятельности микроорганизмов. Большую роль в этом играют микроорганизмы-азотфиксаторы. Если для клубеньковых бактерий характерна тесная связь с определенным видом бобового растения, то несимбиотические азотфиксирующие микроорганизмы имеют широкий круг растений-хозяев и способны к азотфиксации вне прикорневой зоны растений. Последняя группа микроорганизмов особенно интересна с точки зрения возможности их использования для обогащения почвы перед посевом растений.

В условиях модельного опыта было изучено влияние штаммов несимбиотических азотфиксирующих бактерий *Pseudomonas koreensis* ИБ-4, *Paenibacillus* sp. ИБ-1, *Paenibacillus ehimensis* ИБ-739, *Pseudomonas* sp. ИБ-182, *Ochrobactrum intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, *Azotobacter chroococcum* В-9029, различающихся по способности к фиксации молекулярного азота воздуха, на содержание общего азота и его минеральных форм в грунте вне ризосферы растений.

В результате проведенных исследований было отмечено постепенное снижение нитрогеназной активности в грунте без растений на протяжении 8 недель, что могло быть обусловлено в первую очередь снижением содержания в грунте легкодоступного источника углерода, падением численности азотфиксаторов в почве, а также накоплением в почве аммонийных соединений, ингибирующих активность нитрогеназной системы азотфиксирующих микроорганизмов.

Среди интродуцированных в грунт бактерий-азотфиксаторов штаммы *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 и *Paenibacillus* sp. ИБ-1 были отмечены как наиболее эффективные, проявляющие высокий уровень нитрогеназной активности. Содержание общего и аммонийного азота в грунте без растений в результате жизнедеятельности эффективных штаммов-азотфиксаторов значительно увеличивалось, изменения в содержании нитратного азота носили неоднозначный характер.

Таким образом, выявлены штаммы несимбиотических азотфиксирующих бактерий, способных к эффективной фиксации молекулярного азота воздуха вне ризосферы растений в условиях различных грунтов. Полученные данные указывали на возможность использования этих штаммов в качестве биоудобрения при подготовке почвы в короткие сроки к посеву растений.

Nitrogenase activity of nitrogen-fixing spectrum and its influence on nitrogen content in ground without plants

Rafikova G.F., Chetverikov S.P.
UIB UFRC RAS, Ufa, Russia

Fixation of nitrogen and its transfer to plant-accessible compounds is due to the vital activity of microorganisms. A big role in this is played by microorganisms-nitrogen fixers. If for nodule bacteria there is a close relationship with a certain type of legume plant, non-symbiotic nitrogen-fixing microorganisms have a wide range of host plants and are capable of nitrogen fixation outside the root zone of plants. The last group of microorganisms is especially interesting from the point of view of the possibility of using them to enrich the soil before sowing plants.

Under the conditions of the model experiment, the influence of strains of non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria *Pseudomonas koreensis* IB-4, *Paenibacillus* sp. IB-1, *Paenibacillus ehimensis* IB-739, *Pseudomonas* sp. IB-182, *Ochrobactrum intermedium* IB DT-5.3 / 2, *Azotobacter chroococcum* B-9029, differing in ability to fix molecular nitrogen of air, on the content of total nitrogen and its mineral forms in the soil outside the plant rhizosphere.

As a result of the studies, a gradual decrease in nitrogenase activity in soil without plants was noted for 8 weeks, which could be due primarily to a decrease in the content of an easily accessible carbon source in the soil, a decrease in nitrogen fixers in the soil, and also accumulation in the soil of ammonium compounds inhibiting activity nitrogenase system of nitrogen-fixing microorganisms.

Among the nitrogen-fixing bacterium introduced into the soil, the strains *Pseudomonas koreensis* IB-4 and *Paenibacillus* sp. IB-1 were noted as the most effective, exhibiting a high level of nitrogenase activity. The content of total and ammonium nitrogen in the soil without plants as a result of vital activity of effective nitrogen-fixing strains increased significantly, changes in the content of nitrate nitrogen were ambiguous.

Thus, strains of non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria that are capable of effectively fixing molecular nitrogen of air outside the plant rhizosphere under conditions of various soils are revealed. The obtained data indicated the possibility of using these strains as biofertilization in preparing the soil in a short time to plant the plants.

Биотехнология получения биопестицидов нового поколения на основе антимикробных белков и пептидов растительного и микробного происхождения

Рогожин Е.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
Москва, Россия

E-mail: rea21@list.ru

Известно, что одним из наиболее эффективных способов для ограничения развития и распространения возбудителей болезней и вредителей при интенсивном растениеводстве в рамках мирового сельскохозяйственного производства является применение средств защиты растений, преобладающая доля которых приходится на химические пестициды, действующие главным образом на насекомых, бактериальных и грибных патогенов. Вместе с тем на фоне возрастания численности населения на планете Земля также растут площади сельскохозяйственного назначения, занимаемые под так называемые жизненно необходимые культуры, которые обеспечивают продовольственную безопасность тех или иных стран. Это требует значительной корректировки имеющихся традиционных схем интенсивного растениеводства в аспекте интегрированной системы защиты культурных растений с целью достижения планируемых показателей по урожайности. Это, как правило, достигается за счет увеличения числа и кратности обработок пестицидами, а также их чередования, как отдельно, так и в виде так называемых баковых смесей. Даже в странах с развитой экономикой такой подход неизбежно приводит к повышенной «химической» нагрузке на биоценоз в целом, а также значительному повышению остаточных количеств пестицидов в конечной продукции сельскохозяйственного производства, что в дальнейшем влечет за собой крайне негативные последствия для ее конечных потребителей. Это выражается преимущественно, помимо возможных острых интоксикаций, в виде развития целого ряда хронических заболеваний, в том числе возрастает предрасположенность к онкологии. Стоит отметить, что на фоне использования химических средств для защиты растений, биологические меры занимают крайне небольшой процент и их использование имеет целый ряд ограничений, в связи с чем многие производители сельскохозяйственной продукции вынуждены либо полностью отказываться от них, либо «объединять» их с «химией». Предлагаемые нами подходы сочетают в себе использование рекомбинантных аналогов природных молекул – пептидных токсинов, выделенных из растений и микробов, обладающих антимикробными свойствами в качестве «основы для разработки препаративных форм экологически безопасных биопестицидов «нового поколения». Один из таких подходов – это получение секретлируемых целевых молекул путем микробиологического синтеза в эукариотической (дрожжевой) системе экспрессии как в виде отдельных молекул, так и в составе гибридного, или химерного, белка – тиореоксина. Работа поддержана грантом РФФИ (№ 16-34-60217_мол_а_дк).

Biotechnology for production of "next-generation" biopesticides based on plant and bacterial antimicrobial peptides

Rogozhin E.A.

Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

It is known that one of the most effective ways to limit the development and spread of pathogens and pests in intensive crop production within the framework of world agricultural production is the use of plant protection products, the predominant part of which is chemical pesticides, mainly affecting insects, bacterial and fungal pathogens. At the same time, against the backdrop of an increase in the population of the planet Earth, there are also growing agricultural areas occupied by the so-called vital cultures, which ensure the food security of various countries. Its requires a significant adjustment of the existing traditional schemes of intensive crop production in the aspect of an integrated crop protection system in order to achieve the planned yield indicators. This is usually achieved by increasing the number and multiplicity of treatments with pesticides, as well as alternating them, both separately and in the form of so-called tank mixtures. Even in advanced economies, such an approach inevitably leads to an increased "chemical" burden on the biocenosis as a whole, as well as a significant increase in the residual quantities of pesticides in the final agricultural production, which further has extremely negative consequences for its end users. This is expressed mainly, in addition to possible acute intoxication, in the form of the development of a number of chronic diseases, including a predisposition to oncology. It should be noted that against the background of the use of chemical agents for plant protection, biological measures occupy a very small percentage and their use has a number of limitations, which is why many producers of agricultural products are forced either to completely abandon them or "combine" them with "chemistry". The proposed approaches combine the use of recombinant analogs of natural molecules - peptide toxins isolated from plants and microbes that have antimicrobial properties as a "basis for the development of preparative forms of ecologically safe "next-generation" biopesticides. One such approach is the production of secreted target molecules by microbiological synthesis in a eukaryotic (yeast) expression system, either as individual molecules or as part of a hybrid, or chimeric, thiorhexin protein. The work is supported by the RFBR (grant no. 16-34-60217_mol_a_dk).

Получение и анализ трансгенных растений для биотехнологии и фармакологии

Рукавцова Е.Б., Алексеева В.В., Тарлачков С.В., Бурьянов Я.И.

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

E-mail: ruk@bibch.ru

Актуальной задачей биотехнологии растений является разработка нового поколения безопасных трансгенных растений-продуцентов биологически активных веществ. Нами получены и проанализированы растения табака с геном стилибенсинтазы винограда STS под контролем сильного конститутивного промотора CaMV 35SS. Экспрессия гена STS в трансгенных растениях показана с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Выявлено, что повышенная экспрессия гена STS приводила к уменьшению пигментации венчиков цветков трансгенных растений и уменьшению в них количества антоцианов. Обнаружено негативное влияние конститутивной экспрессии гена STS на развитие пыльцы трансгенных растений и семенную продуктивность. Для создания трансгенных растений томата с геном STS использовали экспланты семядолей и гипокотилей молодых проростков. Планируется анализ антиоксидантной активности полученных растений томата, а также эксперименты по определению устойчивости растений к ряду фитопатогенных бактерий и грибов.

Получен и проанализирован ряд трансгенных растений, экспрессирующих ген поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) под контролем различных промоторов. Получены растения табака и томата, содержащие ген HBsAg, модифицированный с учетом частоты встречаемости кодонов в растениях. Проанализировано поколение T2 этих растений методом ИФА. При использовании модифицированной последовательности гена HBsAg уровень экспрессии антигена в поколении T2 остался таким же, как и у исходных растений и достигал 0,05% от общего растворимого белка. У потомства трансгенных растений табака и томата, содержащих ген HBsAg под контролем промотора CaMV 35S с четырьмя энхансерами экспрессия гена HBsAg была в несколько раз выше (до 0,1% от общего растворимого белка). Полученные растения в дальнейшем могут быть использованы в качестве субстанции для получения вакцины против вируса гепатита В.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 16-08-00511.

Production and analysis of transgenic plants for biotechnology and pharmacology

Rukavtsova E.B., Alekseeva V.V., Tarlachkov S.V., Buryanov Ya.I.

Branch of Shemyakin&Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russia

The actual objective of plant biotechnology is the development of a new generation of safe transgenic plant-producers of biologically active substances. We have obtained and analyzed the tobacco plants with grape stilbene synthase STS gene under the control of the strong constitutive CaMV 35SS promoter. Expression of the STS gene in transgenic plants is shown by qRT-PCR. It was found that increased expression of the STS gene led to a decrease in the pigmentation and the amount of anthocyanins in corollas of transgenic flowers. The negative influence of the constitutive expression of the STS gene on the development of pollen of transgenic plants and seed productivity was revealed. To create transgenic tomato plants with the STS gene explants of cotyledons and hypocotyls of young seedlings were used. It is planned to analyze the antioxidant activity of tomato plants obtained, as well as experiments to determine the resistance of plants to a number of phytopathogenic bacteria and fungi.

A number of transgenic plants with expression of the surface antigen of the hepatitis B virus gene (HBsAg) under the control of various promoters has been obtained and analyzed. Tobacco and tomato plants containing the HBsAg gene, modified taking into account the codon frequency in plants, were obtained. The T2 generation of these plants was analyzed by ELISA. Using the modified sequence of the HBsAg gene, the level of expression of the antigen in the T2 generation remained the same as in the original plants and reached 0.05% of the total soluble protein. In the progeny of transgenic tobacco and tomato plants containing the HBsAg gene under the control of the CaMV 35S promoter with four enhancers, the expression of the HBsAg gene was several times higher (up to 0.1% of the total soluble protein). The resulting plants can be used as a substance for obtaining a vaccine against hepatitis B virus.

This study was supported by Russian Foundation for Basic Research (project no. 16-08-00511).

Роль эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus thuringiensis* в индукции системной устойчивости мягкой яровой пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*

Румянцев С.Д., Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В.

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

E-mail: Rumyantsev-Serg@mail.ru

Одним из основных вредителей пшеницы, ухудшающим качество урожая, считается злаковая тля, в частности наиболее распространенный на территории России вид - обыкновенная злаковая тля (*Schizaphis graminum* Rond.). В мерах борьбы против колюще-сосущих насекомых все чаще используются биопрепараты на основе стимулирующих рост растений бактерий (СРРБ). Однако эффективность действия биопрепаратов на основе СРРБ зависит от многих факторов, решающим из которых может оказаться эндофитность. Разработка биопрепаратов на основе СРРБ нацелена на комплексную защиту растений от широкого спектра патогенов и вредителей. Эта задача эффективно решается путем создания композиций из различных штаммов или видов микроорганизмов. Однако механизмы аддитивного защитного действия композиций СРРБ на устойчивость растений до конца не раскрыты, но предполагается, что решающее значение в этом может иметь независимая индукция различных гормональных сигнальных путей в растениях. В нашей работе обнаружена способность бактерий *Bacillus subtilis* Cohn. (штамм 26Д) и *Bacillus thuringiensis* Berliner (штаммы В-6066 и В-5689) негативно влиять на жизнедеятельность обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* Rond. Защитный эффект изученных штаммов *Bacillus* spp. проявлялся в прямой афидицидной активности и в опосредованной индукции системной устойчивости в растениях. Наибольшую афидицидность к вредителю проявил штамм *B. th.* В-6066, вызывая смертность более 50% особей в популяции. Обнаружено положительное влияние бактерий рода *Bacillus* на генерацию перекиси водорода, активность пероксидазы и синтез фенольных соединений и лигнина в растениях пшеницы, инфицированных обыкновенной злаковой тлей *S. graminum*. Анализ накопления транскриптов генов белков защитного ответа НАДФН-оксидазы (RBOH), ингибиторов протеиназ (PR-6), пероксидазы (PR-9), фенилаланинаминий лиазы (PAL) и липоксигеназы (LOX) показал, что штаммы *B. thuringiensis* индуцировали гены жасмонат-зависимого (PR-6, LOX, PR-9), а штамм *B. subtilis* - салицилат-зависимого (RBOH, PAL, PR-9) сигнальных путей. В растениях обработанных композицией трех штаммов обнаружено накопление мРНК всех изученных генов, что предполагает одновременную индукцию жасмонат- и салицилат-зависимых сигнальных путей и, возможно, обеспечивает аддитивное влияние изученных штаммов *Bacillus* spp. на устойчивость пшеницы к вредителю. Работа выполнена в рамках госзадания № 0246-2018-0035 и при финансовой поддержке РФФИ № 17-29-08014.

The role of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis* in the induction of systemic resistance of spring wheat to the greenbug aphid *Schizaphis graminum*

Rumyantsev S.D., Veselova S.V., Burkhanova G.F., Maksimov I.V.

Institute of biochemistry and genetics of Ufa Federal Research Centre RAS, Ufa, Russia

Cereal aphids are one of the main pests of wheat, which spoil the quality of the crop. The most prevalent species of aphids is a greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. Bioinsecticides based on the plant growth- promotion bacteria (PGPB) are used increasingly against sucking insects. However, the effectiveness of the bacterial strains depends on many factors. The use of endophytic bacteria is the most effective technique to defense against phloem sap feeding insect. Complex protection of plants from a wide range of pathogens and pests is the purpose of biocontrol agents based on the PGPB. This problem can be effectively solved by creating compositions from various strains or species of microorganisms. Nevertheless, the mechanisms of the additive protective effect of the PGPB mixtures on plant resistance are not fully understood. However, it is assumed that independent induction of various hormonal signaling pathways in plants can be crucial.

In our work, bacteria *Bacillus subtilis* Cohn. (strain 26D) and *Bacillus thuringiensis* Berliner (strains B-6066 and B-5689) adversely affected the viability of greenbug aphid *Schizaphis graminum*. The studied strains of *Bacillus* spp. showed direct aphidic activity and indirect protective effect on induction of systemic resistance in plants. The strain *B. th.* B-6066 was the most toxic to aphids causing mortality higher than 50%. A positive effect of *Bacillus* spp. strains

on the generation of hydrogen peroxide, the activity of peroxidase, and the synthesis of phenolic compounds and lignin in wheat plants infected with *S. graminum* was found. Analysis of transcripts level of PR-proteins genes, such as NADPH oxidase (RBOH), proteinase inhibitor (PR-6), peroxidase (PR-9), phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and lipoxygenase (LOX) showed that *B. thuringiensis* strains induced jasmonate- dependent (PR-6, LOX, PR-9), and *B. subtilis* strain-salicylate-dependent (RBOH, PAL, PR-9) signaling pathways. The mRNAs accumulation of all the studied genes in plants treated with the composition of three strains was found. Thus, we observed the simultaneous induction of jasmonate- and salicylate-dependent signaling pathways and additive effect of the studied strains of *Bacillus* spp. on the defense response of wheat plants to the aphids. The work was supported by grant of RFBR № 17-29-08014.

JetGene: интернет-ресурс для формирования и анализа узкоспецифичных наборов нуклеотидных последовательностей

¹Садовская Н.С., ²Мустафаев О.Н., ¹Тюрин А.А., ¹Голденкова-Павлова И.В.

¹Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

²Бакинский государственный университет, Баку, Азербайджан

E-mail: nataliya.sadovskaya@gmail.com

За последнее десятилетие резко возросло количество полностью и частично завершенных геномных и транскриптомных проектов, покрывающих огромное разнообразие живых организмов. Это привело к созданию многочисленных баз данных с обширным объемом информации о нуклеотидных и аминокислотных последовательностях. Однако с их помощью, без применения дополнительных вспомогательных программ, затруднительно сформировать выборки последовательностей по критериям, отвечающим специфическим запросам экспериментатора. Нами создан, пополняется и поддерживается JetGene, охватывающий сведения о шести группах живых организмов, включая растения. JetGene – многофункциональный интернет-ресурс, который позволяет создавать и анализировать узкоспецифичные выборки нуклеотидных последовательностей, исходя из запроса пользователя. Дружественный интерфейс JetGene включает в себя графическое отображение результатов и дает возможность получить итоговый набор последовательностей в fasta-формате. Пользователь может сформировать многоступенчатый запрос и провести сравнительный анализ кодирующих (CDS и cDNA) и некодирующих последовательностей (5'- и 3'-UTR) по 10 основным (size, CpG island, GC-content, nucleotide by position, nucleotide A/C/G/T, gene and transcript names, chromosome, strain, motifs) и трем вспомогательным (aminoacid position, codon position, codon usage) параметрам. Пользователь может получить разнообразные варианты биологических текстов, отвечающие нетривиальным сочетаниям параметров. Также реализована возможность загрузить имеющуюся выборку или создать выборку de novo, проанализировать полноразмерную последовательность либо ее усеченный вариант. Это существенно упрощает предварительный анализ и последующую работу экспериментатора. Поскольку биологическая информация имеет решающее значение для наук о жизни, в том числе и биотехнологических и биомедицинских исследований, созданный ресурс может обеспечить исследователя необходимыми данными и стать фундаментом, на котором в дальнейшем будет строиться наше понимание о принципах функционирования живых систем. JetGene свободно доступен по ссылке <https://jetgene.bioset.org/>.

JetGene – Internet resource for creation and analysis of individual sets of nucleotide sequences

¹Sadovskaya N.S., ²Mustafaev O.N., ¹Tyurin A.A., ¹Goldenkova-Pavlova I.V.

¹Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia.

²Baku State University, Baku, Azerbaijan

Amount of fully and partially completed genomic and transcriptomic projects for huge number of living organisms have rapidly increased for last decade. It has resulted in creation of numerous databases that contain massive set of information from nucleotide and amino acid sequences. However, they don't give an opportunity to form nucleotides sequences collections according to various parameters conforming nontrivial queries of the experimenter without additional software.

We have created and now we update and support JetGene that embraces information about six main living organism groups, including Plants. It is a multifunctional Internet-resource that allows you to generate and analyze individual sets of nucleotide sequences, according to user criteria. Friendly JetGene's interface includes both numerical and graphical displaying of results and allows you to obtain final sequences collection in fasta-format. The researcher can create a comprehensive request and implement a comparative analysis of coding (CDS and cDNA) and non-coding (5'- and 3'-UTR) with help of 10 main (size, CpG island, GC-content, nucleotide by position, nucleotide A/C/G/T, gene and transcript names, chromosome, strain, motifs) and tree additional (aminoacid position, codon position, codon usage) parameters. The data obtained at one stage of the analysis can be used at subsequent stages without extracting from JetGene. So the researcher can obtain different biological texts variants satisfying non-trivial parameters combinations. Moreover it is possible to load an existing sample of nucleotides sequences or to create a sample de novo, to analyze full-length or shortened-length sequences. This facilitates preliminary analysis and further work of the experimenter greatly. Since biological information is crucial for life sciences, including biotechnology and biomedical research, the resource created can provide the researcher with the necessary data and become the foundation on which our understanding of the principles of functioning of living systems will be built in the future. JetGene is publicly available at <https://jetgene.bioset.org/>.

Роль гена *MtN5 Medicago truncatula* в формировании бобово-ризобиального симбиоза

Садькова Л.Р., Вершинина З.Р.

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

E-mail: lianka4444@mail.ru

На начальном этапе формирования бобово-ризобиального симбиоза бактерии родов *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* и *Sinorhizobium* продуцируют факторы клубенькообразования – Nod-факторы. Основной эффект, вызываемый Nod-факторами – индукция скручивания корневых волосков и деления клеток. Исследования транскриптома *M. truncatula* показали, что группа небольших цистеин-богатых белковых переносчиков липидов – LTPs, активизируется на ранних этапах образования симбиоза. Белки переноса липидов представляют собой группу богатых цистеином белков, названных так за их способность связывать и облегчать перенос липидов между плазматическими мембранами *in vitro*. LTPs растений являются небольшими, основными белками, содержащими N-концевой сигнальный пептид, направляющий зрелый белок на секреторный путь. Эти белки обратимо связывают липиды и доставляют их к месту назначения. Исходя из особенностей структурной организации растительные LTPs подразделяются на два семейства: LTP1 с молекулярной массой 9-10 кДа и LTP2 с молекулярной массой 7 кДа. Согласно имеющимся данным, LTPs растений обладают антимикробной активностью *in vitro*, и индукция их синтеза происходит при инфицировании патогенами. Также имеются данные о том, что LTPs участвуют в образовании симбиоза между ризобиями и бобовыми растениями. У *Medicago truncatula* MtN5 является представителем данного семейства, данный белок экспрессируется на ранних этапах симбиоза между *Medicago truncatula* и *Sinorhizobium meliloti*, а также после заражения *Fusarium semitectum*. MtN5 участвует в процессах, происходящих в эпидермисе после действия Nod-факторов и активации фосфолипазы D. Положительный контроль действия MtN5 проявляется в стимулировании клубенькообразования. Одновременно с этим под действием MtN5 уменьшается количество инфекционных нитей. Гиперэкспрессия гена MtN5 в трансгенных растениях приводит к повышению их устойчивости против широкого круга патогенов. Таким образом, белок MtN5 определен как ранний маркер ризобиального симбиоза. Исследование функций гена MtN5 представляется необходимым для выяснения его роли в образовании симбиотических отношений между ризобиями и бобовыми, что в дальнейшем позволит расширить спектр подходов к созданию новых эффективных бобово-ризобиальных симбиозов, а также даст возможность переноса данной симбиотической модели на небобовые растения. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов РФФИ-Инициативный - № 16-04-00902 А и РФФИ №18-34-00033 мол_а.

The role of the *MtN5* gene of *Medicago truncatula* in the formation of legume-rhizobia symbiosis

Sadykova L.R., Vershinina Z.R.

Institute of Biochemistry and genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

At the initial stage of the formation of the legume-rhizobia symbiosis, the bacteria of the genera *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Sinorhizobium* produce the factors of nodule formation - Nod factors. The main effect caused by Nod factors is the induction of twisting of root hairs and division of cells. Studies of the transcriptome of *M. truncatula* showed that a group of small cysteine-rich proteins carriers of lipids - LTPs, is activated in the early stages of symbiosis formation. Lipid transport proteins are a group of cysteine-rich proteins, named for their ability to bind and facilitate lipid transfer between plasma membranes *in vitro*. Plant's LTPs are small, basic proteins containing the N-terminal signal peptide, directing the mature protein to the secretory pathway. These proteins reversibly bind the lipids and deliver them to their destination. Based on the characteristics of the structural organization, plant's LTPs is divided into two families: LTP1 with a molecular weight of 9-10 kDa and LTP2 with a molecular weight of 7 kDa. According to available data, plant's LTPs have antimicrobial activity *in vitro*, and induction of their synthesis occurs when infected with pathogens. There is also evidence that LTPs are involved in the formation of a symbiosis between rhizobia and leguminous plants. In *Medicago truncatula*, MtN5 is a member of this family, this protein is expressed in the early stages of symbiosis between *Medicago truncatula* and *Sinorhizobium meliloti*, and after infection with *Fusarium semitectum*. MtN5 participates in processes occurring in the epidermis after the action of Nod-factors and activation of phospholipase D. Positive control of the action of MtN5 is manifested in stimulating nodule formation. At the same time, the number of infectious filaments decreases with the action of MtN5. Hyperexpression of the MtN5 gene in transgenic plants leads to an increase in their resistance against a wide range of pathogens. Thus, the MtN5 protein is defined as an early marker of rhizobial symbiosis. The study of the functions of the MtN5 gene seems necessary to clarify its role in the formation of symbiotic relationships between rhizobia and legumes, which in future will expand the range of approaches to creating new effective legume-rhizobia symbioses, and will also enable to transfer of this symbiotic model to non-legumes plants. This work was performed with support from the Russian Foundation for Basic Research (projects № 16-04-00902 A and №18-34-00033).

Анализ структурного разнообразия *nod* генов в субпопуляциях *Sinorhizobium meliloti* – симбионтов люцерны

Саксаганская А.С., Мунтян В.С., Румянцева М.Л.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин-8, Россия

E-mail: allasaksaganskaya@mail.ru

Бобово-ризобийный симбиоз основан на взаимодействии сигнальных молекул, синтезируемых растением-хозяином и клубеньковыми бактериями (ризобиями). Со стороны ризобий такими сигнальными молекулами являются Nod-факторы – липохитоолигосахариды, синтез которых детерминирован *nod* генами, локализованными на симбиотической мегаплазмиде SMA. Среди *nod* генов выделяют «общие» (*nodA*, *nodB* и *nodC*), обнаруженные у всех видов клубеньковых бактерий, а также специфичные для определенных видов ризобий. Например, ген *nodH*, детерминирующий сульфатирование молекулы Nod-фактора у клубеньковых бактерий *Sinorhizobium meliloti*. Структурный полиморфизм указанных *nod* генов был проанализирован у 368 природных штаммов *S. meliloti* методом ПЦР-ПДРФ. Штаммы были выделены непосредственно из клубеньков дикорастущих растений-хозяев (далее К-изоляты, или К-субпопуляция), а также методом host-plant trapping из почвенных образцов (далее П-изоляты, или П-субпопуляция). Соотношение К- и П-изолятов составило 182:186, соответственно. Среди «общих» *nod* генов наиболее консервативным оказался ген *nodC*, детерминирующий длину молекулы Nod-фактора. Вместе с тем, уровень его разнообразия был в 1.5 раза выше в П-субпопуляции (согласно значениям коэффициента гетерогенности Нея (N) и индекса разнообразия Шеннона (H)). В случае гена *nodB* уровень разнообразия, наоборот, был выше у изолятов из К-, чем из П-субпопуляции (H=1.37 и 1.08, соответственно). Уровень разнообразия гена *nodA* был сходно высоким у штаммов из обеих субпопуляций. Уровень структурного полиморфизма гена *nodH* оказался выше у К-, чем у П-изолятов (H=1.30 и 1.23, соответственно). Более высокий уровень разнообразия этого гена, продукт которого отвечает за сульфатирование молекулы Nod-фактора, может быть связан с проявляемым штаммами признаком – хозяйская специфичность по отношению к определенному виду растения-хозяина. В результате анализа выявлены различия в структурном разнообразии как «общих», так и видоспецифичного *nod* генов между штаммами из «клубеньковой» и «почвенной» субпопуляций *S. meliloti*. Высокая доля редко встречающихся ПДРФ-типов *nod* генов в К-субпопуляции может являться результатом отрицательного частотно-зависимого отбора штаммов клубеньковых бактерий со стороны растения-хозяина, что согласуется с представленными в литературе данными анализа штаммов ризобий, колонизирующих клубеньковую нишу. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 17-04-02011а и 18-04-01278а.

Analysis of *nod* genes structural diversity in subpopulations of *Sinorhizobium meliloti* - symbionts of alfalfa

Saksaganskaia A.S., Muntyan V.S., Roumiantseva M.L.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Pushkin-8, Russia

The legume-rhizobial symbiosis is based on the interaction of signal molecules synthesized by both the host plants and by nodule bacteria (rhizobia). On the rhizobium side, such signal molecules are Nod factors – lipochitoooligosaccharides, the synthesis of which are determined by *nod* genes located on the symbiotic megaplasmid SMA. Among *nod* genes there are a group of "common" *nod* genes represented by *nodA*, *nodB* and *nodC*. This group of genes have been found so far in all nodule bacteria. There are also some *nod* genes specific for certain rhizobia species. For example, *nodH* gene, which determines the sulfation of Nod-factor molecule in nodule bacteria *Sinorhizobium meliloti*. The structural polymorphism of these *nod* genes was analyzed in 368 native strains of *S. meliloti* by the PCR-RFLP method. Strains were isolated directly from nodules of wild-growing host plants (hereinafter N-isolates, or N-subpopulation), and also "trapped" by the host-plant from soil samples (hereinafter T-isolates, or T-subpopulation). The ratio of N- and T-isolates was 182:186, respectively. Among the "common" *nod* genes, the *nodC* gene, determining the length of the Nod-factor molecule, was the most conservative. While, the level of *nodC* gene structural diversity was 1.5 times higher in the T-subpopulation (according to the values of the Nei's heterogeneity coefficient (N) and Shannon's diversity index (H)). In the case of the *nodB* gene, the level of diversity, was on the contrary, higher among N-isolates than among T-isolates (H=1.37 and 1.08, respectively). The level of diversity of the *nodA* gene was similarly high in both subpopulations. The level of structural polymorphism of the *nodH* gene was higher in N- than in T-isolates (H=1.30 and 1.23, respectively). A higher level of diversity of this gene, the product of which is responsible for the sulfation of the Nod-factor molecule, may be related to rhizobia host specificity towards certain host plant species. Summarizing, the differences in the structural diversity of both "common" and species-specific *nod* genes between native isolates of *S. meliloti* recovered from nodules or trapped from soil samples were revealed. A high portion of rarely *nod* - RFLP types encountered in the N-subpopulation was a result of a negative frequency-dependent selection of rhizobia by host plants that is consistent with the literature data about the analysis of rhizobium strains colonizing the nodule niche. This work was supported by RFBR grants 17-04-02011a and 18-04-01278a.

Влияние состава питательной среды на метаболитный профиль экстрактов из культур различных штаммов *Alternaria japonica*

¹Салимова Д.Р., ²Золотухина А.С., ¹Берестецкий А.О.

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

²Санкт-Петербургский государственный технологический институт, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: d.salimova@vizr.spb.ru

Грибы рода *Alternaria* являются продуцентами разнообразных по структуре и спектру действия биологически активных веществ (БАВ), в частности, фитотоксинов и микотоксинов. Некоторые *Alternaria* spp. способны образовывать метаболиты с инсектицидными свойствами. Объект исследования гриб *A. japonica* – патоген растений рода *Raphanus* и некоторых других культурных и сорных крестоцветных. Целью работы является характеристика БАВ, образуемых этим грибом. В задачи исследования входило: оптимизация методики экстракции БАВ и изучение влияния состава жидкой питательной среды на метаболитный профиль экстрактов из культурального фильтрата (КФ) гриба различных штаммов *A. japonica*. Для подбора эффективной методики экстракции БАВ штамм 181-011 *A. japonica* культивировали на жидкой среде ДМГ в течение 3 недель при постоянной температуре (24°C) и переменном освещении. Грибные метаболиты извлекали из КФ, предварительно доведенного до различных уровней pH, растворителями различной полярности. Метаболитные профили экстрактов анализировали методами ТСХ и ВЭЖХ. Оценку инсектицидной активности экстрактов определяли против злаковой тли. Далее в работе использовали еще 4 штамма *A. japonica* (253-011, 259-011, 239-011, 244-011). Их культивировали на различных жидких средах (ДМГ, Чапека, Сабуро и M1D); экстракты были получены хлористым метиленом при нейтральном значении pH КФ и этилацетатом после его подкисления до pH 2. Основную часть метаболитов, экстрагируемых методом жидкость-жидкостной экстракции, составили полярные соединения кислой природы. Из экстракта подкисленного фильтрата культуры *A. japonica* 181-011 нами была выделена N-ацетилантраниловая кислота. В концентрации 1 мг/мл вызывала гибель более 50% насекомых через 24 ч после обработки. Анализ метаболитных профилей экстрактов из культур различных штаммов *A. japonica* показал их воспроизводимость в повторностях эксперимента. На метаболитный профиль полученных экстрактов влиял и состав питательной среды, и происхождение штаммов *A. japonica*. Максимальную вариабельность ТСХ-паттернов экстрактов в зависимости от состава питательной среды продемонстрировал штамм 253-011, несколько меньшую – 239-011 и 259-011. ТСХ-профили экстрактов из КФ различных штаммов *A. japonica* на среде ДМГ были менее вариабельными, чем при культивировании на средах Сабуро и M1D. Экстракты из культур 181-011 и 244-011 содержали схожий набор экзометаболитов независимо от состава питательной среды. Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 17-04-01445).

Effect of the composition of the nutrient environment on the metabolical profile of extracts from the culture of different strains of *Alternaria japonica*

¹Salimova D. R., ²Zolotuhina A. S., ¹Berestetskiy A. O.

¹All-Russian Research Institute of Plant Protection (VIZR), Saint-Petersburg, Pushkin, Russia

²Saint-Petersburg State Technological Institute, Saint-Petersburg, Russia

Fungi of the genus *Alternaria* are producers of a broad spectrum of biologically active substances (BAS), in particular, phytotoxins and mycotoxins. Some *Alternaria* spp. are able to produce metabolites and with insecticidal properties. The object of our research is *A. japonica*, a pathogen of plants of the genus *Raphanus* and some other cultivated and weedy cruciferous plants. The aim of the work is to characterize BAS produced by this fungus. The research tasks included: optimizing the extraction of BAS from *A. japonica*, and studying the effect of the composition of the liquid nutrient medium on the metabolite profile of extracts from cultures of various fungal strains. To select an effective method for extracting BAS from strain 181-011, *A. japonica* was cultured on a liquid medium of YMG for 3 weeks at a constant temperature (24° C) and 12-h photoperiod. Fungal metabolites were extracted from the culture filtrate previously adjusted to different pH levels with solvents of different polarity. The metabolic profiles of the extracts were analyzed by TLC and HPLC methods. The insecticidal activity of the extracts was assessed against wheat aphid. Further four more strains of *A. japonica* (253-011, 259-011, 239-011, 244-011) were used in the work. They were cultivated on four different liquid nutrient media (YMG, Czapek, Saburo and M1D); extracts were obtained by methylene chloride at neutral pH of the culture liquid and ethyl acetate after acidification to pH 2. The major part of metabolites extracted by liquid-liquid extraction was polar compounds of acidic nature. From the extract obtained from the acidified filtrate of the culture of fungus 181-011 *A. japonica*, we isolated N-acetylanthranilic acid. At a concentration of 1 mg/ml, it caused the death of more than 50% of the insects 24 hours after treatment. Analysis of metabolic profiles of extracts from cultures of different strains of *A. japonica* showed their reproducibility in replicates of the experiment. The metabolic profile of the extracts was influenced not only by the composition of the nutrient medium, but also by the origin of *A. japonica* strains. The maximum variability of TLC patterns of extracts, depending on the composition of the liquid nutrient medium, was demonstrated by strain 253-011, somewhat smaller - strains 239-011, 259-011. TLC profiles of extracts from the cultures filtrate of various fungal strains *A. japonica* on YMG medium were less variable than in cultivation on Saburo and M1D media. Extracts from cultures 181-011 and 244-011 contained a similar set of secondary metabolites, regardless of the composition of the liquid nutrient medium. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 17-04-01445).

Влияние оксикоричных кислот на рост колоний и размножение клеток эндофитных представителей *Bacillus subtilis*

Сарварова Е.Р., Хайруллин Р.М.
ИБГ УФИЦ РАН, Уфа, Россия
E-mail: sarvarova_lena@mail.ru

Известно, что оксикоричные кислоты (ОК) обладают фунгистатичным (фунгицидным) свойством, а синтез лигнина с участием ОК является одним из успешных механизмов защиты растений от деструкции клеточных стенок ферментами фитопатогенов. В то же время, ОК, накапливаясь как предшественники лигнина или продукты его деградации, способны влиять и на жизнедеятельность мутуалистических эндофитных бактерий-антагонистов. Так, показано, что ОК способны менять физико-химические поверхностные свойства бактериальных клеток, поверхностный заряд, целостность бактериальной цитоплазматической мембраны, а в больших концентрациях обладают антимикробным действием. Вместе с тем, бактерии *Bacillus subtilis* способны использовать феруловую кислоту и ее производные - ванилин, ванильную кислоту в качестве единственного источника углерода, а многие грам-отрицательные бактерии способны разрушать эту молекулу. Информация о характере действия ОК на эндофитных представителей бактерий *Bacillus* в литературе не встречается. В связи с этим мы изучали влияние *in vitro* феруловой и кумаровой, а также сиригной кислот на рост колоний и размножение двух эндофитных штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ. Установлено, что введение кумаровой и феруловой кислот (10-1000 мкг/л) в плотную питательную среду ингибировало рост колоний эндофитов. Сильнее всего рост колоний ограничивала феруловая кислота (10 мкг/л). В то же время, при введении ОК в жидкую среду наблюдалась стимуляция роста бактерий. Активнее всего стимулировали размножение клеток феруловая (100 мкг/л), а также сиригная кислоты. Такие различия в проявлении характера действия ОК на бактерии в разных средах могут быть связаны с изменением подвижности бактериальных клеток на твердых средах, а также активации метаболизма (деления) в жидких средах под действием этих соединений. Эти и другие вопросы влияния ОК на жизнедеятельность эндофитов будут обсуждаться в представленных материалах.

Oxycinnamic acids action on colonies growth and on cells reproduction of endophytic *Bacillus subtilis* bacteria.

Sarvarova E.R., Khairullin R.M.
IBG UFRC RAS, Ufa, Russia

It is known that the oxycinnamic acids (OA) possess antifungal activities, and lignin synthesis is one of successful mechanisms with participation of OA for plant protection against enzymatic destruction of cellular walls by phytopathogens. At the same time, OA, accumulating as predecessors of lignin or products of his degradation, are capable to act also on activity of the mutualistic endophytic antagonistic bacteria. So, it is shown that OA are capable to change physical and chemical surface properties of bacterial cells, the surface charge, integrity of a bacterial cytoplasmic membrane and in high concentrations possess antimicrobial action. At the same time, *Bacillus subtilis* bacteria are capable to use ferulic acid and its derivatives - vanillin, vanilla acid as the carbon source, and many gram-negative bacteria are capable to destroy this molecules. Information about OA action on the endophytic *Bacillus* bacteria in scientific literature doesn't meet. In this work we studied *in vitro* influence of ferulic and coumaric, also syringic acids on growth of colonies and on reproduction of two endophytic *B. subtilis* strains 26D and 11BM. It is established that introduction of ferulic, syringic and coumaric acids (10-1000 µg/l) to solid agar nutrient medium inhibited growth of bacterial colonies. Colonies growth was limited by ferulic acid (10 µg/l) most strongly. At the same time, if OA was introduced in liquid medium stimulation of reproduction of bacteria was observed. Ferulic (100 µg/l), also syringic (100 µg/l) acids stimulated bacterial cell reproduction most actively. Such differences in manifestation of nature of OA action on bacteria in different mediums can be connected with change of mobility of bacterial cells on solid medium and also with metabolism (cells division) activation in liquid medium under the action of these substances. These and other questions of OA action on activity of endophytes will be discussed in the presented materials.

Культивирование *in vitro* микроспоридии *Paranosema locustae* как основа для создания микробиологического препарата защиты растений от вредных саранчовых

Сендерский И.В., Павлова О.А.
ФГБНУ ВИЗР, г. Санкт-Петербург, Россия
E-mail: senderskiy@mail.ru

Микроспоридии - облигатные внутриклеточные паразиты, одни из самых распространенных возбудителей болезней насекомых. В системе защиты растений микроспоридии рассматриваются как перспективные агенты, позволяющие предотвратить вспышки численности насекомых-вредителей (Vejornson, Oi, 2014). Микроспориозы насекомых, как правило, имеют хронический характер и редко приводят к резкому снижению численности популяции хозяев этих паразитов. Так, инфекция, вызываемая микроспоридией *P. locustae* у перелетной саранчи приводит к замедлению развития, снижению плодовитости и увеличению смертности, а также препятствует появлению стадной фазы у своего хозяина. Споры *P. locustae* послужили основой коммерческого препарата для долговременной защиты пастбищ от вредных саранчовых (Henry, 1981). Тем не менее, применение микроспоридий для регуляции численности насекомых-вредителей затруднено в связи с недостаточным объемом знаний о молекулярных механизмах патогенного воздействия таких внутриклеточных паразитов на своих хозяев. В настоящее время на примере *P. locustae* показана возможность такого воздействия при помощи белков, секретлируемых паразитом в клетку хозяина. Однако роль каждого из них в патогенезе пока не установлена. Изучение молекулярных факторов патогенности микроспоридии *P. locustae* планируется производить на экспериментальной системе *in vitro* культивирования этого паразита в коммерчески доступной Sf9 клеточной линии, полученной из зачатка яичника *Spodoptera frugiperda*. Возможность культивирования *P. locustae in vitro* была показана ранее в другой клеточной линии. Нами были отработаны методы асептического выделения спор *P. locustae*, полученных из живых зараженных насекомых и антисептической обработки спор из мертвых, определены стимулы и оптимальные условия экструзии полярной трубки, осуществлено успешное заражение Sf9 клеток. В дальнейшем нами планируется добиться высокой экстенсивности заражения, а также долговременной циркуляции паразита в культуре. Предложенный подход позволит нам, во-первых, набирать необходимое количество инфекционного материала, во-вторых, изучить влияние секреторных белков *P. locustae* на метаболизм зараженных клеток и, в-третьих, проводить селекцию отличающихся по вирулентности изолятов этого паразита. Исследование поддержано проектом РФФ 16-14-00005.

***In vitro* propagation of *Paranosema locustae* as a base for creation of microbiological plant protection formulation against locust**

Senderskiy I.V., Pavlova O.A.
FSBSI VIZR, St. Petersburg, Russia

Microsporidia are obligate intracellular parasites, some of the most common pathogens of insects. In biological control microsporidia are considered to be promising agents in preventing outbreaks of insect pests. Microsporidiosis of insects are generally chronic and rarely lead to a rapid mortality in the population of the owners of these parasites. Thus, *P. locustae* infection in locusts leads to a slowdown in development, a reduced fecundity and an increase in mortality, as well as prevents the of a gregarious phase in its host. *P. locustae* spores were applied in a commercial formulation for long-term biological control of rangeland grasshoppers. Nevertheless, the use of microsporidia in pest biocontrol is difficult due to the lack of knowledge about the molecular mechanisms of pathogenic effects of these intracellular parasites on their hosts. Currently, the existence of such a molecular mechanisms was shown on the example of *P. locustae*. It is mediated by a number of parasite's proteins that are secreted into the host cell. However, the role of each of them in the pathogenesis has not yet been established. The study of the molecular pathogenicity factors of *P. locustae* microsporidia is planned to be carried out on the experimental system *in vitro* of cultivation of this parasite in a commercially available sf9 cell line derived from the pupal ovary *Spodoptera frugiperda*. The possibility of cultivation of *P. locustae in vitro* has been shown previously in other cell lines. We have worked out methods of aseptic isolation of *P. locustae* spores obtained from living infected insects and antiseptic treatment of spores from the dead ones, determined stimuli and optimal conditions of extrusion of the polar tube, carried out the successful infection of Sf9 cells. In future, we plan to achieve a high prevalence of infection, as well as long-term circulation of the parasite in the culture. The proposed approach will allow us, firstly, to develop the necessary amount of infectious material, secondly, to study the effect of secretory *P. locustae* proteins on the metabolism of infected cells and, thirdly, to select isolates of this parasite that differ in virulence. The research is supported by Russian Science Foundation grant #16-14-00005.

Создание векторной конструкции pJN105Turbo-pph6¹Сербаева Э.Р., ²Хакимова Л.Р., ²Лавина А.М., ²Садыкова Л.Р., ²Вершинина З.Р., ²Баймиев Ал.Х.¹ФГБОУ ВО Башкирский государственный университет, Уфа, Россия²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

E-mail: lili-nigmatullina@bk.ru

Фиторемедиация – является экологичным и относительно недорогим методом очистки загрязненных почв от тяжелых металлов (ТМ). Одной из задач в фиторемедиации является создание эффективных растительно-микробных систем, где микроорганизмы способствуют выживанию растений в стрессовых условиях, как, например, при высоких концентрациях ТМ в почве. Существуют устойчивые к действию ТМ микроорганизмы, в том числе и PGPR-микроорганизмы (от Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – ризобактерии, способствующие росту растений). Ввиду этого кроме выбора растения-гипераккумулятора также важно создание таких ризобактерий, обладающих полезными для растений свойствами, например, генами псевдофитохелатинов, которые потенциально могут повысить доступность ТМ для растений. Целью работы было получение векторной конструкции на основе плазмиды pJN105TurboGFP, несущей псевдофитохелатиновый ген *pph6*, для экспрессии данного гена в различных штаммах клубеньковых бактериях *Rhizobium leguminosarum*. Для конструирования и клонирования псевдофитохелатинового гена *pph6*, были синтезированы соответствующие комплементарные друг другу олигонуклеотидные блоки: P6ph1 и P6ph2. С помощью коротких праймеров P6F и P6R амплифицировали кодирующую часть гена *pph6*. Затем амплифицированную ДНК клонировали в плазмиду pJN105TurboGFP вместо гена флуоресцентного белка *gfp* под управление сильного конститутивного промотора фага T5. В результате была получена векторная конструкция pJN105Turbo-*pph6*. Далее для получения трансформированных штаммов клубеньковых бактерий были выбраны 5 штаммов ризобий, обладающие ростостимулирующей активностью по отношению к редьке масличной и амаранту (основные растения-гипераккумуляторы): *R. leguminosarum* bv. *trifolii* THy1, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* THy2, *R. leguminosarum* VSy3, *R. leguminosarum* VPi106, *R. leguminosarum* VSy12. Таким образом, для дальнейших исследований получен вектор pJN105Turbo-*pph6* и рекомбинантные по гену *pph6* 5 штаммов ризобий, обладающих ростостимулирующей активностью по отношению к редьке масличной и амаранту. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов РФФИ-Инициативный - № 16-04-00902 А и РФФИ №18-34-00033 мол_а.

Creation a vector construct pJN105Turbo-pph6¹Serbaeva E.R., ²Khakimova L.R., ²Lavina A.M., ²Sadykova L.R., ²Vershinina Z.R., ²Baymiev Al.Kh.¹Bashkir State University, Ufa, Russia²Institute of Biochemistry and Genetics UFRS RAS, Ufa, Russia

Phytoremediation is an environmentally friendly and inexpensive method for cleaning soils contaminated by heavy metals (HM). One of the tasks in phytoremediation is the creation of effective plant-microbial systems, where microorganisms contribute to the survival of plants under stressful conditions, as, for example, at high concentrations of HM in the soil. There are microorganisms resisting to the action of HM, including PGPR-microorganisms (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). In view of this, in addition to choosing the superaccumulator plant, it is also important to create modified rhizobacteria (with plant-friendly properties), for example, rhizobacteria transformed with pseudophytochelatin genes that potentially increase the availability of HM for plants. The aim of the work was to obtain a vector construct based on the plasmid pJN105TurboGFP, which carries the pseudophytochelatin gene *pph6*, for the expression of this gene in various strains of nodule bacteria *Rhizobium leguminosarum*. For the construction and cloning of the pseudophytochelatin gene *pph6*, the corresponding complementary oligonucleotide blocks were synthesized: P6ph1 and P6ph2. Using short primers P6F and P6R, the coding portion of the *pph6* gene was amplified. Then the amplified DNA was cloned into the plasmid pJN105TurboGFP instead of the fluorescent protein gene *gfp* under the control of the constitutive promoter of phage T5. As a result, the vector construct pJN105Turbo-*pph6* was obtained. Further, to obtain transformed strains of nodule bacteria, 5 strains of rhizobia were selected that had possessed growth-stimulating activity in relation to the radish and amaranth (HM superaccumulator plants): *R. leguminosarum* bv. *trifolii* THy1, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* THy2, *R. leguminosarum* VSy3, *R. leguminosarum* VPi106, *R. leguminosarum* VSy12. Thus, for further studies, the vector pJN105Turbo-*pph6* and recombinant rhizobium strains, transformed with *pph6* gene and possessing growth-stimulating activity in relation to radish and amaranth, were obtained. This work was performed with support from the Russian Foundation for Basic Research (projects № 16-04-00902 A and №18-34-00033).

Микробиологические препараты "НВП "БашИнком" для оздоровления почвы и защиты растенийСергеев В.С.¹

ООО "НВП "БашИнком", Уфа, Россия

E-mail: sergeev-vs@mail.ru

Ключевым элементом управления фитосанитарным состоянием посевов является контроль основных хозяев почвы - состава почвенных микроорганизмов, так как состояние микробиоты является основой жизни в почве для культурных растений, обеспечивающей стабильность качественных и количественных показателей их урожая. При недостатке количества эффективных антагонистов фитопатогенной микрофлоры в почве, необходимо регулярное внесение биологических препаратов, содержащих полезную почвенную микробиоту на протяжении всего периода вегетации растений, включая обработку растительных остатков после уборки урожая.

В биопрепаратах и удобрениях производства НВП БашИнком (Фитоспорин, Стерня-12, Богатый, Борогум и др.) содержатся эффективные антагонисты фитопатогенной микрофлоры, которые в течение всего вегетационного периода способствуют оздоровлению почвы.

Опыты, проведенные в ряде хозяйств Республики Башкортостан и других регионах России, показывают, что их применение способствует санации растительных остатков, повышению супрессивности и улучшению пищевого режима почвы, а также повышению урожайности сельскохозяйственных культур на 10-15 %.

Microbiological preparations of The Scientific and Innovation Enterprise "BashInkom " for soil improvement and plant protectionSergeev V.S.¹¹ООО "NVP" BashInkom "Ufa, Russia

A key element in the phytosanitary control of crops is the control over the main soil hosts - soil microorganisms, as the state of the microbiota is the living base for cultivated plants in the soil, which ensures the stability of qualitative and quantitative indicators of the yield. If phytopathogenic microflora in the soil lacks effective antagonists, it is necessary to regularly use biological preparations containing useful soil microbiota throughout the vegetative period of plants, including treatment of plant residues after harvesting.

Biopreparations and fertilizers produced by the BashInkom (Fitosporin, Sternya-12, Bogaty, Borogum, etc.) contain effective antagonists of the phytopathogenic microflora, which promote an enhanced soil health throughout the growing season.

Experiments conducted in a number of farms in the Republic of Bashkortostan and other Russian regions show that the use of biopreparations contributes to the sanitation of plant residues, increase in suppressiveness and improvement of soil nutritional conditions, as well as to the growth of crop yields by 10-15%.

Влияние штаммов бактерий из многолетнемерзлых пород на количество пигментов фотосинтеза в проростках *Avena sativa* L.

Симонова Е.О., Субботин А.М.
ТюмНЦ СО РАН, Тюмень, Россия
E-mail: mailsimonova@gmail.com

Изучали влияние штаммов бактерий из многолетнемерзлых (м/о из ММП) пород на количество пигментов фотосинтеза в проростках *Avena sativa* L. в условиях засоления субстрата.

В результате скрининговых экспериментов из коллекции микроорганизмов ТюмНЦ СО РАН были отобраны 12 штаммов для дальнейшего исследования по изучению стрессоустойчивости растений в условиях хлоридного засоления. Семена замачивали в суспензии м/о из ММП в течение 60 минут (в концентрации 10^7 - 10^9 м.к/мл), высевали в прокаленный кварцевый песок, засоленный 0,98% раствором NaCl, и проращивали при температуре $24 \pm 2^\circ\text{C}$ и фотопериоде 10 часов. В качестве контрольных вариантов использовали семена без инокуляции бактериями в идентичных условиях культивирования. На 21 сутки спектрофотометрическим методом определяли количество хлорофилла а, хлорофилла b и каротиноидов в 100 г зеленой части растений. Из анализа полученных данных следует, что только в одном опытном варианте, с использованием штамма 10/50ts, сумма пигментов фотосинтеза возросла на 16% относительно контроля. Для определения уровня стресса мы определяли отношение хлорофилл а к хлорофиллу b (показатель стрессуемости). В варианте с использованием штамма 10/50ts данный показатель был достоверно ниже контрольного уровня. Такой низкий показатель стрессуемости был обусловлен повышенной концентрацией каротиноидов. Для определения уровня стрессоустойчивости растений мы использовали показатель отношения суммы хлорофиллов к каротиноидам. По сравнению контрольным вариантом, в варианте с использованием штамма 10/50ts не было отмечено значимого повышения показателя стрессоустойчивости, тогда как при сравнении с другими опытными вариантами это показатель был повышен. Вероятно, положительное влияние данного штамма на устойчивость растений к токсическому стрессу обусловлено способностью активизировать антиоксидантную защиту растений через стимуляцию синтеза каротиноидов. Данный штамм запатентован Пат. № 2607028.RU. C1.

Effect of the bacteria strains from permafrost on a number of photosynthesis pigments in seedling of *Avena sativa* L.

Simonova E. O., Subbotin A. M.
Tyumen Scientific Centre SB RAS, Tyumen, Russia

Soil salinity is one of the abiotic factors providing negative influence for a plants growth. Salts ions presented in the root layer affect osmotic stress, lipid peroxidation processes (LPO) activation, destruction of thylakoid membranes in chloroplasts, and photosynthetic activity decrease. The plant ability to control the level of ROS can substantially affects the plant resistance to soil salinization.

Bacteria can increase the resistance of plants to unfavorable environmental factors. We hypothesized that microorganisms exposed the long-term adaptation in permafrost may have high biological activity.

As a test object for studying the morphophysiological indices of plants with a strains of the bacteria from permafrost we used seedlings of oat seed *Avena sativa* L.

For a further study of the plants stress tolerance under chloride salinity conditions, there is a selection of 12 strains from the collection of microorganisms of the Tyumen Scientific Center of the SB RAS, as the results of the screening experiments and analysis of morphometric characteristics of *Avena sativa* L. seedlings.

The seeds were soaked for 60 minutes in a suspension of microorganisms from permafrost (at a concentration of 10^7 - 10^9 mc / ml), plated in calcined quartz sand, salted with 0.98% NaCl solution, and germinated at a temperature of $24 \pm 2^\circ\text{C}$ and a photoperiod of 10 hours. Seeds without inoculation with bacteria under identical cultivation conditions were used for a control. On day 21, the amount of chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids in 100 g of the green part of the plants was determined spectrophotometrically.

Follows the analysis of the obtained data, only one experiment, using strain 10/50ts, demonstrated increasing sum of photosynthesis pigments by 16% relative to control sample.

To estimate stress level we determine relation between chlorophyll a and chlorophyll b (as a stress level indicator). With a strain of 10/50ts, this indicator was substantially lower than a control level. Probably, a low rate of stiffness due to an increased concentration of carotenoids, contributing to the elimination of excess ROS. To determine the level of plants stress resistance, we use the ratio of the sum of chlorophylls to carotenoids. Compared to the control, in the variant using the strain 10/50ts there was no significant increase of the stress-resistance index, while this indicator was increased in comparison with other experiments results.

Probably, the positive effect of this strain on the resistance of plants to toxic stress is due to the ability to activate the antioxidant protection of plants through stimulation of the synthesis of carotenoids.

This strain is patented by Pat. № 2607028.RU. C1.

Протекторный эффект эндофитных бактерий к действию тяжелых металлов

¹Смирнова Ю.В., ¹Курамшина З.М., ²Хайруллин Р.М.

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный университет», Стерлитамакский филиал, Стерлитамак, Россия

²Уфимский Федеральный исследовательский центр РАН, Уфа, Россия

E-mail: bh84@mail.ru

Фитотоксичность тяжелых металлов (ТМ), как известно, связана с развитием окислительного стресса. Образование активных форм кислорода ведет к перекисному окислению липидов (ПОЛ), ингибированию активности ферментов, повреждению нуклеиновых кислот и последующей гибели клеток. Исследования доказывают, что микроорганизмы способны повышать устойчивости растений к стрессовым факторам, в том числе к ТМ. Нами изучено влияние инокуляции семян горчицы белой (*Sinapis alba* L., Рапсодия) клетками *B. subtilis* штамма 11ВМ на устойчивость растений к действию Cd, Ni и Pb. Растения выращивали в вегетационных сосудах с выщелоченным черноземом. В почву ТМ вносили в виде растворов однократно после посева семян в следующих концентрациях: Cd и Ni - 10, 200 мг/кг, Pb - 10, 1500, 3000 мг/кг почвы. Контрольные растения поливали дистиллированной водой. Измерение сырой биомассы и отбор проб проводили на 30 сутки. Интенсивность ПОЛ в растительных тканях определяли спектрофотометрически по содержанию малонового диальдегида (МДА).

В ходе экспериментов было показано, что низкие концентрации никеля и свинца стимулировали рост растений, тогда как, кадмий не оказывал заметного влияния. Высокие концентрации ингибировали рост растений, наиболее сильное токсическое действие из исследованных металлов оказывал кадмий. Растения горчицы, семена которых были обработаны бактериями, характеризовались более высокими ростовыми показателями, чем необработанные, как в присутствии ТМ, так и при росте в чистой почве.

Нами было установлено, что под действием ионов ТМ в тканях растений происходило накопление МДА, коррелирующее с ростом концентрации металлов в почве. У растений горчицы, семена которых были инокулированы клетками бактерий *B. subtilis* 11ВМ, при воздействии ТМ (как при низких, так и при высоких концентрациях) уровень МДА был выше, по сравнению с необработанными растениями. Повышение содержания МДА свидетельствует, как известно, об усилении интенсивности ПОЛ и повреждении клеточных мембран. Таким образом, одним из механизмов протекторного эффекта бактерий в отношении исследованных растений горчицы в условиях воздействия ТМ является снижение уровня ПОЛ и сохранение стабильности мембран растительных клеток

Protecting effect of endophytic bacteria to the heavy metals action

¹Smirnova Yu. V., ¹Kuramshina Z. M., ²Khairullin R. M.

¹Sterlitamak Branch, Bashkir State University, Sterlitamak, Russia

²Ufa Federal research centre of RAS, Ufa, Russia

It is known that the phytotoxicity of heavy metals (TM) is associated with the development of oxidative stress. The formation of reactive oxygen species leads to lipid peroxidation (LPO), inhibition of enzyme activity, damage to nucleic acids, and subsequent cell death. Studies prove that microorganisms are able to increase the resistance of plants to stress factors, including TM. We studied the effect of inoculation of white mustard seeds (*Sinapis alba* L., Rhapsody) by cells of *B. subtilis* strain 11BM (VNIISKHM, no. 519) on the resistance of plants to the action of Cd, Ni and Pb. Plants were grown in vegetation pots with leached chernozem. TM was applied in the soil as a solution once after seeding in the following concentrations: Cd and Ni -10, 200 mg / kg, Pb -10, 1500, 3000 mg / kg soil. The control plants were watered with distilled water. Measurement of wet biomass and sampling was carried out on 30th day. The intensity of LPO in plant tissues was determined spectrophotometrically according to the content of malonic dialdehyde (MDA). During the experiments it was shown that low concentrations of nickel and lead stimulated plant growth, whereas cadmium did not have a noticeable effect. High concentrations inhibited the growth of plants, the strongest toxic effect of the metals studied was provided by cadmium. Plants of mustard, the seeds of which were treated by bacteria, showed higher growth indices than untreated, both in the presence of TM and with growth in clean soil. We found that under the action of TM ions in plant tissues, accumulation of MDA occurred correlating with an increase in the concentration of metals in the soil. In mustard plants, the seeds of which were inoculated by cells of *B. subtilis* 11BM bacteria, when exposed to TM (at both low and high concentrations), the MDA level was higher than in untreated plants. The MDA content increase indicates the intensification of LPO and damage to cell membranes. Thus, one of the mechanisms of the bacterial protective effect on the investigated mustard plants under the TM action is a decrease in the level of LPO and the preservation of the stability of plant cell membranes.

Оптимизация условий культивирования эндофитных фосфатсольбилизирующих бактерий, перспективных в качестве инокулянтов растений

Соловьева Е.А., Алещенкова З.М.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

E-mail: ekatya@tut.by

Эндофитными называются микроорганизмы, колонизирующие внутренние ткани растения, не вызывая при этом заболеваний и не оказывая отрицательного влияния на его развитие. К эндофитным бактериям, выделяемым из надземных, подземных частей растений и семян, относятся представители различных родов: *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rahnella*. Обладая спектром полезных свойств (фиксация атмосферного азота, сольubilизация труднорастворимых соединений, синтез фитогормонов, антибиотиков и др. метаболитов), эндофиты являются перспективными биотехнологическими объектами. Ранее нами из эндосферы пшеницы и сои выделены и отобраны 2 перспективных штамма эндофитных бактерий, обладающие фосфатсольбилизирующей, ростстимулирующей, антимикробной и колонизирующей способностью и идентифицированные на основании морфологических, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических исследований как *Pantoea agglomerans* 6SK и *Pseudomonas fluorescence* 11E. Целью данной работы была оптимизация условий культивирования отобранных наиболее активных штаммов эндофитных бактерий. В периодической глубинной культуре в шейкере-инкубаторе «WY-111» подобраны следующие оптимальные параметры культивирования изучаемых штаммов эндофитных бактерий: питательная среда – Мейнелла, объем среды – 1000 мл, аэрация – 100 об./мин, температура – 28°C, pH = 7, количество посевного материала – 10% от объема среды, время культивирования – 24 ч. Титр жизнеспособных клеток при данных условиях составлял для штаммов *Pantoea agglomerans* 6SK и *Pseudomonas fluorescence* 11E $2,6 \cdot 10^9$ и $4,0 \cdot 10^9$ КОЕ/мл соответственно. Таким образом, подобранные оптимальные условия культивирования способствуют быстрому росту и высокой продуктивности эндофитных фосфатсольбилизирующих бактерий, перспективных в качестве инокулянтов сельскохозяйственных культур.

Optimization of conditions for cultivation of endophytic phosphate-solubilizing bacteria – promising agents for plant inoculation

Solovyova E., Aleschenkova Z.

Institute of Microbiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus

Microorganisms colonizing internal plant tissues and not causing pathologic or other adverse effects on host development are termed endophytic species. Representatives of various genera *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rahnella* isolated from the top and underground parts of plants and seeds may be referred to endophytic bacteria. Endophytes possessing a whole spectrum of valuable properties (fixation of atmospheric nitrogen, mobilization of hardly soluble compounds, synthesis of phytohormones, antibiotics, other metabolites) are attractive objects for biotechnological studies. Earlier we isolated from wheat and soybean endosphere and selected 2 promising strains of endophytic bacteria showing phosphate-solubilizing, growth-stimulating, antimicrobial, colonizing capacity and further identified as *Pantoea agglomerans* 6SK and *Pseudomonas fluorescence* 11E based on results of morphological, physiological-biochemical and molecular-genetical studies. Aim of this research was optimization of cultural conditions for the selected active endophytic bacterial strains. The following parameters were defined for the batch submerged culture of endophytic bacteria in shaking incubator WY-111: Meynell's nutrient medium, volume – 1000 ml, aeration rate – 100 rpm, temperature – 28°C, pH 7.0, inoculum amount – 10% of total volume, fermentation time – 24h. Titer of viable cells constituted $2.6 \cdot 10^9$ and $4.0 \cdot 10^9$ CFU/ml for *Pantoea agglomerans* 6SK and *Pseudomonas fluorescence* 11E, respectively. Summing up, the optimized cultural conditions promoted rapid growth and high productivity of endophytic phosphate-solubilizing bacteria – promising agents for inoculation of agricultural crops.

***In vitro* культуры шлемника байкальского, как источник физиологически активных веществ**

Степанова А.Ю., Соловьева А.И., Евсюков С.В., Сидоров Р.А.

Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

E-mail: step_ann@mail.ru

Шлемник байкальский – лекарственное растение, экстракты из корней которого обладают широким спектром фармакологического действия, благодаря наличию гликозидов – байкалина и вогонозида и их агликонов байкалеина и вогонина. Наибольшее содержание флавонов содержится в корнях 3–5-летних растений, что значительно удлиняет сроки получения сырья. Кроме этого, существует угроза сокращения общего ареала обитания шлемника из-за антропогенного воздействия и изменения климата. В связи с этим внимание исследователей привлекают биотехнологические подходы, т.е. культивирование растительного материала в условиях *in vitro*. Известно, что синтез вторичных метаболитов зависит от различных факторов, в том числе, от способа культивирования и от степени дифференцировки, что имеет как практический, так и теоретический интерес. Целью настоящей работы было изучение содержания основных флавонов шлемника байкальского в дифференцированных (hairy roots) и недифференцированных культурах (каллусах и суспензиях) при разных способах культивирования (на твердой и в жидкой среде). Hairy roots выращивали на среде по Гамборгу без гормонов, каллусы и суспензии на среде с гормонами (1 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л кинетина). Показано, что во всех культурах, выращенных на твердой питательной среде, преобладал гликозид байкалин, максимальное содержание которого наблюдалось в каллусах, и составляло 14 мг/г сухого веса на 3 неделе культивирования. Содержание второго гликозида - вогонозида было больше в hairy roots (до 3 мг/г сухого веса, в каллусах - 0,3–0,4), но, в целом, его содержание было ниже по сравнению с содержанием байкалина. В суспензионной культуре ко второй неделе культивирования увеличивалось содержание байкалина – до 30 мг/г сухого веса и вогонозида – до 7 мг/г. Перенос hairy roots в жидкую среду сопровождался сменой доминирующего гликозида байкалина на вогонозид, содержание которого в течение цикла культивирования было стабильным и составляло 18–22 мг/г сухого веса, содержание байкалина, наоборот, резко менялось в течение цикла культивирования и, в целом, было ниже, чем вогонозида. Таким образом, культуры *in vitro* являются перспективным источником биологически активных флавонов, наибольшее содержание которых наблюдается на жидких средах. Недифференцированные каллусы и суспензии сохраняют основные метаболиты вне зависимости от плотности среды. В то время как hairy roots является более лабильной культурой, чутко реагирующей на смену условий культивирования.

***In vitro* cultures of *Scutellaria baicalensis* as a source of physiologically active substances**

Stepanova A.Yu., Solovyeva A.I., Evsyukov S.V., Sidorov R.A.

Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The Baikal skullcap is an important medicinal plant, the roots extracts from that have a broad spectrum of pharmacological activity on human organism due to the presence of the four main flavones: glucuronides – baicalin and wogonoside and their aglycones – baicalein and wogonin. The highest content of biologically active compounds has been found in the roots of 3 to 5-year old plants that significantly extends the terms of obtaining the biomass suitable for medical use. Moreover, general skullcap habitat might be reduced by anthropogenic impact and climate change. Thereby the researchers' attention is attracted by biotechnological approaches (cultivation of plant material *in vitro* conditions).

It is known the secondary metabolites synthesis depends on various factors – the cultivation methods and the tissue differentiation stage. The goal of our investigation was the study of content of the main Baikal skullcap flavones in differentiated (hairy roots) and undifferentiated cultures (calli and suspensions) on solid and liquid media. Hairy roots have been grown in a Gamborg medium without hormones, calli and suspensions - on a medium with hormones addition (1 mg/l 2,4-D and 1 mg/l kinetin). Have been shown the baicalin concentration was significantly higher than that of the other flavones in all cultures grown on a solid medium. The maximum baicalin content have been observed in the calli (14 mg/g dry weight at the 3 week cultivation). The content of the second glucuronide - wogonoside was higher in the hairy roots (up to 3 mg / g dry weight, in the calli - 0.3–0.4 mg/g), but overall wogonoside content was lower than that of baicalin. In the suspension culture, the baicalin content increased to 30 mg/g dry weight and wogonoside content to 7 mg/g at the second week of cultivation. The transfer of hairy roots to the liquid medium have been accompanied by a change of the dominant glucuronide from the baicalin to the wogonoside, the content of that is stable during the cultivation cycle (18–22 mg/g dry weight). The baicalin content, on the contrary, has changed drastically during the cultivation cycle and, in general, is lower than the wogonoside content. Thus, *in vitro* cultures are a promising source of biologically active flavones. The highest content of flavones has been observed in liquid media. The main metabolites not changes in undifferentiated tissues (calli and suspensions) regardless of the medium density, while in hairy roots that might changes because they are more sensitive to the cultivation conditions.

Генетические основы конструирования высокоспецифичных симбиотических систем гороха посевного (*Pisum sativum* L.)

¹Сулима А.С., ¹Жуков В.А., ¹Афонин А.М., ^{1,2}Тихонович И.А.

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: Asulima@arriam.ru

Представители семейства Бобовые (*Fabaceae*) вступают в симбиоз с почвенными азотфиксирующими бактериями (ризобиями), образуя на корнях симбиотические клубеньки. Развитие клубенька происходит в несколько стадий и контролируется сложной системой растительных генов. Посредством молекулярного диалога по принципу "гена на ген", т.е. обмена комплементарными сигналами с последовательным запуском физиологических ответов, растения ограничивают круг возможных симбионтов, взаимодействуя лишь с наиболее «подходящими» ризобиями.

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) является уникальным объектом для изучения специфичности бобово-ризобияльного симбиоза. В ходе анализа природных популяций гороха были идентифицированы генотипы, обладающие повышенной избирательностью к ризобиям. Речь идёт о так называемых «афганских» формах гороха из Передней Азии, способных взаимодействовать лишь с отдельными штаммами *Rhizobium leguminosarum*. Было показано, что данный признак контролируется растительным геном *Sym2*, продукт которого вовлечён в рецепцию сигнальной молекулы бактерий – Nod-фактора. В дальнейшем в ходе экспериментального мутагенеза были получены линии гороха с нарушениями симбиоза как на ранних (RisNod4 и K24, демонстрирующие фенотип, сходный с "афганским"), так и на поздних этапах (P61 и P63, образующие неэффективные клубеньки), фенотип которых мог быть супрессирован воздействием определенных штаммов ризобий. Вероятно, подобный эффект достигается за счёт уникальных генов, позволяющих бактериям образовывать симбиоз «в обход» канонических сигнальных путей. Хотя такие свойства могут приводить к появлению паразитических штаммов, эффективно проникающих в растение, но не способных к фиксации азота, они также имеют важное прикладное значение. Расшифровка механизмов преодоления бактериями дефектов рецепции и морфогенеза клубеньков со стороны растения может послужить основой для проектирования искусственных систем узнавания симбионтов по типу «ключ-замок». Такие системы можно использовать для повышения эффективности микробных препаратов, поскольку растение будет образовывать симбиоз не с аборигенной почвенной микрофлорой, а исключительно с привнесённым штаммом, обладающим требуемыми свойствами. Работа поддержана грантами РФФИ 16-16-00118, РФФИ 17-76-30016 и РФФИ 18-34-00844 мол_а.

Genetic basis for construction of high-specific symbiotic systems of garden pea (*Pisum sativum* L.)

¹Sulima A.S., ¹Zhukov V.A., ¹Afonin A.M., ^{1,2}Tikhonovich I.A.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia

St.Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

Representatives of the family Fabaceae (legumes) can participate in symbiosis with soil nitrogen-fixing bacteria (rhizobia) forming so-called symbiotic nodules on the roots. Development of the nodule occurs in several stages and is controlled by a complex system of plant genes. Through a molecular dialogue based on "gene-to-gene" principle, i.e. the exchange of complementary signals and the sequential trigger of physiological responses, plants limit the range of possible symbionts, interacting only with the most "suitable" rhizobia. Garden pea (*Pisum sativum* L.) is a unique object for studying the specificity of legume-rhizobial symbiosis. During the analysis of natural populations of cultivated and wild pea, genotypes with increased selectivity to microsymbiont were identified. They are the so-called "Afghan" forms of pea from the Middle East able to interact only with particular strains of *Rhizobium leguminosarum*. It was shown that this trait is controlled by the plant gene *Sym2*, the product of which is involved in the reception of the main symbiotic signaling molecule of bacteria – the Nod factor. Later in the course of experimental mutagenesis pea lines were obtained with the disturbances of symbiosis either at the early (RisNod4 and K24 demonstrating a phenotype similar to "Afghan" one) or later stages (P61 and P63, forming ineffective nodules), the phenotype of which could be suppressed by exposure to certain rhizobium strains. Probably, this effect is achieved due to unique genes that allow bacteria to form a symbiosis "bypassing" the canonical signaling pathways. Although these properties can potentially lead to the appearance of parasitic strains that effectively inoculate the plant but are not capable of fixing nitrogen, they also have practical importance. Deciphering the mechanisms that allow bacteria to overcome the defects in the reception and morphogenesis of nodules in plant can serve as a basis for the design of artificial "key-lock" recognition systems for symbionts. Such systems can be used to increase the effectiveness of microbial preparations, since the plant will form a symbiosis not with an indigenous soil microflora, but exclusively with an introduced strain possessing the required properties. This work was supported by the Russian Science Foundation (grants # 16-16-00118 and # 17-76-30016) and Russian Foundation for Basic Research (grant # 18-34-00844 mol_a).

Новые технологии получения биопрепаратов для защиты растений

Титова Ю.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

E-mail: juli1958@yandex.ru

В разработке технологий получения современных биопрепаратов для защиты растений, в течение длительного времени сохраняющих жизнеспособность клеток штамма-продуцента и высокую целевую активность, этапы оптимизации питательных сред и условий культивирования являются основными. Существуют различные технологические приемы получения биопрепаратов с использованием жидких питательных сред и твердых субстратов. Высокая технологичность последних достигается путем их многократного использования – биоконверсии, в особенности, когда речь идет об отходах сельского хозяйства и лесоперерабатывающей промышленности. Эти отходы непосредственно не могут быть использованы большинством штаммов-продуцентов биопрепаратов из-за высокого содержания в них лигнин-целлюлозного комплекса – наиболее труднодоступной для разрушения части растительных отходов. Их доступность увеличивается после первичной биоконверсии макромицетами, способными к активному разложению лигноцеллюлозного комплекса. При этом происходит обогащение малоценных растительных отходов грибным белком и легкоусвояемыми углеводами, используемыми при вторичной биоконверсии штаммами-продуцентами биопрепаратов. Поэтому в последнее время одним из перспективных направлений становится разработка новых мультиконверсионных технологий превращения отходов в биопрепараты с использованием макромицетов, последовательно микромицетов и бактерий – их штаммов-продуцентов. Мультиконверсионные технологии – совокупность технологических процессов с участием биоты, при которых отходы одних используются как сырье для других, что обеспечивает их частичную утилизацию на каждом этапе. Методологическая база таких технологий представлена экспериментальными оценками эффективности, теоретическим обоснованием возможностей мультибиоконверсии отходов сельского хозяйства и промышленности ксилотрофными макромицетами, гумусовыми сапротрофами и 22-я микроорганизмами – штаммами-продуцентами биопрепаратов. Получены лабораторные образцы биопрепаратов и оценена их эффективность в тест-системах. Разработаны Технические условия и регламенты получения и применения мультиконверсионных биопрепаратов для защиты растений. В научном плане осуществляется разработка динамической модели биоконверсии субстратов для получения биологических средств защиты растений.

New technologies for obtaining biologics used in plant protection

Titova J.A.

All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, Russia

During technologies developing to obtain the modern biologics for plant protection with a long time preserving the cells' viability of the producer strain and high target activity, the steps of optimizing the nutrient media and cultivating conditions are basic. There are various technological methods for biologics obtaining using liquid nutrient media and solid substrates. High technological ability of the latter ones is achieved through their repeated use – biorecycling, especially where the agriculture and timber processing industries' wastes are concerned. These wastes can't be used directly by the most biologics' strain-producers due to the high content of lignin-cellulose complex in them – the most recalcitrant part of the plant waste. Their availability increases after primary biorecycling by macromycetes, capable to active lignocellulosic complex's destruction. In this case, the enrichment of low-value plant wastes with fungal protein and easily assimilated carbohydrates, used in the secondary biorecycling by biologics' strain-producers occurs. Therefore, to date the one of the promising directions is the development of new multibiorecycling technologies for the wastes' conversion into biological products using macromycetes, sequentially micromycetes and bacteria – their strain-producers. Multibiorecycling technologies – a totality of technological processes involving biota, in which waste is used as raw material for others, which ensures their partial utilization at each stage. The methodological basis of such technologies is represented by experimental efficiency estimates, theoretical justification of agriculture and industry wastes' multibiorecycling possibilities by xylophilic macromycetes, humic saprotrophs and 22th microorganisms – biologics' strain-producers. Laboratory samples of biologics were obtained and their effectiveness in test systems was evaluated. Technical specifications and laboratory operating procedures for obtaining and using the multibiorecycling biologics for plant protection have been developed. In the research, a dynamic model of substrates' biorecycling is being developed for the biological means producing used in plant protection.

Мобилизация объединенных генетических систем микроорганизмов и растений

Тихонович И.А.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Россия

Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: ARRIAM2008@yandex.ru

Симбиотические отношения все больше становятся предметом фундаментального изучения и практического использования. Стабильность геномов эукариот и высокая степень их синтенности заставляет ставить вопрос о том, как на основании столь ограниченного разнообразия генетических детерминант и их неизменности в пределах онтогенеза одного индивидуума можно обеспечить широкую пластичность реакций. Возможно, ответ лежит в области доступности для организма не только собственной генетической информации, но и той, которая содержится вообще на Земле: генетические факторы можно привлекать извне в соответствии с экологическими требованиями, а также сбрасывать их детерминанты при исчезновении необходимости. Таким образом происходит реализация принципа дополнительности геномов высших организмов генетическими детерминантами прокариот. Неоцененные и, видимо, неисчерпаемые резервы генов существуют в виде микробиомов со своим метагеномом в различных экологических нишах, особенно обширных в почве. Количество и разнообразие генетической информации, которая содержится в почве, на несколько порядков, как минимум, превосходит то, что известно у эукариот. Само происхождение растений тесно связано с привлечением микроорганизмов - цианобактерий, которые ныне в эукариотической клетке существуют в виде регулярных органелл - пластид, функция которых, фотосинтез, постоянно необходима растению. В отношении же других адаптаций, которые необходимы в меняющихся условиях окружающей среды, требуется привлекать сожителей для временного взаимодействия – экологически облигатного. Классическим примером таких адаптаций является биологическая фиксация азота. Способностью восстанавливать до аммиака молекулярный азот атмосферы обладают исключительно микроорганизмы, имеющие т.н. *nif*-оперон. Бобовые растения выработали способность вступать в симбиоз с таковыми сожителями путем образования на корнях клубеньков, в которых и происходит процесс азотфиксации. Но потребность в этом возникает только в условиях дефицита этого элемента в почве, поэтому растение системно регулирует необходимость построения и достаточность симбиотического аппарата. Список функций, которые выполняют симбиотические организмы, постоянно растет, и мобилизация этих генетических потенций является задачей современного земледелия. Проблемы и решения в связи с конструированием высокоэффективных микробно-растительных систем будут рассмотрены в докладе.

Mobilization of the combined genetic systems of microorganisms and plants

Tikhonovich I.A.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Russia

St.Petersburg State University, St.Petersburg, Russia

Symbiotic relationships are increasingly becoming the subject of fundamental study and practical use. The stability of the genomes and the high degree of their synteny make it necessary to raise the question of how, on the basis of such a limited diversity of genetic determinants and their invariance within the ontogeny of one individual, it is possible to ensure the broad plasticity of responses. It is possible that the solution lies in the field of accessibility for the organism not only of its own genetic information, but also of that which is contained in general on the Earth: genetic factors could be attracted from outside in accordance with environmental requirements, as well as their determinants could be thrown away when the need disappears. Thus, the principle of complementarity of the genomes of higher organisms with genetic determinants of prokaryotes is being realized in nature. Invaluable and apparently inexhaustible reserves of genes exist in the form of microbiomes with their own metagenomes in various ecological niches, which are especially extensive in the soil. The amount and variety of genetic information that is contained in the soil by several orders of magnitude at least exceeds what is known in eukaryotes. The very origin of plants is closely associated with the involvement of microorganisms - cyanobacteria, which now exist in the eukaryotic cell in the form of regular organelles - plastids, whose function, photosynthesis, is constantly needed by the plant. In relation to other adaptations that are necessary in changing environmental conditions, it is required to involve cohabitants for temporary interaction – so forming ‘ecologically obligatory’ symbiosis. A classic example of such adaptations is the biological fixation of nitrogen. The ability to restore to ammonia the molecular nitrogen of the atmosphere is possessed exclusively by microorganisms that have a so-called *nif* operon. Legume plants have developed the ability to enter into symbiosis with such cohabitants by forming nodules on the roots, in which the nitrogen fixation process takes place. But the need for this arises only in conditions of deficiency of this element in the soil, therefore the plant systematically regulates the necessity of building of the symbiotic apparatus and its sufficiency. The list of functions performed by symbiotic organisms is constantly growing, and the mobilization of these genetic potencies is the task of modern agriculture. Problems and solutions in connection with the design of highly effective microbial-plant systems will be considered in the presentation.

Технологии применения микроспоридий для борьбы с прямокрылыми – вредителями сельского хозяйства

Токарев Ю.С., Герус А.В.

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: jumacro@yahoo.com

Разработка микробиологических методов защиты растений от вредителей включает поиск новых изолятов энтомопатогенов, оценку их эффективности и безопасности, создание технологий массового производства, хранения и применения. Микроспоридии саранчовых относятся к трём родам – *Paranosema*, *Liebermannia* и *Tubulosema*. Потенциал рода *Liebermannia* не исследован, а *Tubulosema acridophagus* может заражать человека, что не позволяет использовать микроспоридий этого рода в защите растений. *Paranosema locustae* – единственный продуцент препаратов на основе микроспоридий, она заражает свыше 100 видов прямокрылых. Её культивирование на перелётной саранче *Locusta migratoria* позволяет получить несколько млрд. спор на взрослую особь. Возможно культивирование *P. locustae* в клетках насекомых *in vitro*, но технологии массового производства пока не разработаны. Традиционно использование энтомопатогенов проводится аналогично химическим инсектицидам, без учёта циркуляции патогена. С другой стороны, для длительного эффекта актуально создание долговременных инфекционных очагов в местах резервации вредителей. Известны различные механизмы горизонтального и вертикального распространения микроспоридий, хотя в отношении патогенов прямокрылых эти вопросы мало изучены. Известна одна работа, в которой стадии развития *P. locustae* обнаружены в яйцах саранчи. Споры наземных микроспоридий хорошо сохраняются в высушенных или замороженных трупах, хотя остаётся открытым вопрос об доступности такого инфекционного материала в природных условиях. Инфекционность *P. locustae* сохраняется в жидком азоте в течение 25 лет.

Долговременная (свыше 10 лет) циркуляция после интродукции в локальных популяциях нестатдных саранчовых показана для *P. locustae* в Аргентине. Заражение микроспоридиями может оказывать влияние на реакции фазовой изменчивости стадных саранчовых, подавляя переход к скулиживанию, без чего не проявляется вредоносность. Следует учитывать взаимодействие различных патогенов. Так, в отношении саранчовых между микроспоридиями и анаморфными аскомицетами проявляется синергизм, что позволяет повысить их эффективность против целевых объектов микробиометода. Поддержано грантом РФ № 16-14-00005.

Technologies of application of microsporidia for control of Orthoptera pestiferous for agriculture

Tokarev Y.S., Gerus A.V.

All-Russian Institute of Plant Protection, Pushkin, St-Petersburg, Russia

Development of microbiological methods of plant protection from pests includes search for novel isolates of insect pathogens, evaluation of their efficacy and safety, design of large scale production, storage and application technologies. Microsporidia of Acrididae belong to three particular genera: *Paranosema*, *Liebermannia* and *Tubulosema*. Potency of *Liebermannia* genus is not studied, while *Tubulosema acridophagus* may infect human, so that microsporidia from this genus cannot be used in plant protection. *Paranosema locustae* is the only producer of microsporidia-based microbiological formulations, it infects over 100 species of Orthoptera. Its cultivation in migratory locust *Locusta migratoria* allows producing several billion spores per adult insect. Cultivation of *P. locustae* in insect cells *in vitro* is also possible, though mass production technologies are not developed yet.

Traditional use of insect pathogens is similar to that of chemical insecticides without consideration of natural pathogen circulation. On the other hand, to obtain a long-term effect, development of persistent infectious foci in the pest reservation areas is actual. Various mechanisms for horizontal and vertical dissemination of microsporidia are known, though in pathogens of Orthoptera they are poorly studied. In one work, developmental stages of *P. locustae* are found in locust eggs. Spores of terrestrial microsporidia are retained well in dried or frozen cadavers, though their availability to new hosts is questionable. Infectivity of *P. locustae* is conserved in liquid nitrogen for 25 years.

Long-term (over 10 years) circulation after introduction into local population of grasshoppers is shown for *P. locustae* in Argentina. Notably, infection with microsporidia may impair locust reactions, such as transition to gregarious phase which is a key to becoming a pest. Interaction of pathogens of different groups should also be considered. It is particularly known that synergism to Acrididae is displayed by microsporidia and anamorph ascomycetes, increasing their efficacy against microbiological control targets. Supported by Russian Science Foundation, grant # 16-14-00005.

Культура клеток *Digitalis* spp. как источник сердечных гликозидов с противоопухолевой активностью

¹Томилова С.В., ¹Глаголева Е.С., ¹Лабунская Е.А., ¹Тухтаманова А.С., ²Галишев Б.А., ¹Кочкин Д.В.

¹Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

²Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина, Екатеринбург, Россия

E-mail: lanatomilova@yandex.ru

В настоящее время сердечные гликозиды, которые ранее использовали для лечения сердечно-сосудистой недостаточности, начали рассматривать в качестве новых перспективных противоопухолевых средств. Наиболее известным продуцентом этих соединений считается *Digitalis* L. – род травянистых растений, принадлежащий к семейству Plantaginaceae, включающий более 30 видов. Качественное и количественное содержание сердечных гликозидов в интактных растениях – непостоянная величина, которая зависит как от климатических и погодных условий, так и от срока вегетации растения. В связи с этим, в качестве нового источника сердечных гликозидов может выступать культура клеток высших растений, которая дает возможность получать экологически чистое растительное сырье с контролируемым составом и содержанием целевых веществ независимо от климатических и погодных условий. Целью настоящей работы стало получение каллусных культур клеток *Digitalis lanata* Ehrh., *D. grandiflora* Mill. и *D. ciliata* Trautv. и исследование их биосинтетических характеристик. Для получения каллусных культур клеток использовали асептические проростки, выращенные из семян *D. lanata*, *D. grandiflora* и *D. ciliata*, взятых из Ботанического сада биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Семена стерилизовали 50% раствором гипохлорита натрия («Белизна», Россия). Каллусную культуру клеток индуцировали на чашках Петри с агаризованной средой Мурасиге-Скуга (MS), дополненной α -нафтилуксусной кислотой (НУК) и кинетином (Merck, Германия). Культивирование осуществляли при 16-часовом световом дне и 25°C. Предварительный фитохимический анализ экстрактов каллусных культур клеток проводили методом HPLC-MS на хроматографе Waters Aquity UPLC (Waters, США). В результате выполнения работы было установлено, что на среде MS с НУК и кинетином у *D. lanata* формировались только ризогенные культуры, образование каллусных культур клеток не происходило. Для *D. grandiflora* наравне с ризогенезом был отмечен каллусогенез, который характеризовался появлением фотосинтезирующих (зеленых) и нефотосинтезирующих (светло-желтых) каллусов. У *D. ciliata* формировались в основном фотосинтезирующие каллусы и, лишь в некоторых случаях, наблюдался ризогенез. Фитохимический скрининг экстрактов из сухой биомассы клеток методом HPLC-MS не выявил наличия сердечных гликозидов в трех видах культур, однако, там были обнаружены гликозиды фенилэтанойдов и стероидные гликозиды фураностанолового ряда. Планируется работа по оптимизации синтеза целевых соединений.

The cell culture of *Digitalis* spp. as a source of cardiac glycosides with antitumor activity

¹Tomilova S.V., ¹Glagoleva E.S., ¹Labunskaya E.A., ¹Tuhtamanova A.S., ²Galishev B.A., ¹Kochkin D.V.

¹The Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

²The Ural Federal University named after the first President of Russia B.N.Yeltsin, Ekaterinburg, Russia

At the present time cardiac glycosides, which were previously used to treat cardiovascular disorders, have been considered as new promising anti-cancer agents. The most famous producer of these compounds is *Digitalis* L. – genus of herbaceous plants belonging to the family of Plantaginaceae, which includes more than 30 species. The qualitative and quantitative content of cardiac glycosides in intact plants is an unstable quantity that depends on climatic and weather conditions, as well as on the vegetative period of plant. Thereby, the cell culture of higher plants can be a new source of cardiac glycosides, which makes it potential to obtain ecologically pure renewable vegetal materials with a controlled composition and content of chemical compounds independently of climatic and weather conditions. The purpose of this work was to obtain the callus cell cultures of foxglove (*Digitalis lanata* Ehrh., *D. grandiflora* Mill. and *D. ciliata* Trautv.) and a study of their biosynthetic characteristics. To obtain the callus cell cultures were used aseptical seedlings which were grown from seeds of *D. lanata*, *D. grandiflora* and *D. ciliata* taken from the Botanical Garden of the Biological faculty of The Lomonosov Moscow State University. The seeds sterilized with 50% solution of sodium hypochlorite ("Belizna", Russia). The callus cell culture induced on Petri dishes with an agarized Murashige-Skoog (MS) medium supplemented with α -naphthaleneacetic acid (NAA) and kinetin (Merck, Germany). Cultivation was carried out at 16-hours light and 25°C. A preliminary phytochemical analysis of extracts of the callus cell cultures was performed by HPLC-MS on a Waters Aquity UPLC chromatograph (Waters, USA). As a result of the work, it was found that on MS medium with NAA and kinetin in *D. lanata* were formed only rhizogenic cultures, the formation of the callus cell cultures was not observed. For *D. grandiflora* along with rhizogenesis was noted callusogenesis, which was characterized by the emergence of photosynthetic (green) and non-photosynthetic (light-yellow) calli. For *D. ciliata* mainly formed photosynthetic calli and, only in some cases, was observed rhizogenesis. Phytochemical screening of extracts from the dry cell biomass by HPLC-MS did not reveal the presence of cardiac glycosides in three types of the cell cultures; however, there were found phenylethanoid glycosides and steroid glycosides of furostanol type. It is planned to work on optimization of the synthesis of target compounds.

Взаимодействия в системе: Картофель - *Metarhizium robertsii* - Колорадский жук

Томилова О.Г., Крюков В.Ю., Ярославцева О.Н., Глупов В.В.

Институт Систематики и Экологии Животных СО РАН, Новосибирск, Россия

E-mail: toksina@mail.ru

В рамках исследований патогенезов *Metarhizium robertsii* нами показано, что биотрофный штамм Мак-1 вызывает классический микоз с формированием спороншения на трупах насекомых, а токсигенный штамм Р-72 вызывает острый микоз с последующим бактериальным разложением трупов и гибелью склероциев. Гибель токсигенных культур на насекомых-хозяевах резко снижает возможность их воспроизводства в биоценозах. Мы предположили, что энтомопатогенные грибы с подобной стратегией могут выживать за счет активной колонизации ими растений. В данной работе мы рассматриваем способность штаммов *M. robertsii* с различными патогенными стратегиями колонизировать растения картофеля, а также их влияние на рост растений.

Было установлено, что бактериальный распад трупов (после заражения Р-72) происходит преимущественно за счет бактерий р. *Enterobacter*. Содержание различных форм азота в трупах личинок колорадского жука значительно варьировало. В трупах с живыми склероциями (Мак-1) увеличивалась доля органического азота (в 1.3 раза), тогда как в трупах с погибшими склероциями (Р-72) резко повышалось (в 2-3 раза) содержание аммонийной и нитратной форм азота.

Оценка уровня колонизации штаммами *M. robertsii* пробирочных растений картофеля показала, что ткани растений значительно чаще были заселены токсигенным штаммом (40%) в сравнении с биотрофным (7%). Помимо проникновения непосредственно в растительную ткань нами показана возможность колонизации энтомопатогенными грибами поверхности корней растений.

В полевых условиях инокуляция клубней картофеля конидиями токсигенного штамма способствовала увеличению высоты стеблей, массы клубней, отмечена тенденция снижения развития ризоктониоза на стеблях и столонах.

Полученные результаты, подтверждают нашу гипотезу о том, что внутри вида *Metarhizium robertsii* существуют формы с разным типом взаимодействий с насекомыми-хозяевами и растениями. Культуры с токсигенным типом микоза более приспособлены к эндофитной колонизации растений, чем культуры, дающие высокую продукцию конидий на насекомых. Бактериальный распад насекомых, погибших от токсигенных штаммов, может повышать содержание в почве форм азота, доступных растениям, что будет способствовать быстрому восстановлению растений после повреждений фитофагами.

Работа выполнена при поддержке гранта президента РФ № МК-6456.2018.11

Interactions in the system: Potato - *Metarhizium robertsii* - Colorado beetle

Tomilova O.G., Kryukov V.Y., Yaroslavtseva O.N. Glupov V.V.

Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk, Russia

Classical mycosis with sporulation on corpses of insects by biotrophic strain Mac-1, and a sharp mycosis with the subsequent bacterial decomposition of corpses and destruction sclerotia caused by toxigenic strain R-72 have been shown within the limits of researches of the pathogenesis by *Metarhizium robertsii*. Destruction on the insects-hosts by toxigenic cultures is sharply reduces possibility of their reproduction in the biocenoses. We assumed that entomopathogenic fungi with similar strategy can survived at the expense of the plants active colonization. In this work we consider ability of the *M. robertsii* strains with various pathogenic strategies to colonize potato plants, and their influence on growth of plants also.

It has been established that bacterial disintegration of the corpses (after infection R-72) occurs due to the bacteria by the genus *Enterobacter* mainly. Content of the various forms of nitrogen in the Colorado beetle larvae corpses varied significantly. In the corpses with live sclerotia (Mac-1), the proportion of organic nitrogen increased by 1.3 times, whereas the content of ammonium and nitrate forms of nitrogen sharply increased in corpses with dead sclerotia (R-72) by 2-3 times.

Estimation of the colonization level by strains of *M. robertsii* *in vitro* potato plantlets showed that plant tissue is much more often inhabited by a toxigenic strain (40%) than biotrophic (7%). The possibility of the entomopathogenic fungi to colonize the root surface of the plants was showed in addition to penetrating directly into the plant tissue.

In field conditions has been detected an increase of stalks in height, the weights of tubers and the tendency to decrease in the rhizoctonia development on stalks and stolons after inoculation of the potato tubers by toxigenic strain conidia, is noted.

The obtained results confirm our hypothesis about the different forms within the *M. robertsii* species differing by the interaction with host insects and plants. Cultures with toxigenic type of mycosis are more adapted to endophytic colonization, than cultures that produce a high yield of conidia on insects. Bacterial decay of the insects killed by toxigenic strains may cause higher levels of nitrogen in the soil, which can contribute to the rapid recovery of plants after damage by phytophages.

The work was supported by a grant from the President of the Russian Federation No. МК-6456.2018.11.

Изучение наночастиц селена, синтезируемых ризобактерией *Azospirillum brasilense* Sp7, методами колебательной спектроскопии

Тугарова А.В., Мамченкова П.В., Дятлова Ю.А., Камнев А.А.

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

E-mail: tugarova_anna@mail.ru

Многие бактерии могут трансформировать различные элементы с образованием наночастиц. Синтезируемые бактериями наночастицы привлекают внимание в первую очередь за счет механизмов, относящихся к активно развивающемуся в последнее время направлению "зеленая химия", предполагающему минимизацию вреда окружающей среде. В нашей работе изучено формирование селеновых наночастиц (SeНЧ) ризобактерией *A. brasilense* Sp7 путем восстановления селенит-ионов (SeO_3^{2-}). Разработана схема синтеза, включающая следующие шаги: выросшие до поздней log-фазы роста бактерии были собраны, отмыты и ресуспендированы в физиологическом растворе; к полученной бактериальной суспензии добавляли селенит в концентрациях 5–50 мМ и инкубировали при 31°C. Через 24 ч наблюдалось интенсивное оранжево-красное окрашивание, свидетельствующее о восстановлении SeO_3^{2-} -ионов. С использованием просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) было показано, что в данных условиях происходит накопление SeНЧ экстраклеточно, что облегчило их выделение. Для изучения SeНЧ были использованы методы колебательной спектроскопии, ИК-фурье-спектроскопия (ИКФС) и спектроскопия комбинационного рассеяния (СКР), позволившие получить взаимодополняющую информацию об их составе и структуре. ИКФС показала наличие в составе SeНЧ ряда биомакромолекул: белков (наибольшая часть), а также полисахаридов и липидов. Обнаружено заметное количество карбоксильных групп в составе SeНЧ, сравнительно слабо связанных с поверхностью. Для выяснения, в состав каких (биомакро)молекул входят эти функциональные группы, требуются дополнительные исследования. Появление красно-оранжевого окрашивания, свидетельствуя о восстановлении селенита, однако, не дает однозначного ответа на вопрос, в какой из аллотропных модификаций содержится селен в SeНЧ. Этот вопрос был разрешен с использованием СКР: установлено, что НЧ состоят из аморфного селена. Полученные SeНЧ также были охарактеризованы с использованием методов динамического рассеяния света (размеры, дзета-потенциалы), UV-Vis-спектрофотометрии, иммунохимического анализа (для анализа биоорганических компонентов). Наноструктуры элементарного селена перспективны для различных биотехнологических и медицинских применений. Детальное знание процессов, связанных с бактериальным восстановлением селенита, также может быть использовано при фиторемедиации с участием ризосферных и почвенных бактерий для очистки загрязненных селеном почв или водоносных горизонтов. Работа частично поддержана грантом РФФИ 16-08-01302-а.

Selenium nanoparticles synthesised by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp7: investigation using vibrational spectroscopy techniques

Tugarova A.V., Mamchenkova P.V., Dyatlova Yu.A., Kamnev A.A.

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

Many bacteria are known to be capable of transforming compounds of different elements with the formation of nanoparticles. Microbially synthesised nanoparticles attract the attention of researchers worldwide owing to the underlying mechanisms related to the actively developing direction of "green chemistry", which implies minimisation of harm to the environment. In our work, the formation of selenium nanoparticles (Se NPs) by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 has been studied as a result of reduction of selenite ions (SeO_3^{2-}). A scheme for the synthesis of Se NPs was proposed, which included the following steps: bacteria grown up to the late logarithmic growth phase were collected, washed, resuspended in physiological saline and incubated at 31°C with selenite at different concentrations (5–50 mM). After 24 h, an intensive red coloration developed indicating the reduction of SeO_3^{2-} ions. Using transmission electron microscopy (TEM), the presence of spherical nanoparticles was observed outside the cells, which facilitated their isolation. The obtained Se NPs were studied using vibrational spectroscopy techniques, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and Raman spectroscopy, which provided complementary information on their composition and structure. FTIR spectra of Se NPs showed the presence of proteins (as major components), polysaccharides and lipids. A notable content of carboxylate groups was also observed, which were relatively weakly bound to the surface of Se NPs. This fact requires additional studies to clarify the origin of the carboxylate-containing functional groups. The appearance of the typical red coloration indicated selenite reduction to Se^0 , while Raman spectroscopy sensitive to different allotropic modifications of selenium provided evidence that the Se NPs consisted of amorphous selenium. The Se NPs obtained were also studied by dynamic light scattering (size, zeta potentials), UV-Vis spectrophotometry, immunochemical analysis (for characterising the bioorganic components). Elementary selenium nanostructures are promising for biotechnological and medical applications. Detailed knowledge of the processes associated with the bacterial reduction of selenite can also be used in phytoremediation involving rhizospheric and soil bacteria with regard to selenium-contaminated soils or aquifers. This work was supported in part by the Russian Foundation for Basic Research (Grant 16-08-01302-a).

Деградиционный потенциал растений и микроорганизмов в отношении полициклических ароматических углеводородов

Турковская О.В., Позднякова Н.Н., Муратова А.Ю., Дубровская Е.В., Голубев С.Н.
 Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия
 E-mail: turkovskaya_o@ibppm.ru

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) – обширная группа соединений, содержащих два и более конденсированных бензольных колец в молекуле, и являющихся широко распространенными и опасными загрязнителями окружающей среды. ПАУ образуются путем абио- и антропогенных процессов, среди которых наиболее ощутимый вклад вносят процессы неполного сжигания органического сырья. ПАУ подвержены деградации представителями практически всех царств живых организмов: бактериями, грибами, растениями, животными. Различное химическое строение ПАУ и разнообразие организмов, взаимодействующих с этими поллютантами, определяют многочисленность метаболических путей и промежуточных продуктов при их биоразложении. Бактерии метаболизируют ПАУ с участием преимущественно оксигеназ с образованием различных промежуточных продуктов, способных к дальнейшим превращениям вплоть до воды и углекислого газа, как ферментными системами того же организма, так и других участников биоценоза, в том числе грибов и растений. Грибы, например, аско- и базидиомицеты, подвергают деградации ПАУ с помощью цитохрома P-450 монооксигеназ и/или лакказ и пероксидаз, которые, являясь ферментами внеклеточного лигнинолитического комплекса и осуществляя процессы деградации лигнина, вовлекают в них и ПАУ. При этом, образуя на первых этапах окисления хиноны, грибы способны к полной минерализации ПАУ. Растения также имеют пул внеклеточных ферментов, поступающих в ризосферу с корневыми экссудатами. В первую очередь, это ферменты стрессовой защиты – пероксидазы, которые способны окислять как нативные ПАУ (в присутствии медиаторов), так и интермедиаты их бактериального и грибного разложения. Есть данные, что и растения способны ассимилировать углерод молекулы ПАУ. Названные выше процессы показаны нами при изучении метаболизма фенантрена ризосферной бактерией *Ensifer meliloti* P221 (IBPPM 383), растениями люцерновой посевной (*Medicago sativa* L.) и сорго венечным (*Sorghum bicolor* L. Moench), а также грибами *Pleurotus ostreatus* и *Fusarium oxysporum*. Исследования деградиционного потенциала микроорганизмов и растений необходимы не только для понимания процессов, происходящих в природе, но и для совершенствования технологии фиторемедиации. Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 16-14-00081 - в части, касающейся грибов; при поддержке грантом РФФИ № 16-04-00351 - в части, касающейся растений; а также в рамках темы госбюджета № 01201359052 – в части, касающейся бактерий.

Potential of plants and microorganisms to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons

Turkovskaya O.V., Pozdnyakova N.N., Muratova A.Yu., Dubrovskaya E.V., Golubev S.N.
 Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a broad group of compounds containing two or more condensed benzene rings in the molecule and are some of the most widespread and dangerous environmental pollutants. PAHs are formed by abiogenic and anthropogenic processes, among which human activity associated with the incomplete combustion of organic raw materials (oil, coal, peat, wood, garbage, tobacco, etc.) makes the most significant contribution. PAHs can be degraded by members of almost all kingdoms of living organisms: bacteria, fungi, plants, and animals. The different chemical structures of PAHs and the variety of organisms interacting with these pollutants determine the multiplicity of metabolic pathways and intermediates formed during their biodegradation. Bacteria metabolize PAHs mostly with oxygenases. Various byproducts form that can be further transformed to water and carbon dioxide by the enzyme systems of both the same organism and other members of the biocenosis, including fungi and plants. Fungi (e.g., ascomycetes and basidiomycetes) degrade PAHs with cytochrome P-450 monooxygenases and/or laccases and peroxidases. These are enzymes of the ligninolytic complex that degrade lignin. PAHs are implicated in lignin degradation; in this case, fungi form quinones at the early stages of oxidation and are capable of complete mineralization of PAHs. Plants also have a pool of extracellular enzymes exuded into the rhizosphere. First, these are peroxidases (enzymes of stress protection), which can oxidize both native PAHs (in the presence of mediators) and PAH intermediates from bacterial and fungal decomposition. There is evidence that plants can also assimilate the carbon of the PAH molecules. The above processes were shown by us in the study of the metabolism of phenanthrene by the rhizosphere bacterium *Ensifer meliloti* P221 (IBPPM 383), alfalfa (*Medicago sativa* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench), and the fungi *Pleurotus ostreatus* and *Fusarium oxysporum*. Studies of the degradation potential of microorganisms and plants are necessary not only for understanding natural processes but also for improving the phytoremediation technology. The study was supported by the Russian Scientific Foundation (grant no. 16-14-00081) (research with fungi); by the Russian Foundation of Basic Research (grant no. 16-04-00351) (research with plants); and by the state budget (topic no. 01201359052) (research with bacteria).

***In silico* анализ 5'-нто генов растений**¹Тюрин А.А., ²Мустафаев О.Н., ¹Кабардаева К.В., ¹Голденкова-Павлова И.В., ¹Фадеев В.С.¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева
Российской академии наук, Москва, Россия²Бакинский государственный университет, Баку, Азербайджан*E-mail: alexjofar@gmail.com*

Известно, что экспрессия генов контролируется на всех этапах реализации генетической информации, однако, не все этапы достаточно хорошо охарактеризованы. Особенно это касается вклада 5'-НТО мРНК в эффективность процесса трансляции. В качестве модельного объекта выбран *A. thaliana*, поскольку геном данного растения полностью секвенирован и в значительной степени аннотирован.

Для предварительного *in silico* анализа сформирована выборка 5'-НТО (122 последовательности), исходя из следующих критериев: (1) гены должны характеризоваться разным, но конститутивным уровнем транскрипции в растениях на всех этапах онтогенеза растений; (2) гены должны кодировать охарактеризованный белковый продукт. Эти последовательности 5'-НТО с использованием ресурса JetGene охарактеризованы на соответствие их размера, нуклеотидного состава, характерных для совокупности всех последовательностей 5'-НТО генов *A. thaliana*. Для поиска значимых мотивов разработан новый алгоритм, позволяющий находить повторяющиеся нуклеотидные паттерны в заданной выборке последовательностей 5'-НТО. Значимыми мотивами в рамках представленной работы считаются подпоследовательности, встречающиеся не менее чем в 10 % всех 5'-НТО. В результате анализа выделено 42 высоко представленных нуклеотидных мотива. Также создано дополнительное программное обеспечение, функцией которого является визуализация мотивов в заданном наборе 5-нетранслируемых областей в виде цветографических схем.

Для проверки вклада мотивов, найденных 5'-НТО, в изменение уровня экспрессии репортерного гена (лихеназа из *S. termocellum*) в состав переносимой кассеты был введен второй репортерный ген (*gfp*) под контролем конститутивного промотора. Данный подход позволит сравнивать уровень целевого белка, наработка которого контролируется 5'-НТО, относительно неменяющегося количества второго репортерного белка. Далее в сконструированный вектор клонированы исследуемые 5'-НТО. Анализ функциональных характеристик полученных конструкций проводили с использованием метода транзientной экспрессии в растениях *N. benthamiana*. Сравнение относительного уровня целевого белка продемонстрировало наличие достоверного вклада 5'-НТО с различными мотивами в контроль экспрессии на этапе трансляции (как в сторону увеличения количества целевого белка, так и — его уменьшения), причём этот вклад оказался в значительной степени ассоциирован с найденными мотивами. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-04-00783_a.

***In silico* analysis of 5'-utrs of plant genes**¹Tyrin A.A., ²Mustafaev O.N., ¹Kabardaeva K.V., ¹Goldenkova-Pavlova I.V., ¹Fadeev V.S.¹Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia²Baku State University, Baku, AZ, Azerbaijan

As known as gene expression is controlled at all stages of genetic information realisation pathway. However these stages are not characterised equally. As well as contribution of 5'-untranslated regions of mRNAs into translation. We chose *A. thaliana* to role of plant model organism, because its genom is completely sequenced and properly annotated.

A set of 5'-UTRs was formed for *in silico* analysis (122 sequences). Criterion used for this: (1) genes must have different and constitutive level of expression; (2) the genes must code well characterized proteins. We used JetGene database for this purpose.

For search of significant motifs we developed new algorithm. The algorithm allow to find repeating nucleotide patterns in a given set of 5'-UTRs sequences. We mean the significant motive is the motive appearing in more then 10% of all 5'-UTRs. As the results of the analysis we isolated 42 high represented motifs. Also we developed additional program for visualization of motifs on the set of 5'-UTRs sequences using color plots.

To test contribution of concrete 5'-UTR into the expression level of reporter gene (lichenase) we include in the transfered cassette also one reporter gene (*gfp*) under control of constitutive promoter. This approach allows to compare level of reporter protein relatively unchanging amount of the second reporter protein. After this we cloned the different 5'-UTRs into the vector. To test functional characteristics of the 5'-UTRs we used transient expression approach using *N. benthamiana* as model plants. Compare analysis of the reporter gene level showed significant differences between 5'-UTRs containing different motifs. This investigation was supported by RFIF grant №17-04-00783_a.

Структура и функции капсульных гликополимеров почвенных азотфиксирующих бактерий р. *Azospirillum*

¹Федоненко Ю.П., ¹Сигида Е.Н., ¹Евстигнеева С.С., ^{1,2}Гринева В.С., ^{1,2}Коннова С.А., ¹Игнатов В.В.

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

²Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

E-mail: fedonenko_yu@ibppm.ru

Диазотрофные бактерии р. *Azospirillum* имеют важное биотехнологическое значение, в связи со способностью формировать взаимовыгодные ассоциации со многими злаковыми культурами, стимулируя их рост и урожайность. Бактериальные гликополимеры, в частности капсульные полисахариды, принимают непосредственное участие во взаимодействии азоспирилл с растениями. Известно, что азоспириллы продуцируют в капсулу липополисахарид-белковый комплекс (ЛПБК). Изучение структуры и свойств ЛПБК важно для понимания ключевых этапов образования растительно-микробной ассоциации. В связи с этим целью работы было установление структуры ЛПБК бактерий *A. brasilense* Sp245. Бактерии *A. brasilense* Sp245 выращивали в малатной питательной среде при 30°C до окончания экспоненциальной фазы роста. С поверхности клеток смывали капсульный материал, из которого гель-фильтрацией получали высокомолекулярную фракцию ЛПБК. По результатам ДСН-ПААГ-электрофореза в составе препарата ЛПБК были обнаружены углеводсодержащие компоненты с характерным для липополисахарида (ЛПС) этих бактерий профилем. С использованием окрашивания кумасси бриллиантовым голубым R-250 в составе ЛПБК были выявлены два полипептида с кажущейся Mr 42 и 30 кДа, в соотношении приблизительно 5 : 1. На основании анализа моносахаридного состава и данных 1H- и 13C-ЯМР спектроскопии установлено, что структура повторяющегося звена ПС из ЛПБК идентична установленной ранее структуре повторяющегося звена О-полисахарида ЛПС данного штамма. Белковые компоненты ЛПБК после разделения в ПААГ были экстрагированы из геля и проанализированы MALDI масс-спектрометрией. Исследуемые белки были идентифицированы как порин OmaA (41 кДа) и канал-образующий OmpW-подобный белок (25 кДа). OmaA является основным белком наружной мембраны и выполняет функцию адгезина при агрегации клеток и колонизации растений. С использованием поликлональных кроличьих антител к белку OmaA методами двойной радиальной иммунодиффузии, ИФА, иммуноблоттинга в ЛПБК двенадцати штаммов трех видов азоспирилл – *A. brasilense*, *A. lipoferum* и *A. halopraeferens* – была выявлена консервативность антигенных детерминант данного белкового компонента.

Structure and Functions of Capsular Glycopolymers from nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum*

¹Fedonenko Yu.P., ¹Sigida E.N., ¹Evstigneeva S.S., ^{1,2}Grinev V.S., ^{1,2}Konnova S.A., ¹Ignatov V.V.

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Russia

²Saratov State University, Saratov, Russia

Diazotrophic bacteria of the genus *Azospirillum* have an important biotechnological significance, in connection with the ability to form mutually beneficial associations with many cereal crops, stimulating their growth and yield. Bacterial glycopolymers, in particular capsular polysaccharides, participate in the interaction of azospirilla and plant. It is known that *Azospirillum* produce lipopolysaccharide-protein complex (LPPC) in capsule. The study of the structure and properties of the LPPC is important for understanding the key stages in the formation of plant-microbial association. The purpose of the work was to establish the structure of the LPPC of *A. brasilense* Sp245. Bacteria *A. brasilense* Sp245 were grown in a malate nutrient medium at 30°C until the end of exponential growth phase. LPPC was isolated from capsular material. According to the results of SDS-PAGE-electrophoresis, profiles of LPPC and lipopolysaccharide (LPS) of these bacteria were similar. Using staining with Coomassie brilliant blue R-250, were discovered two polypeptides with an apparent Mr 42 and 30 kDa in LPPC. Based on the monosaccharide composition of LPPC and the 1H and 13C NMR spectroscopy analysis, it was found that the structure of the repeating unit of the polysaccharide (PS) from the LPPC is identical to the repeating unit of the O-polysaccharide of this strain. The protein components of LPPC after separation by PAGE were extracted from the gel and analyzed by MALDI mass spectrometry. These proteins were identified as porin OmaA (41 kDa) and the OmpW-like protein-forming channel (25 kDa). OmaA is the main protein of the outer membrane and functions as an adhesin in the aggregation of cells and colonization of plants. Thus, the identity of the PS structures of LPS and LPPC *A. brasilense* Sp245 was confirmed, and were identified two LPPC proteins, which are directly involved in the molecular mechanisms of the formation of the azospirilla-plant associations.

Трансгенные растения томата (*Solanum lycopersicum* L.) как экспериментальные модели для прикладных и фундаментальных исследований

Халилуев М.Р., Богоутдинова Л.Р., Баранова Е.Н., Кононенко Н.В., Долгов С.В., Смирнова Е.А., Чабан И.А.
ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия
E-mail: marat131084@rambler.ru

Генетическая трансформация томата применяется для улучшения качества товарной продукции, повышения устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессовым факторам, а также в качестве объекта для наработки белков медицинского и ветеринарного назначения. Также трансгенные растения томата широко используются в различных фундаментальных исследованиях как модели для изучения функционирования генов и их регуляторных последовательностей в растительном геноме. В результате серии экспериментов по агробактериальной трансформации были получены растения томата селекционной линии ЯЛФ с генами, кодирующими хитинсвязывающие белки из *Amaranthus caudatus* L. (ac) и *A. retriflexus* L. (RS-intron-Shir), а также гевеиноподобные антимикробные пептиды из *Stellaria media* L. (SmAMP1 и SmAMP2). В зависимости от целевого гена эффективность трансформации варьировала от 6.7 до 11.3%. Отмечено, что при инокуляции отделенных листьев суспензией зооспорангиев картофельного изолята *Phytophthora infestans* были выделены трансгенные линии с экспрессией генов ac, SmAMP1 и SmAMP2, отличающиеся повышенной устойчивостью к возбудителю фитофтороза по сравнению с нетрансформированным контролем. Среди первичных трансформантов с каждым из вышеперечисленных генов отмечены линии, существенно отличающиеся по фенотипу от растений дикого типа, у которых наблюдались кардинальные изменения генеративных органов в результате нарушения идентичности флоральной меристемы. Это выражалось в формировании эктопических генеративных побегов, что, в ряде случаев, приводило к образованию многоярусных партенокарпических плодов. Отмеченные нарушения длительно наследовались при вегетативном размножении и не были связаны с экспрессией перенесенных генов. Цитоэмбриологический анализ семязачатков установил, что зародышевый мешок развивался нормально, однако впоследствии дегенерировал. При этом семяпочка продолжала дифференцировку за счет пролиферации клеток эндотелия, которые формировали псевдоэмбриональную ткань на месте зародышевого мешка. Этот процесс стимулировал рост семязачатков, что приводило к развитию партенокарпических плодов. Причиной отсутствия нормального оплодотворения являлось формирование дефектной пыльцы. Полученные трансгенные линии томатов с аномалиями флоральной меристемы могут быть использованы в качестве модели при изучении особенностей развития репродуктивных и соматических тканей у покрытосеменных растений. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-04-00658.

Transgenic tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) as an experimental models for applied and fundamental research

Khaliluev M.R., Bogoutdinova L.R., Baranova E.N., Kononenko N.V., Dolgov S.V., Smirnova E.A., Chaban I.A.
All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

Tomato transformation is applied to increased content of nutritional value, production of plants with enhanced resistance to abiotic and biotic stress factors as well as biomanufacturing of pharmaceutical proteins for medical and veterinary purposes. Transgenic tomato plants are also used for studies of heterologous genes and its regulatory elements into plant genome. A series of experiments was carried out by Agrobacterium-mediated transformation of tomato line YALF. Tomato plants transformed with the gene encoding chitin-binding proteins from *Amaranthus caudatus* L. (ac) and *A. retriflexus* L. (RS-intron-Shir), as well as hevein-like antimicrobial peptides from *Stellaria media* L. (SmAMP1 and SmAMP2) were obtained. Transformation efficiency ranged from 6.7 to 11.3% depending on the target gene. Laboratory testing of leaf infection with zoosporangial suspension of potato isolate *Phytophthora infestans* revealed transgenic tomato lines expressing ac, SmAMP1 and SmAMP2 genes, characterized by high resistance to late blight pathogen compared to untransformed control. Among independent tomato lines we identified plants, expressing each of target genes, with different phenotypes, if compared to non-transgenic plants. Transgenic tomato lines were characterized by abnormal development of generative organs because of a disturbance of the floral meristem identity. This was determined in the formation of ectopic generative shoots, which in a number of cases led to the formation of multi-layer parthenocarpic fruits. The noted abnormalities were inherited through vegetative propagation for a long time period and were not associated with the expression of the target genes. The cytoembryological analysis revealed that embryo sac developed normally, but then degenerated. The ovule continues to differentiate by proliferation of endothelium cells, which assemble pseudoembryonic tissue. This process stimulated ovary growth, leading to the development of parthenocarpic fruits. The reason for the lack of normal fertilization is the formation of defective pollen. We believe that transgenic tomatoes with abnormal identity of floral meristem may be useful as models for investigation of mutual influence of reproductive and somatic tissues of angiosperms. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research project № 18-04-00658.

Изучение генома природно-трансгенного растения *Nicotiana glauca* методом полногеномного секвенирования

¹Хафизова Г.В., ^{1,2}Добрынин П.В., ¹Полев Д.Е., ¹Матвеева Т.В.

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Смитсоновский институт, Вашингтон, США

E-mail: galina.khafizova@gmail.com

Природно-трансгенные растения содержат в своих геномах последовательности, полученные в результате горизонтального переноса от агробактерий. Эти последовательности называются клеточной Т-ДНК (клТ-ДНК). На сегодняшний день известно о присутствии природно-трансгенных видов в трех родах растений: *Nicotiana*, *Linaria* и *Ipomea*. Для изучения клТ-ДНК в настоящее время применяют следующие методы: гибридизация по Саузерну в сочетании с ПЦР к входящим в состав Т-ДНК генам, ПЦР-РТ с вырожденными праймерами и зондами, метод «прогулка по хромосоме», и, конечно, методы секвенирования нового поколения (NGS). Последние позволяют получить наиболее полную информацию о растительном геноме, понять, сколько копий клТ-ДНК он содержит, каков их состав, сайты локализации. На сегодняшний день среди природно-трансгенных видов наиболее хорошо изучены представители рода *Nicotiana*. У видов *N.tabacum*, *N.tomentosiformis*, *N.otophora* подрода *Tabacum* отсекутены геномы, поэтому стало известно точное количество копий клТ-ДНК и их состав. Для *N.glauca* (подрод *Petunioides*) подобного исследования ранее проведено не было. В результате сборки *de novo* генома *N.glauca* нами было получено 385116 скаффолдов с N50 равным 31.1 т.п.о., размер генома составил 3.2 млрд п.о. Анализ генов, входящих в состав клТ-ДНК, подтвердил наличие в геноме одной, ранее описанной последовательности, образующей несовершенный инвертированный повтор (длина региона в сборке – 8180 п.о.) и показал отсутствие иных клТ-ДНК, что свидетельствует об однократной агробактериальной трансформации вида *N.glauca*. Для представителей подрода *Tabacum*, имеющих в геномах разные по составу клТ-ДНК, предполагают множественные акты трансформации агробактериями. Таким образом, для представителей разных подродов рода *Nicotiana* показаны разные сценарии получения Т-ДНК. Полученная сборка генома *N.glauca* является первым в мере полногеномным исследованием данного вида, и предоставляет уникальные данные для сравнения эволюционных процессов подродов *Petunioides* и *Tabacum*. Кроме того, геном *N.glauca* диплоидный, что делает этот вид проще и удобнее для использования в экспериментах, чем аллополиплоидный *N.tabacum*. Таким образом, собранный геном *N.glauca* открывает перспективы для дальнейшего изучения клТ-ДНК, истории их появления в геномах *Nicotiana* и возможных функций. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-16-10010 с использованием оборудования ресурсного центра «Биобанк» научного парка СПбГУ.

Whole-genome investigation of the naturally transgenic plant *Nicotiana glauca* genome

¹Khafizova G., ^{1,2}Dobrynin P., ¹Polev D., ¹Matveeva T.

¹Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

²National Zoological Park, Smithsonian Conservation Biology Institute, Washington, USA

Naturally transgenic plants are species that contain agrobacteria-derived sequences, resulting of horizontal gene transfer. These sequences are called cellular T-DNA (cT-DNA). Currently the presence of naturally transgenic species is shown in three plant genera: *Nicotiana*, *Linaria* and *Ipomea*. Today the following methods are used to study cT-DNA: Southern hybridization in combination with PCR to T-DNA genes, Real time PCR with degenerate primers and probes, "chromosome walk" method, and, of course, next generation sequencing methods (NGS). The latter allow you to get the most complete information about the plant genome, to understand how many copies of cT-DNA it contains, what they consist of, and what their localization sites are. To date, *Nicotiana* species are better investigated, then other naturally transgenic plants. There are whole-genome data for the species *N.tabacum*, *N.tomentosiformis*, *N.otophora* of the subgenus *Tabacum*, so the exact number of cT-DNA copies and their composition are known. Such an investigation was not previously conducted for *N.glauca* (subgenus *Petunioides*). *De novo* assembly of the *N.glauca* genome resulted in 385116 scaffolds with N50 of 31.1 kbp, and the genome size equal to 3.2 Gb. T-DNA analysis confirmed the presence of one previously described cT-DNA and showed the absence of other, which indicates a single agrobacterial transformation act of the *N.glauca* species. The fragment of T-DNA obtained in the assembly is organized in an imperfect inverted repeat with the length of 8180 bp. For species of the *Tabacum* subgenus, which contain cT-DNA differ in their composition, multiple acts of agrobacterial transformation are suggested. Thus, different scenarios for obtaining T-DNA are shown for different subgenera of the genus *Nicotiana*. Our data is the first comprehensive *de novo* assembly of *N.glauca* and provide valuable information for comparative studies of the evolutionary processes between the *Petunioides* and *Tabacum* subgenera. In addition, *N.glauca* is a diploid species, which makes it more suitable and easier to use in experiments than the allopolyploid *N.tabacum*. Thus, the assembled genome of *N.glauca* opens up prospects for further study of cT-DNA, the history of their appearance in the genomes of *Nicotiana* and possible functions. This study was supported by a grant from the RSF 16-16-10010 and conducted using the equipment of the "Biobank" Centre of the SPbSU Research Park.

Условия культивирования бактерий-антагонистов *Bacillus subtilis* - основы биопрепаратов для защиты растений

Хомяк А.И., Асатурова А.М.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений, Краснодар, Россия

E-mail: HomyakAI87@mail.ru

Основной упор в борьбе с грибными болезнями зерновых культур делается на использовании химических пестицидов. Но в связи с биологизацией сельскохозяйственного производства безопасной альтернативой химическим пестицидам служат биологические препараты на основе микроорганизмов, а поиск новых оптимальных компонентов питательных сред для культивирования штаммов-продуцентов является одним из актуальных направлений биотехнологии. Таким образом, целью нашего исследования является подбор оптимальных условий культивирования для штаммов бактерий *Bacillus subtilis* BZR 336g и *Bacillus subtilis* BZR 517. Для определения оптимальной температуры культивирования штаммы выращивали на жидкой питательной среде при температурах 20,0, 25,0, 30,0 и 35,0 °С. Для определения оптимальной кислотности среды pH устанавливали в пределах 3,0, 6,0, 8,0 и 10,0. В качестве тестируемых источников углерода в среду вносили сахарозу, глюкозу, мелассу и глицерин. При определении оптимальных источников азотного питания испытывали пептон, NaNO₃, дрожжевой и кукурузный экстракты. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в жидкой культуре (ЖК) определяли методом Коха. Установлен температурный оптимум для культивирования перспективных штаммов: *B. subtilis* BZR 336g 25,0°С, *B. subtilis* BZR 517 – 30,0° С. Определен оптимальный pH для выращивания бактериальных культур: *B. subtilis* BZR 336g 7,0-8,0, *B. subtilis* BZR 517 – 8,0. Максимальный титр ЖК лабораторных образцов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 отмечен на среде, где в качестве источника углерода была использована меласса, а в качестве источников азота пептон, дрожжевой и кукурузный экстракты.

На основании полученных данных были подобраны первые образцы оригинальных оптимизированных питательных сред. Установлено, что плотность клеток ЖК на основе штамма *B. subtilis* 336g на оптимизированной среде оказалось на три порядка выше, чем на среде Кинга В и составила $(8,7 \pm 0,66) \times 10^{10}$ КОЕ/мл. Титр ЖК штамма *B. subtilis* BZR 517 на оптимизированной среде составил $(7,2 \pm 0,42) \times 10^{10}$ КОЕ/мл. Полученные экспериментальные данные могут быть использованы для разработки элементов технологии производства новых биопрепаратов: на основе бактерий рода *Bacillus*.

The conditions for the cultivation of bacteria antagonists *Bacillus subtilis* the basis of biopreparations for plant protection

Homyak A. I., Asaturova A.M.

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

The use of chemical pesticides is emphasized as the main measure against fungal diseases of cereal crops. But due to the biologization of agricultural production, biological preparations based on microorganisms serve as a safe alternative to chemical pesticides, and the search for new optimal components of nutrient media for the cultivation of producer strains is one of the current trends in biotechnology. Thus, the purpose of our study is to select the optimal conditions for cultivation of *Bacillus subtilis* BZR 336g and *Bacillus subtilis* BZR 517 strains. To determine the optimal cultivation temperature the strains were grown on a liquid nutrient medium at temperatures of 20.0, 25.0, 30.0 and 35.0 ° C. To determine the optimum acidity of the medium, the pH was adjusted to 3.0, 6.0, 8.0 and 10.0. As test sources of carbon, sucrose, glucose, molasses and glycerin were introduced into the medium. Peptone, NaNO₃, yeast and corn extracts were tested for the determination of the optimal sources of nitrogen nutrition. The number of colony forming units (CFU) in the liquid culture (LC) was determined by the Koch method. Temperature optimum was set for the cultivation of promising strains: *B. subtilis* BZR 336g 25.0 ° C, *B. subtilis* BZR 517 - 30.0 ° C. The optimum pH for growing bacterial cultures was determined: *B. subtilis* BZR 336g 7.0-8, 0, *B. subtilis* BZR 517 - 8.0. The maximum titer of LC prototypes based on *B. subtilis* strains BZR 336g and *B. subtilis* BZR 517 was noted in the medium where molasses were used as the carbon source, and peptone, yeast and corn extracts as sources of nitrogen. Based on the data obtained, the first samples of the original optimized nutrient media were selected. The density of LC cells on the basis of the *B. subtilis* 336g strain on an optimized medium was found to be three orders of magnitude higher than in the King's medium B and amounted to $(8.7 \pm 0.66) \times 10^{10}$ CFU / ml. The titer of the *B. subtilis* BZR 517 LC strain on an optimized medium was $(7.2 \pm 0.42) \times 10^{10}$ CFU / ml. The obtained experimental data can be used to develop elements of the production technology for new biofungicides based on bacteria of the genus *Bacillus*.

Клеточные механизмы дифференцировки растительных клеток симбиотического клубенька

¹Цыганов В.Е., ¹Китаева А.Б., ¹Кусакин П.Г., ^{1,2}Демченко К.Н., ¹Цыганова А.В.

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Пушкин 8, Санкт-Петербург, Россия

²Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: tsyganov@arriam.spb.ru

В ходе дифференцировки инфицированных клеток симбиотического клубенька происходит их увеличение в объеме, необходимое для размещения тысяч симбиосом. Нами была изучена роль в этом процессе цитоскелета в клубеньках *Medicago truncatula* и *Pisum sativum*. В ходе дифференцировки клеток клубеньков обоих видов наблюдались изменения в паттернах тубулинового цитоскелета. В меристематических клетках формировался неупорядоченный паттерн перекрещивающихся микротрубочек. В неинфицированных клетках и колонизированных клетках пучки кортикальных микротрубочек располагались параллельно друг другу и перпендикулярно продольной оси клетки. В инфицированных клетках после выхода ризобий в цитоплазму растительной клетки пучки кортикальных микротрубочек также формировали неупорядоченный паттерн. Эндоплазматические микротрубочки были вовлечены в процесс роста инфекционных нитей и капель, а также выход из них бактерий. В клубеньках *M. truncatula* и гороха формировались сети эндоплазматических микротрубочек, поддерживающие расположение бактериоидов, но характер этих сетей различался между видами, отражая различия в морфологии и расположении бактериоидов. Плотная сеть утолщенных актиновых микрофиламентов окружала ядро во всех типах клеток клубеньков гороха и *M. truncatula*, при этом она соединяла ядро с периферией клетки. Утолщенные эндоплазматические микрофиламенты проходили вдоль инфекционных нитей и окружали инфекционные капли. В инфицированных клетках после выхода бактерий в цитоплазму происходила реорганизация актинового цитоскелета, развивалась сеть тонких и коротких эндоплазматических микрофиламентов между бактериоидами. Количественный анализ организации актинового цитоскелета выявил несколько паттернов расположения микрофиламентов в неинфицированных и азотфиксирующих клетках. Паттерны неинфицированных клеток гороха и *M. truncatula* сходны, паттерны азотфиксирующих клеток отличались, что объясняется различным строением и расположением бактериоидов у изученных видов. Также был проведен детальный анализ процесса миграции клеточного ядра в ходе дифференцировки растительной клетки. В клубеньках обоих видов в меристематических клетках ядро занимало центральное положение. В инфицированных клетках ядро было ассоциировано с инфекционными нитями. В молодых инфицированных клетках ядро смещалось к периферии. По мере увеличения числа симбиосом ядро смещалось к центру клетки, а впоследствии примыкало к центральной вакуоле. Работа поддержана РФФ (16-16-10035).

Cellular mechanisms of plant cell differentiation in symbiotic nodule

¹Tsyganov V.E., ¹Kitaeva A.B., ¹Kusakin P.G., ^{1,2}Demchenko K.N., ¹Tsyganova A.V.

¹All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin 8, Saint-Petersburg, Russia

²Komarov Botanical Institute, Saint-Petersburg, Russia

During the differentiation of symbiotic nodule cells infected with rhizobia, their increase in volume occurs, which is necessary for accommodation of thousands of symbiosomes. We have studied the role of the cytoskeleton in this process in nodules of *Medicago truncatula* and *Pisum sativum*. During the differentiation of nodule cells of both species, changes were observed in the patterns of tubulin cytoskeleton. In meristematic cells, a disordered pattern of criss-crossing microtubules was formed. In uninfected cells and colonized cells, the bundles of cortical microtubules were parallel to each other and perpendicular to the longitudinal axis of the cell. In infected cells, after the release of rhizobia into the plant cell cytoplasm, bundles of cortical microtubules also formed an unordered pattern. Endoplasmic microtubules were involved in the growth of infection threads and droplets and the bacterial release from them. In nodules of *M. truncatula* and pea the networks of endoplasmic microtubules that support the orientation of bacteroids were formed, but the patterns of these networks varied between species, reflecting differences in the morphology and orientation of bacteroids. The dense network of actin microfilaments surrounded the nucleus and connected it with the cell periphery in all cell types of pea and *M. truncatula* nodules. Thickened endoplasmic actin microfilaments passed along infection threads and surrounded infection droplets. Actin cytoskeleton reorganization occurred after bacterial release into the host cell cytoplasm in infected cell. Network of thin and short actin microfilaments was developed among bacteroids in infected cells. Quantitative analysis of actin microfilament orientation revealed several patterns in infected and uninfected cells. The patterns of uninfected cells in pea and *M. truncatula* were similar but were different in infected cells, reflecting differences in the morphology and orientation of bacteroids. A detailed analysis of the cell nucleus migration during the differentiation of the plant cell was carried out. In the nodules of both species in meristematic cells, the nucleus occupied a central position. In infected cells, the nucleus was associated with infection threads. In young infected cells, the nucleus moved toward the periphery. As the number of symbioses increased, the nucleus moved toward the cell center, and subsequently adjoined the central vacuole. The study was supported with RSF (16-16-10035).

Ультраструктурные особенности симбиотических клубеньков реликтовых бобовых

Цыганова А.В., Селиверстова Е.В., Онищук О.П., Курчак О.Н., Кимеклис А.К., Сазанова А.Л., Кузнецова И.Г., Сафронова В.И., Белимов А.А., Андронов Е.Е., Цыганов В.Е.

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Пушкин 8, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: isaakij@mail.ru

Для выявления механизмов эволюции бобово-ризобиального симбиоза большой интерес представляет изучение клубеньков, формируемых реликтовыми и эндемичными бобовыми растениями. Нами был проведен ультраструктурный анализ клубеньков, формирующихся при взаимодействии *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. и *Vicia villosa* со штаммами *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae VAF12, VAF46 и VAF108; *Oxytropis popoviana* со штаммами *Mesorhizobium japonicum* Opo-242 и Opo-235, *Bradyrhizobium* sp. Opo-243, *Rhizobium lusitanum* Opo-234; *Astragalus chorinensis* со штаммами *Bosea vaviloviae* Ach-307 и *Mesorhizobium amorphae* Ach-343. Все изученные бобовые образовывали недетерминированные клубеньки с выраженной гистологической зональностью. В исследовании не все штаммы формировали эффективные клубеньки. Так, штаммы VAF46 и VAF108 формировали неэффективные белые клубеньки на Вавиловии прекрасной и Вике волосатой. Клубеньки не образовывались при инокуляции штаммом Ach-307 Астрала хоринского и штаммами Opo-243 и Opo-234 Остролодочника Попова. Поэтому использовались варианты с двойной инокуляцией с эффективными штаммами.

При инокуляции различными штаммами одних и тех же видов растений наблюдались различные морфотипы бактериоидов: от «набухших» до удлиненных и разветвленных. Для Вавиловии прекрасной было характерно формирование клубеньков, в которых инфицированные клетки содержали небольшое число бактериоидов, при этом несколько бактериоидов были окружены общей симбиотической мембраной. Данные признаки могут рассматриваться как анцестральные, что хорошо соответствует реликтовому положению данного вида. Таким образом, реликтовые и эндемичные бобовые растения, особенно Вавиловию прекрасную, и их микросимбионтов можно рассматривать как перспективные модельные объекты для исследования эволюции бобово-ризобиального симбиоза. Работа поддержана грантами РФФИ (16-16-10035, 14-26-00094П, 16-16-00080).

Ultrastructural features of symbiotic nodules of relict legumes

Tsyganova A.V., Seliverstova E.V., Onischuk O.P., Kurchak O.N., Kimeklis A.K., Sazanova A.L., Kuznetsova I.G., Saffronova V.I., Belimov A.A., Andronov E.E., Tsyganov V.E.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin 8, Saint-Petersburg, Russia

The study of nodules formed by relict and endemic legumes is of great interest to reveal the mechanisms of evolution of the legume-rhizobial symbiosis. The ultrastructural analysis of nodules formed during interaction of *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. and *Vicia villosa* with strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae VAF12, VAF46 and VAF108; *Oxytropis popoviana* with strains of *Mesorhizobium japonicum* Opo-242 and Opo-235, *Bradyrhizobium* sp. Opo-243, *Rhizobium lusitanum* Opo-234; *Astragalus chorinensis* with strains of *Bosea vaviloviae* Ach-307 and *Mesorhizobium amorphae* Ach-343 was performed.

All studied legumes formed indeterminate nodules with a pronounced histological zonation. Not all strains showed the formation of effective nodules. Strains VAF46 and VAF108 formed ineffective white nodules on *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. and *Vicia villosa*. Inoculation of *Astragalus chorinensis* with strain Ach-307 and *Oxytropis popoviana* with strains Opo-243 and Opo-234 led to the absence of nodulation. Therefore, variants with double inoculation with effective strains were used.

During inoculation with different strains of the same plant species, various morphotypes of bacteroids were observed: from swollen to elongated and branched. *Vavilovia formosa* formed nodules in which infected cells contained a small number of bacteroids; herewith several bacteroids were surrounded by a symbiosome membrane. These signs can be considered as ancestral, which well corresponds to the relict position of this species. Thus, relict and endemic legumes, especially *Vavilovia formosa*, and their microsymbionts can be considered as promising models to study the evolution of legume-rhizobia symbiosis. The work was supported by grants of Russian Science Foundation (16-16-10035, 14-26-00094P, 16-16-00080).

Вирус гранулёза яблоневой плодовой гусеницы *Cydia pomonella* как коммерческий агент биологического контроля опасного вредителя плодовых

Цыгичко А.А., Асатурова А.М.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Краснодар, Россия

E-mail: 23612361@inbox.ru

Яблоневая плодовая гусеница - экономически значимый вредитель. Экономический порог вредоносности (ЭПВ) для яблонной плодовой гусеницы устанавливается в фазе конца цветения до образования завязей кормового растения в размере повреждения 10 % завязей. Так же ЭПВ обозначен при обнаружении 2-5 яиц на 100 плодов или повреждении 2-3 % плодов (Говоров Д.Н., 2014; Щеголев В.Н., Знаменский А.В., Бей-Биенко Г.Я., 1934). Сейчас среди методов борьбы наиболее безопасный и целесообразный это биологический метод. Создание и применение биоинсектицида на основе вирусов – одна из перспективных направлений биологического метода. Вирусные биоинсектициды обладают специфической токсикологической активностью по отношению к целевым насекомым, безопасны для теплокровных, рыб, птиц и других животных (Бойкова Е.В., Ширинян Ж.А., Исмаилов В.Я., 2008; Шкаликов В.А., Белошапкина О.О., Букреев Д.Д. и др., 2001). Известно, что существует специфичность штаммов вирусов по отношению к популяциям вредителей и наиболее эффективными в данном регионе оказываются штаммы, выделенные из местных популяций. Для получения полноценно действующего в природных условиях препарата необходима правильная подборка всех его частей - вирусного агента и сорбирующего компонента (Бойкова Е.В., Ширинян Ж.А., 2008). Изучением и производством бакуловирусов и бакуловирусных препаратов занимается всего лишь несколько центров в России. На базе ФГБНУ ВНИИБЗР были поставлены опыты и получены данные в таких вопросах, как способ разведения насекомых для производства вируса; производство и испытание в лабораторных и полевых условиях бакуловирусного препарата; оценка устойчивости бакуловирусов к физическим факторам в полевых условиях; описан метод идентификации вируса гранулёза и полиэдроза среди близкородственных вирусов из насекомых, погибших от смешанной вирусной инфекции; установлен наиболее эффективный способ хранения бакуловирусного препарата (Ширинян Ж.А., Исмаилов В.Я., Сергиенко Г.А., 2004; Ширинян Ж.А., Бойкова Е.В., Исмаилов В.Я., 2006; Бойкова Е.В., Ширинян Ж.А., Исмаилов В.Я., 2008; Бойкова Е.В., Ширинян Ж.А., Исмаилов В.Я., 2010; Бойкова Е.В., 2016; Бойкова Е.В., 2016; Исмаилов В.Я., Пушня М.В., Бойкова Е.В., Умарова А.О., 2017). По данным Государственного каталога пестицидов и агрохимикатов на 2018 г. бакуловирусных препаратов против яблоневой плодовой гусеницы всего 2. В России область разработки и использования вирусных биоинсектицидов развита слабо, именно поэтому необходимы научные исследования и разработки по данной теме.

Granulovirus of *Cydia pomonella* apple moth as commercial agent of biological control of a dangerous fruit pest

Tsygichko A.A.¹, Asaturova A.M.¹

¹FSBSI All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection, Krasnodar, Russia

Apple moth is an economically significant pest. The economic threshold of severity (ETS) for the apple moth is determined in the period of the end of flowering stage to the fruit inception of the fodder plant in the amount of damage up to 10% of the buttons. ETS is also indicated when 2-5 eggs are detected per 100 fruits or 2-3% of fruits are damaged (Govorov D.N., 2014; Schegolev V.N., Znamensky A.V., Bei-Bienko G.Ya., 1934). Nowadays, one of the most safe and expedient measures of pest management is the biological method. The development and application of a bioinsecticide based on viruses is one of the promising directions of the biological method. Viral biopesticides having specific toxicological activity for the target insects, are safe for warm-blooded, fish, birds and other animals (Boykova E.V., Shirinyan Zh.A., Ismailov V.Ya., 2008; Shkalikov V.A., Beloshapkina O.O., Bukreev D.D. and others, 2001). The strains of viruses are known to possess a specificity towards the pest populations and the most effective in a particular region are the strains isolated from the local populations. To obtain a product that is fully effective in natural conditions, a correct selection of all its parts - a viral agent and a sorbent component (Boykova E.V., Shirinyan Zh.A., 2008) is necessary. The study and production of baculoviruses and baculovirus drugs are carried out only by a few centers in Russia. The researchers of the FSBSI All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection have performed experiments and obtained data on the following items: the method of breeding insects for the production of the virus; production and testing in laboratory and field conditions of the baculovirus preparation; assessment of the resistance of baculoviruses to physical factors in the field; a method for identifying the granulovirus and polyhedrosis virus among closely related viruses from insects that died from a mixed viral infection; the most effective method of storing a baculovirus product is developed (Shirinyan Zh.A., Ismayilov V.Ya., Sergienko G.A., 2004; Shirinyan Zh.A., Boykova E.V., Ismayilov V.Ya., 2006; Boykova E. V., Shirinyan Zh.A., Ismayilov V.Ya., 2008; Boykova E.V., Shirinyan Zh.A., Ismailov V.Ya., 2010; Boykova E.V., 2016; Boykova E.V., 2016 ; Ismailov V.Ya., Pushnova M.V., Boykova E.V., Umarova A.O., 2017). According to the State Catalogue of Pesticides and Agrochemicals for 2018, there are just two baculovirus preparations against apple moth. In Russia, the development and use of viral bioinsecticides are poorly developed, that is why there is a need for scientific research on this topic.

Поиск штаммов микроорганизмов – продуцентов фитогормонов для использования в биотехнологии
Чайковский В.А.

ФГБУН Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь, Россия
E-mail: v_l_a_d_91@mail.ru

Образование гормонов, стимулирующих рост сельскохозяйственных растений, является одним из важных свойств различных групп микроорганизмов. Изучение гормоносинтезирующих микроорганизмов необходимо как для выявления факторов их направленной регуляции, так и для стратегии поиска и выделения ассоциативных с растениями микроорганизмов с фиторегуляторными и биоконтролирующими свойствами. Особое значение имеет перспектива создания полифункциональных микробных биопрепаратов, разнообразие и спектр действия которых должны расширяться при снижении токсичности и отрицательного влияния на агроценозы и окружающую среду. Фитостимулирующие микроорганизмы можно использовать для индукции морфогенеза растений в культуре *in vitro*. Цель наших исследований – поиск штаммов бактерий из коллекции микроорганизмов ФГБУН “НИИСХ Крыма” продуцентов фитогормонов для применения в культуре вегетативных органов мяты *in vitro*. В результате исследований установлена ауксиновая, гибберелиновая и цитокининовая активность культуральной жидкости (КЖ) штаммов бактерий *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, *Bacillus amyloliquefaciens* 01-1, *Rhizobium radiobacter* 204 в пяти разведениях методами биотестов, определён количественный и качественный состав фитогормонов, синтезируемых штаммами изучаемых бактерий, в КЖ методом твердофазного иммуноферментного анализа. Выявлено, что наибольшей ауксиновой активностью обладает штамм *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, а наибольшей гибберелиновой активностью - штамм *Rhizobium radiobacter* 204. Фитогормональная активность КЖ сохраняется в разведениях 1:200- 1:3000. В КЖ микроорганизмов установлено содержание ауксинов на уровне 18,3 - 50,7 нг/мл и цитокининов - на уровне 1,1-11,5 нг/мл. Экспериментально показана способность изучаемых штаммов бактерий оказывать гормонозаместительное действие в культуре изолированных вегетативных органов мяты *in vitro*. Инокуляция стеблевых эксплантов мяты культуральной жидкостью микроорганизмов в трёх разведениях способствовала индукции каллусогенеза (частота каллусообразования составляла 52-80 %, масса каллуса и ростовой индекс выше, чем на контроле с применением искусственных гормонов). Цито- гистологический анализ каллусов, в которых визуально не наблюдалось образование каких – либо органов, показал наличие в них морфогенных зон, являющихся ранним этапом формирования растений – регенерантов.

Search for strains of microorganisms - producers of phytohormones for use in biotechnology

Chaikovskiy V. A.

Federal State Budget Scientific Institution “Research Institute of Agriculture of Crimea”, Simferopol, Russia

Formation of hormones that stimulate the growth of agricultural plants is one of the important properties of various groups of microorganisms. Exploration of microorganisms that synthesize hormones is necessary both for identification the factors of their directed regulation and for the strategy of search and isolation microorganisms associated with plants with phyto regulatory and biocontrol properties. The prospect of creating polyfunctional microbial biopreparations is of particular importance. Their diversity and action should be extended, but at the same time toxicity and negative influence on agrocenosis and environment should be reduced. Phytostimulating microorganisms can be used to induce plant morphogenesis in culture *in vitro*. The aim of our study is to search strains of bacteria producers of phytohormones for use in culture of vegetative organs of mint *in vitro* from the collection of microorganisms of FSBSI “Research Institute of Agriculture of Crimea”. Data on auxin, gibberellin and cytokinin activity of culture liquid (CL) of bacterial strains *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, *Bacillus amyloliquefaciens* 01-1, *Rhizobium radiobacter* 204 in five dilutions by the method of biotest was obtained as a result of studies. Quantitative and qualitative composition of phytohormones synthesized by the strains of studied bacteria was identified in CL by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The greatest auxin activity is exhibited by *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 and the greatest gibberellin activity strain – *Rhizobium radiobacter* 204. Phytohormonal activity of CL is preserved in dilutions of 1:200-1:3000. The content of auxins at the level of 18.3 - 50.7 ng/ml and cytokinins - at the level of 1.1 -11.5 ng /ml was established in the CL of microorganisms. The ability of studied bacterial strains to have a hormone replacement influence on isolated vegetative organs of mint *in vitro* has been shown experimentally. Inoculation of mint stem explants with culture liquid of microorganisms in three dilutions promoted the induction of callusogenesis (callus frequency was 52-80%, callus mass and growth index was higher compared to control when artificial hormones were used). Cytologic and histologic analysis of calli, in which no organ formation was visually observed, showed the presence of morphogenic zones, which are an indicator of early stage of the formation of plants – regenerants.

Индукция системной устойчивости растений с помощью рекомбинантных харпинов

Чеботарёв Л. Ю., Валентович Л. Н.

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

E-mail: lev.chebotarev@gmail.com

Среди известных способов защиты растений, рядом преимуществ обладают биогенные фитопротекторные средства, активирующие естественные иммунные реакции растений, в результате чего повышается общая неспецифическая устойчивость к патогенам. В частности, согласно современным литературным данным, описано множество примеров обработки растений харпинами, которые являются вспомогательными белковыми компонентами системы секреции третьего типа фитопатогенных бактерий. Взаимодействие харпинов с поверхностью растительной клетки запускает каскад биохимических реакций и приводит к развитию системной приобретённой устойчивости. Такой тип иммунного ответа является долгосрочным и повышает устойчивость растения к заболеваниям, вызываемым фитопатогенами различной природы.

Рядом зарубежных компаний уже созданы и успешно реализуются несколько коммерческих препаратов, действующим веществом которых является рекомбинантный белок HrpN, выделенный из бактерии *Erwinia amylovora*. В Республике Беларусь также проводятся исследования влияния харпинов на развитие устойчивости растений к патогенам, однако подобных препаратов ни в одной из стран СНГ пока создано не было.

Целью исследования является изучение и анализ влияния полных и частичных последовательностей белков харпинов на иммунный статус растений, что предоставит возможность создания эффективных фитопротекторных препаратов.

Нами проведена и оптимизирована экспрессия генов харпинов *hrpZ*, *hrpN*, *hrpW*, и *hpa1* штаммов фитопатогенных бактерий *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* 8, *Pectobacterium atrosepticum* 21A, 36A; *P. carotovorum* 14, 3-2, 20.1, 25.1, 2.16, 2.18; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 2.5, 5.1; *Dickeya dadantii* A3937; *Erwinia amylovora* E2. Полученные результаты демонстрируют незначительные различия в уровнях экспрессии одних и тех же генетических последовательностей в составе векторов pET42a(+) и pFLAG-CTC в штаммах *E. coli* BL21(DE3) и *E. coli* XL1-Blue, соответственно.

На данном этапе работы нами произведена наработка целевых белков и проводится тестирование способности харпинов, находящихся в составе бактериальных лизатов, ускорять рост растений и вызывать развитие системной приобретённой устойчивости у томатов сорта «Пожар» и огурцов сорта «Верасень».

Induction of systemic resistance in plants with the help of recombinant harpins

Tchebotarev L. Y., Valentovich L.N.

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Among the known methods of plant protection a number of advantages are possessed by biogenic phytoprotective agents that activate the natural immune responses of plants, as a result of which the overall nonspecific resistance to pathogens increases. In particular, according to the current literature, there are described many examples of the plants treatment with harpins which are auxiliary protein components of the type III secretion system of phytopathogenic bacteria. The interaction of harpins with the surface of the plant cell triggers a cascade of biochemical reactions and leads to the development of systemic acquired resistance. This type of immune response is long-term and it increases the plant's resistance to diseases caused by plant pathogens of different nature.

A number of foreign companies have already produced some commercial products and are successfully implementing them today. The active substance of them is the recombinant HrpN protein isolated from the bacterium *Erwinia amylovora*. In the Republic of Belarus the studies of the influence of harpins on the development of plant resistance to pathogens have also been conducted, but such drugs have not been created in any of the CIS countries so far.

The aim of the study is to examine and analyze the effect of complete and partial sequences of the harpin proteins on the immune status of plants which might provide the opportunity to create effective drugs for plant protection in future.

In our previous work we have carried out and optimized the protein expression of *hrpZ*, *hrpN*, *hrpW*, and *hpa1* genes of several strains of phytopathogenic bacteria such as *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* 8, *Pectobacterium atrosepticum* 21A, 36A; *P. carotovorum* 14, 3-2, 20.1, 25.1, 2.16, 2.18; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 2.5, 5.1; *Dickeya dadantii* A3937; *Erwinia amylovora* E2. The results show slight differences in the expression levels of the same coding sequences in the pET42a (+) and pFLAG-CTC vectors in *E. coli* BL21 (DE3) and *E. coli* XL1-Blue strains respectively.

We have already expressed the target proteins and at this stage of the work we are testing the ability of the bacterial lysates containing harpins to accelerate plant growth and cause the development of systemic acquired resistance in the tomato variety "Pozhar" and in the cucumber variety "Verasen".

CRISPR/Cas редактирование геномов растений

А.В. Чемерис

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

E-mail: chemeris@anrb.ru

После того как благодаря методам секвенирования ДНК по Максаму/Гильберту и Сэнгеру появилась возможность определять нуклеотидные последовательности в виде протяженных текстов, и с помощью биоинформатики превращать поначалу непонятные последовательности из четырех азотистых оснований (букв) в значимые участки геномов различных организмов у экспериментаторов сразу же возникло желание заняться их (текстов) редактированием. Появление методов полногеномного секвенирования многократно это желание усилило. Конечно же, изменения в конкретных генах тех или иных нуклеотидов в системах *in vitro* и *in vivo* на протяжении нескольких десятилетий с разным успехом производились, но лишь разработка технологии CRISPR/Cas редактирования геномов позволила перевести этот процесс на качественно новый уровень, обеспечив небывалую производительность. И здесь растения представляют собой во многом благодатный материал, потому что за счет своей тотипотентности могут из одной клетки с отредактированным геномом превратиться в полноценный новый организм, дающий потомство. Другой причиной обращения значительного внимания на растения служит то, что уже получено немало трансгенных растений, в том числе и вышедших в виде ГМО на поля, в геномах которых имеются дополнительные нуклеотидные последовательности, что также можно рассматривать, как их некое редактирование. Однако неприятие частью общества ГМ-растений (хотя и абсолютно необоснованное) заставляет искать альтернативные способы совершенствования важных для человека растений, и CRISPR/Cas технология в так называемом «бесследном» варианте может помочь достигнуть желаемых результатов путем нокаутирования генов, являющихся негативными регуляторами тех или иных полезных свойств сельскохозяйственных культур, фактически не приводя к созданию ГМО. Что касается внесения в геномы растений с помощью CRISPR/Cas технологии дополнительных генов, то, в отличие от создания обычных трансгенных растений, таковые внедряются в заранее подобранные участки генома, сводя к минимуму плейотропное действие генов. Тем не менее, несмотря на отмеченную выше высокую эффективность редактирования геномов с помощью CRISPR/Cas систем требуется дальнейшее улучшение этого подхода.

CRISPR/Cas genome editing of plants

A.V. Chemeris

Institute of biochemistry and genetics UFRC RAS, Ufa, Russia

After the methods of DNA sequencing by Maxam/Gilbert and Sanger sequencing appeared, it became possible to determine nucleotide sequences in the form of extended texts, and with the help of bioinformatics to turn initially incomprehensible sequences (texts) from four nitrogenous bases (letters) into essential areas of genomes of different organisms, the experimenters immediately had a desire to engage in their (texts) editing. The advent of whole genome sequencing methods such desire has increased substantially. Of course, changes in specific genes of certain nucleotides in systems *in vitro* and *in vivo* during several decades with varying degrees of success were made. But only the development of CRISPR/Cas technology for genome editing allowed to transform this process to a qualitatively new level, ensuring unprecedented productivity. And here the plants are a favorable material, because due to their totipotency it is possible to create a whole new organism that gives offspring from single cell with an edited genome. Another reason for paying considerable attention to plants is that a lot of transgenic plants have already been obtained, including those released in the form of GMOs on the fields, in whose genomes there are additional nucleotide sequences, which can also be considered as their kind of editing. However, the antagonism by part of the society towards GM-plants (though completely unfounded) forces to look for alternative ways to improve plants important for humanity. CRISPR/Cas technology in the so-called «DNA-free» variant can help achieve the desired results by knocking out genes that are negative regulators of certain useful properties of crops without actually of the creation of GMOs. With regard to the introduction of additional genes into plant genomes using CRISPR/Cas technology, in contrast to the creation of conventional transgenic plants, such are introduced into pre-selected areas of the genome, minimizing the pleiotropic effect of genes. However, despite the above-mentioned high-efficiency genome editing using CRISPR/Cas systems require further improvement of this approach.

Циклика нуклеиновых кислот

Чемерис А.В.

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

E-mail: chemeris@anrb.ru

Под таким несколько непривычным словом «циклика» подразумеваются разнообразные циклические процессы, происходящие по желанию экспериментаторов при обращении с ДНК и/или РНК, направленные на размножение данных молекул и выявление определенных (специфичных) участков этих нуклеиновых кислот, что крайне важно как для целей диагностики, так и для фундаментальных исследований.

В основе всех методов амплификации и высокочувствительной детекции специфичных фрагментов нуклеиновых кислот лежит принцип комплементарности азотистых оснований и возможность ферментативного построения комплементарных цепей, а также образования гибридных молекул, как ДНК/РНК, так и ДНК/ДНК или РНК/РНК, что дает возможность вести обнаружение специфичных для какого-либо гена или прочих участков генома или транскриптома конкретных нуклеотидных последовательностей. Фактически сформировались две группы таких методов и к одной из них можно отнести методы, направленные на увеличение числа копий фрагмента ДНК или РНК, выступающего в качестве мишени, а к другой - методы, разными способами обеспечивающие повышенную чувствительность реакции молекулярной гибридизации. Иначе все эти методы еще можно подразделить на требующие для своего протекания циклическую смену температур и на протекающие в изотермических условиях, где цикличность процесса выражается в повторении определенных стадий таких реакций, происходящих под действием ферментов или других факторов практически безостановочно. За счет этого изотермические методы амплификации и высокочувствительной детекции нуклеиновых кислот имеют определенное преимущество перед методами, зависящими от задаваемых экспериментатором параметров смены температур. Есть у изотермических методов и другие преимущества, например в виде до некоторой степени более простого приборного оснащения. Причем методов изотермической амплификации и детекции нуклеиновых кислот гораздо больше, чем методов, зависящих от смены температур, но известны они гораздо хуже. Одной из главных причин тому - очень широкое распространение полимеразной цепной реакции (ПЦР), которая благодаря своей относительной простоте стала, вне всякого сомнения, методом №1 в физико-химической биологии и в смежных дисциплинах. Однако поистине гигантские возможности метода ПЦР (точнее, целого сонма таких методов) используются крайне недостаточно, поскольку, наверное, около 90% (это невозможно точно подсчитать) случаев использования ПЦР рассчитаны на самый простой вариант этой реакции с двумя парами праймеров, одной мишенью и одной термостабильной ДНК полимеразой. Отчасти такое превалирование одного варианта этой реакции объясняется незнанием большинством экспериментаторов других более сложных вариантов ПЦР, которые на самом деле могут давать куда больший прорыв в наших знаниях о Живом.

Cyclics of nucleic acids

Chemeris A.V.

Institute of biochemistry and genetics UFRC RAS, Ufa, Russia

Under such a somewhat unusual word "cyclics" refers to a variety of cyclic processes occurring at the desire of experimenters in the manipulation of DNA and / or RNA, aimed at the reproduction of these molecules and the identification of certain (specific) sequences of these nucleic acids, which is extremely important for diagnostic purposes and for basic research. All methods of amplification and high-sensitive detection of specific nucleic acid fragments are based on the principle of complementarity of nitrogenous bases and the possibility of enzymatic construction of complementary chains, as well as the formation of hybrid molecules, such as DNA/RNA and DNA/DNA or RNA/RNA, which makes it possible to detect specific for any gene or other parts of genome or transcriptome specific nucleotide sequences. In fact, two groups of such methods were formed and one of them can be attributed to the methods aimed at increasing the number of copies of a DNA fragment or RNA acting as a target, and the other - to methods that provide increased sensitivity of the molecular hybridization reaction. Otherwise, all these methods can still be divided into those requiring for its flow cyclic change of temperature and flowing in isothermal conditions, where the cyclicity of the process is expressed in the repetition of certain stages of such reactions occurring under the influence of enzymes or other factors almost nonstop. Due to this, isothermal amplification methods and highly sensitive detection of nucleic acids have a certain advantage over the methods which depend on the temperature change parameters set by the experimenter. There are other advantages to isothermal methods, for example, in the form of using some extent simpler instrumentation. Moreover, the methods of isothermal amplification and detection of nucleic acids are much more than methods that depend on temperature changes, but they are known much worse. One of the main reasons for this is the very wide spread of polymerase chain reaction (PCR), which, thanks to its relative simplicity, has undoubtedly become the No. 1 method in molecular biology and in related disciplines. However, the truly enormous possibilities of the PCR method (more precisely, the myriad of such methods) are used extremely insufficiently, since, probably, about 90% (this is impossible to calculate accurately) of cases of PCR use are designed for the simplest variant of this reaction with two pairs of primers, one target and one thermostable DNA polymerase. In part, this prevalence of one option of this response is due to the ignorance of most experimenters of other more complex PCR options, which may actually give a much greater breakthrough in our knowledge of the Living.

Анализ смежных геномных островов у генетически неродственных штаммов *Sinorhizobium meliloti*Черкасова М.Е.¹, Мунтян В.С.¹, Румянцева М.Л.¹¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин-8, Россия

E-mail: mariacherkasova@mail.ru

Геномные острова (ГО) – протяженные мобильные генетические элементы, которые широко распространены в геномах бактерий. Значимость ГО зависит от функций генов, входящих в их состав. В геноме референс-штамма *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 выявлено два ГО (Sme19T-1021 и Sme21T-1021), tandemно расположенных в первой четверти хромосомы на расстоянии менее 100 т.п.н. друг от друга. Длина островов составляла 20.7 и 18.6 т.п.н., соответственно. Анализ открытых рамок считывания (ОРС) в составе островов показал, что 69% генов острова Sme21T-1021 кодировали гипотетические белки, 23% – белки, участвующие в процессах хранения и обработки информации; 8% – белки, задействованные в процессах защиты клетки. Смежный остров - Sme19T-1021 содержит преимущественно ОРС, кодирующие полноразмерные IS-элементы и транспозазы (56%). Более 17% ОРС детерминируют синтез гипотетических белков, продукты 11% ОРС задействованы в процессах хранения и обработки информации. Также в указанном острове выявлены гены, продукты которых участвуют в защитных процессах клетки. Представляло интерес оценить структурно-функциональные характеристики аналогичных tandemных островов Sme21T и Sme19T, также расположенных в первой четверти хромосомы, в геноме генетически неродственного штамма *S. meliloti* AK83, выделенного из района Приаралья, подверженного засолению (далее Sme21T-83 и Sme19T-83). Установлено, что протяженность острова Sme21T-83 сопоставима с таковой острова Sme21T-1021 (20.7 и 23.1 т.п.н., соответственно). В Sme21T-83 67% ОРС, кодировали гипотетические белки; 22% – белки, участвующие в процессах хранения и обработки информации; 6% – белки, задействованные в процессах защиты клетки. Кроме того, в острове Sme21T-83 выявлены гены (6%), продукты которых участвовали в метаболических процессах. Анализ острова Sme19T-83 показал, что он более чем в 2.5 раза длиннее, острова Sme19T-1021 – 48.9 тпн. Состав функциональных генов острова Sme19T-83 также отличался от Sme19T-1021. Sme19T-83 преимущественно содержал гены, кодирующие гипотетические и вирусные белки (72% и 19%, соответственно). ОРС, кодирующие белки задействованные в процессах хранения и обработка информации, а также в процессах защиты клетки, были представлены в Sme19T-83 более чем в 2.5 раза реже (4 и 5%, соответственно), чем в острове Sme19T-1021. Таким образом, острова, имеющие сходную локализацию на хромосоме *S. meliloti*, могут значительно различаться по структурно-функциональным характеристикам. Работа поддержана грантом РФФИ 17-16-01095.

Adjacent genomic islands of genetically unrelated strains of *Sinorhizobium meliloti* analysis

Cherkasova M.E., Muntyan V.S., Roumiantseva M.L.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Pushkin-8, Russia

Genomic islands (GIs) are mobile genetic elements that are wide-spread in the bacteria genomes. The importance of GIs depends on the functions of genes inherited by them. In the genome of the reference strain *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 two tandemly located GIs are located in the first quarter of the chromosome with a distance between them less than 100 kb. The length of the islands was 20.7 and 18.6 kb, respectively. An analysis of the open reading frames (ORF) located in the islands showed that 69% of the Sme21T-1021 island's genes encoded hypothetical proteins; 23% encoded proteins involved in the processes of storage and processing of information; 8% encoded proteins involved in cell protection. Adjacent island - Sme19T-1021 contains predominantly ORFs encoding full-length IS-elements and transposases (56%). More than 17% of ORFs determine the synthesis of hypothetical proteins; 11% of ORF's products are involved in the processes of storage and processing of information. Also genes, whose products are involved in cell protection, were identified in the island. It was of interest to evaluate the structural and functional characteristics of similar tandem islands Sme21T and Sme19T in the genome of a genetically unrelated strain *S. meliloti* AK83 isolated from the Aral Sea region subjected to salinization process (hereinafter Sme21T-83 and Sme19T-83). Tandem islands are also located in the first quarter of the chromosome. It was established that the length of the Sme21T-83 island is comparable to that of the Sme21T-1021 island (20.7 and 23.1 kb, respectively). In Sme21T-83 island, 67% of the ORS encoded hypothetical proteins; 22% encoded proteins involved in the processes of storage and processing of information; 6% encoded proteins involved in cell protection. In addition, 6% genes in the Sme21T-83 island encoded the proteins involved in metabolic processes. Analysis of the Sme19T-83 island showed that it is more than 2.5 times longer than Sme19T-1021 islands - 48.9 kb. The composition of the functional genes of the Sme19T-83 island also differed from Sme19T-1021. Sme19T-83 predominantly contained genes encoding hypothetical and viral proteins (72% and 19%, respectively). ORF encoding proteins involved in the storage and processing of information, as well as in cell protection, were represented in Sme19T-83 more than 2.5 times less frequently (4 and 5%, respectively) than in the Sme19T-1021 island. Thus, islands that have a similar localization on the *S. meliloti* chromosome can significantly differ in their structural and functional characteristics. The work is supported by the RSF 17-16-01095.

Характеристика размерной токсичности золотых наночастиц с использованием микропланшетной тест-системы на основе микроводоросли *Dunaliella salina*

Чумаков Д.С., Пылаев Т.Е., Авдеева Е.С., Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

E-mail: laik2012@yandex.ru

Золотые наночастицы активно используются в биомедицинской практике, однако вопрос об их биосовместимости далек от своего разрешения. Стандартным способом оценки токсичности наночастиц являются тесты на животных клетках, однако они сопряжены с денежными и временными затратами. Микроводоросли вида *Dunaliella salina*, обладают большой токсиколого-диагностической ценностью, поскольку у них отсутствует жесткая клеточная стенка, что сближает их с животными клетками в отношении механизмов взаимодействия с наноматериалами. Цель работы: исследование токсических свойств золотых наночастиц разного размера для *D.salina* и оценка возможности экстраполяции полученных результатов на животные клетки. Методом фосфониевого синтеза были получены 3 нм (ФЗНЧ-3) и 15 нм (ФЗНЧ-15) золотые наночастицы. Проводилась оценка цитотоксичности данных нанопрепаратов и ионного золота для *D.salina* и животных клеток HeLa и Vero. Тест с *D.salina* был реализован в микропланшете. В качестве тест функций фотометрически регистрировались количество клеток и содержание хлорофилла *in vivo* по высоте его пика поглощения в красной области. Расчет величины поглощения осуществляли по формуле: $A_{680} = (E_{680} - E_{740}) - (E_{640} - E_{740}) \times 0,6$. Адекватность фотометрической оценки *in vivo* проверяли фотометрическим измерением спиртовых экстрактов тех же культур. Подсчет клеток проводили на флуоресцентно-микроскопических изображениях проб после фиксации глутаровым альдегидом. Тесты с животными клетками проводили с использованием флуоресцентного красителя аламарового синего. Показано, что присутствие золотых наночастиц в суспензиях культур микроводорослей приводит к завышению величины поглощения хлорофилла на 2-10 % по сравнению с величиной поглощения в экстрактах. Также отмечается значительная корреляция между данным оптическим параметром и количеством клеток в опытных и контрольных пробах. Цитотоксические эффекты $H[AuCl_4]$ ($EC_{50} = 25.8 \pm 0.3$ мг Au/л и ФЗНЧ-3 ($EC_{50} = 32.2 \pm 1.06$ мг Au/л) для культур *D.salina* практически равнозначны. ФЗНЧ-15 не проявляют существенной токсичности во всем диапазоне исследованных концентраций. Абсолютные значения эффективности токсического действия поллютантов отличаются для культур микроводорослей и животных клеток примерно в 2 раза, однако общие тенденции и соотношение токсических эффектов остаются такими же. Так, ФЗНЧ-3 оказывались в 5 раз токсичнее ФЗНЧ-15 при всех исследованных концентрациях для клеток линии HeLa. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (16-04-00520).

Characteristics of gold nanoparticle size-dependent toxicity using microplate test –system based on using microalga *Dunaliella salina* as biosensor

Chumakov D.S., Pylaev T.E., Avdeeva E.S., Dykman L.A., Khlebtsov N.G., Bogatyrev V.A.

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

Gold nanoparticles are used in biomedical practice efficiently. However, the matter of their being biocompatible is far from being elucidated. The most common way of assessing nanoparticle toxicity is animal cells-based tests but they are cost-based and time consuming. Saline microalga *Dunaliella salina* seems to be quite promising test organism for nanoparticle toxicity testing because it lacks rigid cell wall and its membrane structure is very similar to animal cells. Therefore, *D. salina* might be considered as model of animal cell for nanotoxicology testing. The object of this work was to investigate toxic properties of gold nanoparticles with different sizes using *D.salina* cultures and to evaluate the possibility of extrapolation of gained results to animal cells. Phosphonium-stabilized 3 nm (PhCG-3), and 15 nm (PhCG-15) gold nanoparticles were synthesized. The experiments included three pollutants: $H[AuCl_4]$, PhCG-3 and PhCG-15. Toxicity tests were conducted using *D.salina* cultures and animal cells lines: HeLa and Vero. Toxicity tests were conducted in 96-well flat bottom microplates. We evaluated chlorophyll content photometrically as a test – function in microalgal suspensions *in vivo* according to chlorophyll absorption peak height in red spectral region. Chlorophyll absorption peak height *in vivo* was calculated by the following equation: $A_{680} = (E_{680} - E_{740}) - 0.6(E_{640} - E_{740})$. To confirm the adequacy of such *in vivo* assessment we also measured chlorophyll content in ethanol extracts of the same microalgal cultures. To assess cell viability fluorescent microscopy of the probes was carried out. Toxicity tests with animal cells were conducted using vital fluorescent dye alamar blue. It was shown that the presence of gold nanoparticles in *D.salina* suspensions results in overrise chlorophyll absorption *in vivo* at 2-10 %, compared with extracts of the same cultures. High correlation between chlorophyll absorption *in vivo* and number of cells was shown. Cytotoxic effects of $H[AuCl_4]$ ($EC_{50} = 25.8 \pm 0.3$ mg Au/L) and PhCG-3 ($EC_{50} = 32.2 \pm 1.1$ mg Au/L) on *D.salina* we almost equal. PhCG-15 didn't show any toxicity at all concentrations tested. Animal cells are 2-fold more tolerant to all pollutants then microalgae in terms of absolute values of toxicity efficiency. However, all tendencies and pollutant effects ratio remained the same for microalgae and animal cells. For HeLa cells, PhCG-3 was about 5-fold more toxic then PhCG-15 at all concentrations tested. This work was supported by Russian Foundation for Basic Research (№ 16-04-00520).

Геномное редактирование в приложении к кукурузе

Чумаков М.И., Волохина И.В., Гусев Ю.С., Гуторова О.В., Моисеева Е.М.

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

E-mail: chumakovmi@gmail.com

В первой части доклада представлены литературные данные по методу геномного редактирования (CRISPR/Cas9) и практике его применения на сельхозрастениях, в частности на кукурузе. Во второй части доклада представлены собственные данные экспериментов по функционированию и редактированию генов, участвующих в слиянии мембран спермия и яйцеклетки кукурузы. В частности, представлены данные по поиску, характеристике, экспрессии и редактированию генов *Zm_hap2*, *Zm_gex2*, связанных с взаимодействием и слиянием мембран спермия и яйцеклетки кукурузы. Проведено их секвенирование и сравнение у линии кукурузы, с дефектами на этапе взаимодействия и слияния спермия и яйцеклетки. Работа выполнена по Программе фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2018–2020 годы по теме «Изучение генов, контролирующего взаимодействие мембран гамет кукурузы с целью создания новых технологий биоинженерии для современной селекции» (№ гос. регистрации АААА-А17-117102740101-5) и гранта РФФИ №15-04-08413.

Genome editing as applied to maize

Chumakov M.I., Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Gutorova O.V., Moiseeva E.M.

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

The first part of this report presents literature data on the genome editing method (CRISPR/Cas9) and on its application to agricultural plants, in particular maize. The second part of the report deals with the presenter's own data on the genetic control of plant gamete interaction and gamete membrane fusion. In particular, data will be presented on the detection of gamete interaction and membrane fusion genes (*Zm_hap2*, *Zm_gex2*) in maize genome. Experimental data will be discussed concerning the search for, expression, sequencing, and editing of maize gamete interaction and fusion genes.

This work was carried out within the basic research program of the Russian Academy of Sciences for 2018-2020 (№ АААА-А17-117102740101-5) and Russian Foundation for Basic Research (№ 15-04-08413).

Влияние корневой экссудации сахаров на интенсивность развития корневой гнили у растений пшеницы и ячменя

Шапошников А.И., Струнникова О.К., Макарова Н.М., Вишневецкая Н.А., Шахназарова В.Ю., Белимов А.А.
ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия
E-mail: ai-shaposhnikov@mail.ru

Исучен состав и интенсивность экссудации основных сахаров у различных генотипов пшеницы *Triticum aestivum* L. (Веда, Безостая 1, Лилек, Лебедь) и ячменя *Hordeum vulgare* L. сорта Белогорский на раннем этапе (5 суток) развития растений. Установлено, что основными компонентами фракции сахаров у всех генотипов были фруктоза, глюкоза, мальтоза и мелибиоза, причем у пшеницы сорта Лебедь и ячменя сорта Белогорский доля глюкозы в общей экссудации сахаров превышала 60%. Наименьшая суммарная экссудация сахаров отмечена у сортов Веда, Безостая 1 и Лилек (5-7 мг/г сухой биомассы), наибольшая – у сорта Лебедь (30 мг/г сухой биомассы) и ячменя (270 мг/г сухой биомассы).

В результате проведенных вегетационных экспериментов была выявлена связь между устойчивостью растений к корневой гнили, вызываемой *Fusarium culmorum*, и интенсивностью экссудации сахаров. Наиболее значительное увеличение плотности гриба было отмечено в ризосфере пшеницы сорта Лебедь и у ячменя сорта Белогорский, выделяющих повышенное количество сахаров (в основном глюкозы), что приводило в дальнейшем к значительно более интенсивному развитию симптомов корневой гнили.

Полученные данные могут быть полезны в селекции растений с нужным составом корневых экссудатов, а также при подборе антагонистических ризобактерий, способных влиять на фитопатоген и растение на ранних стадиях формирования растительно-микробных систем.

Эксперименты с пшеницей выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 15-04-09023, эксперименты с ячменем – при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 18-016-00111.

Effect of sugars root exudation on the intensity of development of root rot in plants of wheat and barley

Shaposhnikov A.I., Strunnikova O.K., Makarova N.M., Vishnevskaya N.A., Shakhnazarova V. Yu., Belimov A.A.
All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia

The composition and intensity of the exudation for the main sugars in various genotypes of wheat *Triticum aestivum* L. (Veda, Bezostaya 1, Lilyok, Swan) and barley *Hordeum vulgare* L. variety Belogorsky at an early stage (5 days) of plant development were studied. It was established that the main components of the sugar fraction in all genotypes were fructose, glucose, maltose and melibiose. For the *T. aestivum* L. var. Swan and barley Belogorsky variety, the share of glucose in the total exudation of sugars exceeded 60%. The lowest total exudation of sugars was observed in varieties Veda, Bezostaya 1 and Lilyok (5-7 mg/g dry biomass), the largest – in the Swan variety (30 mg/g dry biomass) and barley (270 mg/g dry biomass).

As a result of the vegetation experiments, a relationship between the plant resistance to root rot caused by *Fusarium culmorum* and the intensity of sugar exudation was found. The most significant increasing in the density of the *F. culmorum* was observed in the rhizosphere of wheat of the Swan variety and in barley of the Belogorsky variety, which produced increased amount of sugars (mainly glucose), which subsequently led to a much more intensive development of symptoms of root rot.

The obtained data can be useful in plant breeding for the desired composition of root exudates, as well as in the selection of antagonistic rhizobacteria that can affect the phytopathogens and plants in the early stages of the formation of the plant-microbe systems.

The reported studies were funded by RFBR according to the research project 15-04-09023 for wheat and according to the research project 18-016-00111 for barley.

Влияние фталатов на рост и биопленкообразование биотрофных и некротрофных фитопатогенных бактерий

Шафикова Т.Н., Омеличкина Ю.В., Еникеев А.Г., Бояркина С.В., Гвильдис Д.Э., Семенов А.А.

СИФИБР СО РАН, Иркутск, Россия

E-mail: bougourte@gmail.com

Эфиры ортофталевой кислоты, также известные как «фталаты» это распространенные в настоящее время поллютанты, продукты органического синтеза. Широко известно, что фталаты токсичны для большинства форм жизни, но, несмотря на это, существуют данные об их обнаружении в ряде растений, водорослей и грибов в качестве биогенных продуктов. Цель данного исследования выявить действие диэтилгексилфталата (DEHP) и дибутилфталата (DBP) на образование биопленок у биотрофных *Clavibactermichiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) и некротрофных *Pectobacteriumcarotovorum* ssp. *carotovorum* (*Pcc*). В результате проведенных исследований впервые было установлено, что добавление DBP в питательную среду замедляло формирование биопленок у исследуемых бактерий пропорционально дозе фталата, однако стимулировало рост популяции при концентрации 10^{-8} М. Добавление DEHP демонстрировало те же эффекты, за исключением стимуляции популяционного роста при всех концентрациях добавляемого эфира. В то же время, образование биопленок у *Pcc* подавлялось с наибольшей интенсивностью как DBP, так и DEHP при концентрации 20 μ М. Полученный результат позволяет предположить, что эфиры ортофталевой кислоты являются участниками защитных реакций растений, противодействующих бактериальной колонизации.

Phthalic acid esters suppress plant pathogens ability to produce biofilms and affect bacterial population growth

Schafikova T.N., Omelichkina Y.V., Enikeev A.G., Boyarkina S.V., Gvildis D.E., Semenov A.A.

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Irkutsk, Russia

Phthalic acid esters are industrial chemicals that have become environmental pollutants because of their widespread usage. It is well-known that phthalates are toxic against most of living forms, although there are numerous publications showed phthalates presence in different plants, algae and fungi as natural compounds. The aim of this study was to analyze bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and dibutyl phthalate (DBP) interaction with bacterial plant pathogens biotrophic *Clavibactermichiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) and necrotrophic *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* (*Pcc*), mainly their growth and biofilm producing ability. It was shown, that adding DBP in culture medium lowers bacterial biofilm producing ability according to dose-related law, although at 10 μ М concentration it stimulates *Pcc* population growth. Adding DEHP in culture medium shows the same results, except for *Pcc* population growth stimulation at all three concentrations used. *Pcc* population growth had been suppressed *ad maximum* at 20 μ М in both DEHP and DBP samples. Obtained data allows us to suggest that phthalic acid esters might be one of many compounds of plant defense mechanisms against bacterial colonization.

Роль метилжасмоната и цитокинина 6-бензиламинопурина в укреплении барьерных свойств клеточных стенок пшеницы при заражении *Septoria nodorum* Berk

Шакирова Ф.М., Безрукова М.В., Аллагулова Ч.Р., Масленникова Д.Р., Лубянова А.Р.

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

E-mail: shakirova@anrb.ru

Пристальное внимание исследователей к жасмоновой кислоте и ее производному метилжасмонату (МеЖ) вызвано их ключевой ролью в регуляции формирования индуцированной системной устойчивости при инфицировании фитопатогенами. В защиту растений от патогенов, преимущественно биотрофной природы, вовлекаются также и цитокинины. Данная работа была посвящена сопоставлению регуляторного действия МеЖ и цитокинина 6-бензиламинопурина (БАП) в формировании устойчивости пшеницы к возбудителю септориоза гемиботрофному грибу *S. nodorum*, сочетающему в своем жизненном цикле биотрофную и некротрофную стадии развития. С этой целью был проведен сравнительный анализ влияния 100 нМ МеЖ и 44 нМ БАП, оптимальных в стимуляции роста проростков пшеницы концентраций, на количественный уровень локализованной в апопласте анионной изопероксидазы (АП), задействованной в формировании устойчивости пшеницы к септориозу. Предпосевная обработка семян пшеницы сорта Башкирская 26 фитогормонами не оказала влияния на уровень АП в проростках, при этом инфицирование растений *S. nodorum* вызвало увеличение количественного уровня АП в проростках на 130 % и 150 % на первые и вторые сутки заражения, соответственно. Предобработка МеЖ или БАП существенно снизила уровень индуцированного возбудителем болезни накопления АП, при этом наиболее выраженный защитный эффект наблюдался в предобработанных МеЖ растениях. Полученные результаты указывают на эффективность применения исследуемых гормонов с целью повышения устойчивости растений пшеницы к *S. nodorum*. Важный вклад в БАП- и МеЖ-индуцированное торможение распространения болезни по растению вносит выявленная нами их способность усиливать отложение лигнина в клеточных стенках базальной части корней. В пользу этого предположения свидетельствуют данные анализа отложения лигнина, который ко вторым суткам заражения выявил слабую лигнификацию клеточных стенок центрального цилиндра на фоне отсутствия отложения лигнина в корнях контрольных проростков. Предобработка МеЖ способствовала дополнительному усилению отложения лигнина в клеточных стенках центрального цилиндра. В корнях предобработанных БАП проростков дополнительной лигнификации подвергались также и клетки коры. Совокупность полученных результатов может служить важным аргументом в пользу вовлечения эндогенных цитокининов в проявление протекторного эффекта метилжасмоната на растения пшеницы в условиях инфицирования *S. nodorum*.

The role of methyl jasmonate and cytokinin 6-benzylaminopurine in enhancing the barrier properties of wheat cell wall when infected with *Septoria nodorum* Berk

Shakirova F.M., Bezrukova M.V., Allagulova C.R., Maslennikova D.R., Lubyanova A.R.

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

Close attention to jasmonic acid and one of its most active derivatives methyl jasmonate (MeJA) is caused by their key role in the formation of induced systemic resistance of plants at pathogenic infection. At the same time, it is known that cytokinins are also involved in plants protection to pathogens, but mainly biotrophic ones. In order to reveal the involvement of MeJA and cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) in the wheat resistance to *S. nodorum*, fungus which combines the biotrophic and necrotrophic stages of development, we have to spent a comparative analysis of the effects of 100 nM MeJA and 44 nM BAP at the growth stimulating concentration on the quantitative level of anionic isoperoxidase (AP) which is localized in the apoplast and involved in the wheat resistance to septoriosis. Presowing treatment of the seeds with each of the phytohormones had no influence on the peroxidase level in the wheat seedlings. *S. nodorum* caused 130% and 150% increasing in the AP level in the wheat seedlings on the first and second day of infection, respectively. Pretreatment of the seeds by each of the phytohormones significantly reduced the level of AP accumulation in the wheat seedlings. The most pronounced protective effect was observed in plants pretreated with MeJA. The obtained results indicate the effectiveness of studied hormones in order to increase the resistance of wheat plants to *S. nodorum*. An important contribution to MeJA- and BAP- induced inhibition of disease spread is their ability to enhance the lignin deposition in the cell walls of the root basal part of the wheat plants. Strong arguments in favor of this assumption are the data of lignin deposition analysis, which showed that on the second day of infection there was a slight lignification of the cell walls of the central cylinder against the background of the absence of lignin deposition in the roots of the control plants. Pretreatment with MeJA promoted an additional increasing in lignin deposition in the cell walls of the central cylinder. In the roots of BAP-pretreated seedlings, additional lignification was also detected in the cortex cells. The obtained results may indicate the involvement of endogenous cytokinins in the realization of methyl jasmonate protective effect on wheat plants when infected by *S. nodorum*.

Прогестерон и адренодоксинподобные ферредоксины митохондрий как компоненты новой системы стероидной гормональной регуляции у высших растений

¹Шематорова Е.К., ¹Словохотов И.Ю., ²Бабак О.Г., ³Халилуев М.Р., ¹Шпаковский Д.Г., ^{2,4}Спивак С.Г., ¹Шпаковский Г.В.

¹ФГБУН Институт биоорганической химии имени М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

²Государственное научное учреждение Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

³ФГБНУ ВНИИСБ, Москва, Россия

⁴Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

E-mail: gvs@ibch.ru

Одним из универсальных, свойственной всему живому, классов регуляторов роста и развития являются химические соединения группы стероидов. В отличие от животных и дрожжей, у которых практически единственными стероидными липидами являются соответственно холестерин и эргостерин, в растениях присутствуют по крайней мере четыре вида фитостероидов: β -ситостерин, кампестерин, стигмастерин и холестерин. От кампестерина ведёт своё начало известный с начала 80-ых годов прошлого века путь биосинтеза особого класса стероидных гормонов растений – brassinosterоидов, а в последние годы доказано присутствие in planta целого ряда стероидных соединений гормонального ряда, свойственных животным: прегненолон сульфат, прогестерон, 17-гидроксипрогестерон, 16-дегидропрогестерон, андростендион. В то же время, в растениях не обнаружены гены, кодирующие ключевой фермент первой стадии стероидогенеза CYP11A1 (P450scs) и другие митохондриальные цитохромы P450 (клан 'mito CYP'), а значит начальный этап классической схемы биосинтеза стероидных гормонов должен осуществляться в растениях каким-то другим путём. Мы впервые получили трансгенные растения табака, наперстянки и томата, эффективно экспрессирующие кДНК гена CYP11A1 млекопитающих, и показали, что значительное (примерно в 5 раз) повышение в этих трансгенных растениях уровня эндогенного прогестерона приводит к таким гормональным эффектам, как ускорение процессов роста и развития, существенное повышение устойчивости растений к абиотическим (засуха, засоление) и биотическим (инфекции *Botrytis cinerea* и *Cladosporium fulvum*) стрессам. Формирование вышеупомянутых успешных фенотипов у полученных трансгенных растений семейств *Solanaceae* и *Scrophulariaceae*, экспрессирующих кДНК цитохрома P450scs (CYP11A1) млекопитающих, подразумевает, что прогестерон можно считать очень древним биорегулятором растительных клеток и, пожалуй, первым настоящим гормоном, общим для растений и животных. Обнаружение нами в растениях митохондриальных адренодоксинподобных [2Fe-2S] ферредоксинов MFDX1 и MFDX2 и структурного гомолога адренодоксинредуктазы MFDR, а другими авторами – мембранных рецепторов прогестерона и гомологов белков, ответственных за доставку холестерина в митохондрии клеток животных, позволяет впервые представить общие очертания новой, «прогестероновой» системы стероидной гормональной регуляции у высших растений.

Progesterone and adrenodoxin-like mitochondrial ferredoxins as components of a new steroid hormone regulatory system in higher plants

¹Shematorova E.K., ¹Slovokhotov I.Yu., ²Babak O.G., ³Khaliluev M.R., ¹Shpakovski D.G., ^{2,4}Spivak S.G., ¹Shpakovski G.V.

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

³All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

⁴Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

One of the versatile, characteristic for all living organisms, classes of growth and development regulators are chemical compounds of the steroid group. Unlike animals and yeast, which contain virtually the only one steroid lipid, cholesterol and ergosterol, respectively, in plants there are at least four types of phytosterols: β -sitosterol, campesterol, stigmasterol and cholesterol. The path of the biosynthesis of a special class of steroid plant hormones, brassinosteroids, known since the early 80-ies of the last century, originates from campesterol, and in recent years the clear evidences for the presence in planta of a number of hormonal steroid compounds peculiar for animals (pregnenolone sulfate, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, 16-dihydroprogesterone, androstenedione) have been accumulated. At the same time, no genes encoding the key enzyme CYP11A1 (P450scs) of the first stage of steroidogenesis and other mitochondrial cytochrome P450 (the 'mito CYP' clan) were found in plants, which means that the initial stage of the classical scheme of steroid hormones biosynthesis should be carried out in plants in some other way. We obtained for the first time transgenic plants of tobacco, *Digitalis* and tomato, effectively expressing cDNA of the mammalian CYP11A1 gene, and showed that a significant (about 5 times) increase in the level of endogenous progesterone in these transgenic plants leads to hormonal effects such as acceleration of processes of growth and development, a significant increase in plants resistance to abiotic (drought, salinity) and biotic (*Botrytis cinerea* and *Cladosporium fulvum* infections) stresses. The formation of the above-mentioned 'successful' phenotypes of the resulting transgenic plants of the *Solanaceae* and *Scrophulariaceae* families, expressing cDNA of the mammalian cytochrome P450scs (CYP11A1), implies that progesterone can be considered as a very ancient bioregulator of plant cells and, perhaps, the first real hormones that are common to plants and animals. Our detection in plants of mitochondrial adrenodoxin-like [2Fe-2S] ferredoxins MFDX1 and MFDX2 and structural homologue of adrenodoxin reductase MFDR, and discovery by other authors membrane receptors of progesterone and homologues of proteins responsible for delivery of cholesterol in animal cells' mitochondria, allows for the first time to present the general outlines of a new, 'progesterone' system of steroid hormonal regulation in higher plants.

Метагеномный анализ микрофлоры почв, воды и осадков шламохранилища ОАО "Сода", г. Березники (Пермский край)

Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г.

Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия

E-mail: Anechka_Shilova@mail.ru

Содовые озера представляют собой экосистему с двойными экстремальными условиями: высокая карбонатная щелочность в растворе, которая обеспечивает высокий уровень pH, а также высокая соленость. Данные условия позволяют доминировать прокариотной компоненте в составе галоалкалофильного микробного сообщества. В экстремальных условиях обнаруживаются микроорганизмы, не встречающиеся в других экосистемах, что говорит об актуальности изучения биоразнообразия таких местообитаний. Кроме того, изучение функциональной структуры микробных сообществ содовых озер дает новые сведения о границах устойчивости микробных сообществ в экстремальных условиях.

Данная работа направлена на изучение щелочных биотопов антропогенного происхождения, а именно изучение микробиоценоза шламохранилища содового завода ОАО «Сода» г. Березники (Пермский край), а также осушенных территорий старого содового озера, на которых началось восстановление растительного покрова.

Проведен метагеномный анализ образцов. Выявлено, что в составе микрофлоры образцов взятых на территории шламохранилища, преобладают представители фил Proteobacteria и Firmicutes. Установлено, что доминирующими являются виды *Staphylococcus sciuri* и *Acinetobacter baumannii*, ДНК которых в разных образцах составляет в совокупности от 45 до 96% выделяемого метагенома. Причем количество представителей *Staphylococcus* во всех образцах было выше, чем *Acinetobacter* на 30,4-54,6%. В поверхностной зоне старого содового озера также доминировали данные виды с небольшим преобладанием *Acinetobacter baumannii*.

Большие отличия видового разнообразия метагеномных последовательностей наблюдались в образцах старого содового озера, отобранных на глубине 10 см. Установлено, что в этих образцах преобладают представители класса Actinobacteria, в частности рода *Cellulomonas* (*Cellulomonas uda*), содержание которых составляло 25,6%. В целом данные образцы отличались большим видовым разнообразием (обнаружены представители более 60 родов бактерий). Также значительную долю составляли культуры *Lactococcus* (*Lactococcus fujiensis*) и *Ralstonia* (*Ralstonia pickettii*). Таким образом, выявлены значительные изменения в составе микроценоза в процессе естественного восстановления почвенной экосистемы.

Metagenomic analysis of the microflora of soils, water, sediments of the sludge storage facility of ОАО Soda, Berezniki city (Perm edge)

Shilova A.V., Maksimov A.Yu., Maksimova Yu.G.

Perm Federal Research Center UB RAS "IEGM UB RAS", Perm, Russia

Soda lakes are an ecosystem with double extreme conditions: high carbonate alkalinity in solution, which provides a high pH level, as well as high salinity. These conditions allow to dominate in the haloalkalophilic microbial community of prokaryotic component. In extreme conditions microorganisms is found, which don't meet in another ecosystems. This says about topical of study biodiversity such habitat. Besides, research of functional structure of microbial community of soda lakes gives a new data about boundaries of stability microbial community in the extreme conditions. This paper is aimed at study of alkaline biotops of anthropogenic origin, namely study of microbiocenoses of the sludge storage facility of ОАО Soda, Berezniki city (Perm edge), and drained territories of the old soda lake, where repaired began of plant cover.

The metagenomic analysis of samples is made. It was revealed, that in composition of microflora samples, which was taken in territory of sludge storage, prevail phill of Proteobacteria and Firmicutes. It was established, that species of *Staphylococcus sciuri* and *Acinetobacter baumannii* are dominated. Their DNA amount 45-95% of extracted genome in different samples. The quantity of representatives of *Staphylococcus* was higher in all samples, than of *Acinetobacter* by 30,4-54,6%. In the surface zone of the old soda lake also these species are dominated with small amount of *Acinetobacter baumannii*.

Big differences in the species diversity of metagenomic sequences were observed in the samples of the old soda lake, which were taken at a depth of 10 cm. It was established, that in this samples representatives of class Actinobacteria, in particular genus *Cellulomonas* (*Cellulomonas uda*) prevailed, content of which was 25.6%. In general, these samples were distinguished by a large species diversity (representatives of more than 60 genera of bacteria were found). *Lactococcus* (*Lactococcus fujiensis*) and *Ralstonia* (*Ralstonia pickettii*) also played a significant role. Thus, significant changes in the composition of the microcenosis during the natural restoration of the soil ecosystem have been revealed.

Биотехнология в садоводстве и питомниководстве

Шипунова А.А.

НПЦ «Фитогенетика», Тула, Россия

E-mail: npc.fitogenetika@ya.ru

Показана необходимость оздоровления посадочного материала как для закладки товарных плантаций, так и для целей размножения растений в питомниках. Задача садоводства – получение максимально возможных урожаев, а задача питомников – обеспечить садоводческие хозяйства качественным посадочным материалом. Поэтому стратегией развития садоводства в целом должно быть масштабное оздоровление садовых культур и производство безвирусного посадочного материала на базе крупных биотехнологических комплексов. Научно-производственный центр «Фитогенетика» в г.Туле, имеющий 4 лаборатории клонального размножения, делает всё возможное в этом направлении. В производстве центра находятся такие культуры, как земляника, ежевика, малина, жимолость, виноград, актинидия, вишня, слива, алыча, рябина, сирень, рододендроны и другие. Общий объём производства – около 1 млн. растений. Мы тестируем наши растения в институте плодоводства в Самохваловичах (Беларусь). Тестируем наиболее уязвимые в плане вирусов культуры – вишню, сливу, малину. Как правило, результаты тестирования подтверждают эффективность микроклонального способа размножения. Тестируемые растения мы используем для закладки здоровых маточников. Как у плодовых, так и у декоративных культур отмечаем хороший жизненный потенциал, устойчивость к неблагоприятным условиям среды и прессингу болезней и вредителей.

Biotechnology in horticulture and nursery

Shipunova A.A.

Scientific Production Centre of Biotechnology «Fitogenetika», Tula

The necessity of planting stock sanitation for both establishment of cash crop plantations and propagation of plants in nurseries is mentioned. If horticulture is aimed to achieving of maximum possible crops then nurseries duty is to provide horticultural business with high-quality planting stock. So a large-scale sanitation of horticultural crops and production of virus tested stem cuttings based on large biotechnological complexes must be a strategy for development of horticulture as a whole. "Fitogenetika" Scientific Production Centre in Tula with its four clonal micropropagation laboratories does its best in this field. Such cultures as strawberry, blackberry, raspberry, lonisery, grape, actinidia, cherry, plum, sorbus, lilac, rhododendron etc. are produced in the Centre. The overall production volume amounts to one million plants. We test our plants in the Institute of Fruit Growing in Samokhvalovichy (Byelorussia). We test crops which are the most vulnerable to viruses - cherries, plums, raspberries. As a rule results of testing confirm effectiveness of microclonal propagation. We use tested plants while establishing virus-free mother plantations. Good biotic potential, sustainability in difficult environments and under pressure of diseases and crop pests are registered for both horticultural and decorative cultures.

Сравнительная оценка синтеза индольных соединений ассоциативными метилотрофными бактериями

Широких А.А., Широких И.Г., Назарова Я.И., Абубакирова Р.И.

ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого», Киров, Россия

E-mail: irgenal@mail.ru, aleshirokikh@yandex.ru

Актуальность изучения ассоциативных метилотрофных бактерий, использующих одноуглеродные органические соединения (метанол, метиламин и др.), выделяемые растением в процессе метаболизма, обусловлена их способностью оказывать на растения фиторегуляторное действие, на чем основано функционирование т.н. «метанольного цикла». Помимо растений, метилотрофы могут выделяться из других экологических ниш, на первый взгляд, не связанных с функционированием «метанольного цикла». Так, в микроскопических препаратах, приготовленных из спорокарпов грибоподобных протистов - миксомицетов, постоянно обнаруживаются грамотрицательные подвижные бактерии, которые растут на минеральной среде с метанолом. Плазмодий миксомицетов, перемещаясь по поверхности растений, питается бактериями. Некоторые из них остаются в плазмодии и, в процессе сложного жизненного цикла миксомицетов, попадают в спорокарпы этих организмов.

Цель работы заключалась в сравнении уровня синтеза индольных соединений изолятами метилотрофных бактерий из филлопланы зерновых культур и спорокарпов миксомицетов семейства Trichiaceae.

Из филлопланы ячменя, овса, ржи и тритикале на минеральной среде с метанолом были изолированы 25 штаммов бактерий. Из спорокарпов миксомицетов *Trichia decipiens* и *Metatrichia vesparia* на минеральном агаре с 2 об.% метанола было получено 15 штаммов. Все культуры были протестированы в присутствии 200 мг/л триптофана на способность к синтезу ауксинов (индольных соединений) с реактивом Сальковского. Установлено, что метилотрофы, изолированные с листьев овса, ячменя и тритикале, способны продуцировать ауксины в количестве от 1,5 до 8,6 мкг/мл, в среднем для выборки - $6,8 \pm 0,69$ мкг/мл. Уровень синтеза ауксинов бактериями, изолированными из спорокарпов миксомицетов, был существенно выше, изменяясь от 9,1 до 33,4 мкг/мл в зависимости от штамма, и составил в среднем $14,6 \pm 0,71$ мкг/мл. Штаммы, с уровнем синтеза индольных соединений ≥ 15 мкг/мл, стимулировали рост проростков пшеницы в большей степени, чем изоляты из филлопланы, обеспечив прирост сухой биомассы 40-53% по сравнению с контролем. Наиболее активные продуценты ауксинов среди бактерий-ассоциантов миксомицетов были идентифицированы на основании структуры гена 16S рРНК как *Ewingella americana* (штамм 66мт) и *Sphingobacterium kitahiroshimense* (штамм 67мт). Таким образом, спорокарпы миксомицетов являются эконошей для изоляции бактерий с фиторегуляторными свойствами.

A comparative evaluation of the synthesis of indole compounds by associative methylotrophic bacteria

Shirokikh A.A., Shirokikh I.G., Nazarova Y.I., Abubakirova R.I.

Rudnitsky Federal agricultural research center of North-East, Kirov, Russia

The relevance of the study of associative methylotrophic bacteria, using single-carbon organic compounds (methanol, methylamine, etc.), released by the plant in the process of metabolism, is due to their ability to exert a phyto-regulatory effect on plants, which is the basis for the functioning of the "Methanol cycle." In addition to plants, methylotrophs can be isolated from other ecological niches, at first glance, not associated with the functioning of the "methanol cycle." So, in microscopic preparations prepared from sporocarpous mushroom-like protists - myxomycetes, Gram-negative mobile bacteria are constantly found which grow on a mineral medium with methanol. Plasmodium myxomycetes, moving on the surface of plants, feeds on bacteria. Some of them remain in the plasmodium and, during the complex life cycle of myxomycetes, get into sporocarps of these organisms.

The aim of the study was to compare the level of synthesis of indole compounds with isolates of methylotrophic bacteria from cereal crop phylloplanes and sporocarps of Myxomycetes Trichiaceae family.

From the phylloplanes of barley, oats, rye and triticale on a mineral medium with methanol, 25 strains of bacteria were isolated. From the sporocarp of Myxomycetes *Trichia decipiens* and *Metatrichia vesparia* on mineral agar with 2 vol% methanol, 15 strains were obtained. All cultures were tested in the presence of 200 mg/l tryptophan on the ability to synthesize auxins (indole compounds) with the Salkovsky reagent. It has been established that methylotrophs isolated from the leaves of oats, barley and triticale are able to produce auxins in the amount of 1.5 to 8.6 $\mu\text{g/ml}$, on average for the sample - 6.8 ± 0.69 $\mu\text{g/ml}$.

The level of auxin synthesis by bacteria isolated from the sporocarp of myxomycetes was significantly higher, varying from 9.1 to 33.4 $\mu\text{g/ml}$ depending on the strain, and averaged 14.6 ± 0.71 $\mu\text{g/ml}$. The strains, with a level of synthesis of indole compounds ≥ 15 $\mu\text{g/ml}$, stimulated the growth of wheat sprouts more than the isolates from the phylloplanes, providing a 40-53% increase in dry biomass compared to the control. The most active producers of auxins among the bacterium associates of myxomycetes were identified based on the 16S rRNA gene structure as *Ewingella americana* (strain 66mt) and *Sphingobacterium kitahiroshimense* (strain 67mt). Thus, sporocarps Myxomycetes are ekonishey for isolation of bacteria with phyto-regulatory properties.

Биотехнологическое применение актинобактерий как промоутеров роста растений

Широких И.Г.

ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого», Киров, Россия

E-mail: irgenal@mail.ru

В соответствии с экофизиологической концепцией, растение формирует в ризосфере, а также в своих тканях континуум бактерий, способствующих его росту и защите от фитопатогенов (PGPB - plant growth promoting rhizobacteria). Актинобактериям принадлежит особое место среди представителей других таксонов PGPB, поскольку они имеют высокую численность (10^7 - 10^8 КОЕ/г) в почвах и ризосфере, морфологически хорошо адаптированы к эдафическим условиям. Актиноризные системы включают около 200 видов растений, принадлежащих к 25 родам из восьми семейств. Количество родов, которые можно отнести к PGPB, среди актинобактерий примерно на треть больше, чем среди других бактериальных таксонов. PGPB обнаружены среди представителей 12 из имеющихся 15 порядков класса Actinobacteria. Кроме того, доля генома (от 5 до 10 %), детерминирующая продукцию вторичных метаболитов у актинобактерий значительно больше, чем у других бактерий. Благодаря этому генетически обусловленному потенциалу актинобактерии являются мощным источником биологически активных соединений, которые могут способствовать росту или предотвращению заболеваний растений. Среди ассоциированных с различными растениями видов, преобладают *Streptomyces* spp. из порядка Actinomycetales. Для подобных ассоциаций не характерно формирование специализированных симбиотических структур, но взаимодействие с растением при этом может характеризоваться видо- или штаммоспецифичностью. Положительное влияние актинобактерий на растения реализуется посредством самых разных механизмов, включая обеспечение питательными веществами, регуляцию метаболизма растений, противодействие экологическим стрессам, включая детоксикацию металлов, контроль фитопатогенов и улучшение структуры почвы. Важной предпосылкой к использованию актинобактерий в качестве PGPB является крайне незначительное распространение среди них фитопатогенных видов (*Streptomyces scabies*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies*, *S. ipomoeae*, отдельные виды рода *Rhodococcus*). Наряду с предпосевной инокуляцией семян или почвы вегетативными клетками или спорами актинобактерий, их вторичные метаболиты могут быть использованы для производства биопестицидов и биоудобрений. Применение микробных препаратов на основе актинобактерий позволяет снизить затраты на агрохимикаты и уменьшить хемогенную нагрузку на окружающую среду, что соответствует принципам адаптивного земледелия.

Biotechnological application of actinobacteria as plant growth promoter

Shirokikh I.G.

Rudnitsky Federal agricultural research center of North-East, Kirov, Russia

In accordance with the ecophysiological concept, the plant forms in the rhizosphere, as well as in tissues a continuum of bacteria that contribute to its growth and protection from phytopathogens (PGPB - plant growth promoting rhizobacteria). Actinobacteria have a special place among the representatives of other taxa PGPB, because they have a high number (10^7 - 10^8 CFU/g) in soils and the rhizosphere, morphologically well adapted to edaphic conditions. Actinorhizae systems include about 200 species of plants belonging to 25 genera from eight families. The number of genera, which can be attributed to PGPB, among actinobacteria is about a third more than among other bacterial taxa. PGPS were detected among representatives of 12 of the available 15 orders of the Actinobacteria class. In addition, the share of genome (from 5 to 10%), determining the production of secondary metabolites in actinobacteria is much greater than that of other bacteria. Due to this genetically determined potential actinobacteria are a powerful source of biologically active compounds that can contribute to the growth or prevention of plant diseases. Among the species associated with different plants, dominated by *Streptomyces* spp. from the order Actinomycetales. Such associations are not characterized by the formation of specialized symbiotic structures, but the interaction with the plant may be characterized by species - or strains specificity. The positive effect of actinobacteria on plants is realized through a variety of mechanisms, including the provision of nutrients, regulation of plant metabolism, combating environmental stress, including detoxification of metals, control of phytopathogens and improvement of soil structure. An important prerequisite for the use of actinobacteria as PGPB is a very small spread among them phytopathogenic species (*Streptomyces scabies*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies*, *S. ipomoeae*, some species of the genus *Rhodococcus*). Along with presowing inoculation of seeds or soil by vegetative cells or spores of actinobacteria, their secondary metabolites can be used for the production of biopesticides and biofertilizer. Application of microbial preparations on the basis of actinobacteria allows to reduce the costs of agro-chemicals and to reduce chemical load on the environment, which corresponds to the principles of adaptive agriculture.

Разработка биопрепарата на основе штамма *Bacillus thuringiensis* эффективного против личинок колорадского жука

Шмидт К.Н.

ООО "НВП "БашИнком", Уфа, Россия

E-mail: schmidt.christinal@yandex.ru

В настоящее время серьезной проблемой сельского хозяйства является предотвращение потерь урожая растениеводства от различных вредителей. Для борьбы с этим явлением широко применяются химические препараты. Но для сельского хозяйства наиболее перспективны препараты на основе бактерий, так как выявлено, что биологические методы борьбы наиболее экологически безопасны и не несут негативного воздействия на организм человека.

Сегодня на рынке представлено большое количество препаратов на основе микробных культур, в частности *Bacillus thuringiensis*, обладающих способностью образовывать токсины в виде кристаллов, поражающих различные виды вредителей. Однако поиск новых штаммов с более высоким выходом экзотоксина даст возможность повысить эффективность биопрепарата.

В связи с вышесказанным нами был проведен поиск новых штаммов *Bacillus thuringiensis* из зараженных личинок колорадского жука. Полученные чистые культуры B.t. были проверены на вирулентность, изучены свойства каждого штамма. Наиболее эффективные культуры были оставлены на депонирование. Было произведено твердофазное культивирование с различным составом питательных сред для выявления оптимальных соотношений компонентов среды, необходимых для получения повышенного содержания спор и экзотоксина исследуемых штаммов.

Проведено жидкостное культивирование с целью получения культуральной жидкости и сгущенных паст для создания на их основе энтомопатогенного биопрепарата.

Известно, что использование различных консервантов повышает стабильность препаратов, однако снижает инсектицидную активность. Эффективность композиций биопрепаратов исследована на личинках колорадского жука 1 и 2 возрастов. Анализ полученных данных позволит подобрать оптимальный состав добавок и наполнителей для эффективной и стабильной работы препарата на основе культуры инсектицидного штамма *Bacillus thuringiensis*.

Development of biopreparation based on *Bacillus thuringiensis* strain effective against Colorado potato beetle larvae

Schmidt K.N.

ООО "NVP" BashInkom " Ufa, Russia

Nowadays prevention of crop yield losses from various pests is a serious problem in the agricultural sector. To address this issue chemicals are widely used.

However, bacteria-based preparations are more perspective as it has been discovered that biological methods of controlling are much more ecologically safe and do not have any negative impact on human body.

Presently, in the market there is a large number of bacteria-based preparations, *Bacillus thuringiensis* in particular, which are able to create crystal forming toxins, defeating different types of pests. Though, a search for new strains with higher exotoxin release will give an opportunity to boost biopreparation effectiveness.

With reference to the above-mentioned facts, we have carried out a search for new *Bacillus thuringiensis* strains from infected Colorado potato beetle larvae. The received pure cultures of B.t. were tested for virulence with functions of every strain studied. The most effective cultures were left for deposition. We have conducted solid state fermentation with different growing medium solutions to define optimal proportion of medium components, necessary to receive higher level of spores and exotoxins of the strains under study.

In order to create entomopathogenic biopreparation liquid cultivation was carried out to receive culture liquid and condensed paste.

It is a well-known fact that the use of various preservatives increases preparation stability, though it decreases insecticidal activity. The effectiveness of biopreparation compositions was tested on Colorado potato beetle larvae at 1 and 2 stages. The analysis of data we have obtained will allow us to choose the optimal composition of additives and fillers for effective and stable work of preparation based on insecticidal strain of *Bacillus thuringiensis*.

Механизмы формирования и эффективного функционирования арбускулярной микоризы у гороха посевного

^{1,2}Штарк О.Ю., ^{1,2}Клюкова М.С., ^{1,2}Жернаков А.И., ¹Афонин А.М., ¹Федорина Я.В., ²Авдеева Г.С., ¹Кулаева О.А.,
¹Сулима А.С., ²Хайруллина М.М., ²Пузанский Р.К., ¹Ахтемова Г.А., ²Шишова М.Ф., ¹Жуков В.А., ^{1,2}Тихонович И.А.
¹ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

²Биологический факультет Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: oshtark@yandex.ru

В докладе обобщены успехи наших недавних исследований по изучению механизмов развития и функционирования арбускулярной микоризы (АМ) у гороха (*Pisum sativum* L.). Известно, что Бобовые используют общий симбиотический сигнальный путь при развитии АМ – симбиоза с грибами *Glomeromycota*, и азотфиксирующего клубенька – симбиоза с бактериями ризобиями. Нами показано, что большинство мутантов гороха с нарушениями развития клубенька имеет нарушения развития АМ. Выявлены последовательности генов гороха *PsNSP1* и *PsVapyrin*, необходимых для развития АМ и клубенька. Продемонстрировано, что транскриптомные профили корней линии гороха дикого типа Finale при развитии АМ и клубенька сильно различаются, при этом в процессе развития АМ наблюдается снижение экспрессии сотен генов. При инокуляции ризобиями, напротив, преобладают позитивно регулируемые гены. Мутации в гене *PsVapyrin* (*sym36*), необходимом для проникновения ризобий и АМ-грибов в клетки ризодермиса, а также для развития арбускул в клетках коры корня, приводили к повышению числа дифференциально экспрессирующихся генов при обоих симбиозах. Выявлены уникальные группы генов для каждого состояния растительно-микробных систем, а также представительная группа генов, экспрессия которых в корнях снижается при любых симбиотических взаимодействиях. Показано, что мутации в генах транскрипционных факторов *PsNSP1* (*sym34*) и *PsNSP2* (*sym7*), участвующих в регуляции биосинтеза «факторов ветвления гиф», стриголактонов, приводят у гороха к измененному мутантному фенотипу в отношении развития внешнего мицелия. Проведен анализ влияния инокуляции АМ-грибом на различные физиологические и биохимические параметры линии Finale в зависимости от стадии онтогенеза растения и условий фосфорного (Р) питания. Добавление Р приводило к снижению уровня микоризации, при этом эффективность симбиоза с АМ-грибом повышалась. Сравнительный анализ эффектов от инокуляции АМ-грибом у линии Finale и мутанта *sym19*, не поддерживающего развитие внутрикорневого мицелия, показал, что внешняя колонизация грибом также может положительно влиять на развитие и урожай растений, предположительно, за счет изменения их гормонального баланса. Ускорение развития мутантных растений при инокуляции грибом соответствовало динамике метаболомного профиля корней. Вместе с тем, высокий уровень внутрикорневой колонизации – фактор, негативно влияющий на рост и развитие растений линии Finale. Исследование поддержано грантами РФФ (17-76-30016), РФФИ (16-04-01859) и СПбГУ (1.37.534.2016).

Mechanisms of formation and effective functioning of arbuscular mycorrhiza in pea

^{1,2}Shtark O.Y., ^{1,2}Kliukova M.S., ^{1,2}Zhernakov A.I., ¹Afonin A.M., ¹Fedorina J.V., ²Avdeeva G.S., ¹Kulaeva O.A., ¹Sulima A.S.,
²Khairullina M.M., ²Puzansky R.K., ¹Akhtemova G.A., ²Shishova M.F., ¹Zhukov V.A., ^{1,2}Tikhonovich I.A.

¹All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Pushkin, Russia

²Department of Biology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

The report summarizes successes of our recent studies on mechanisms of development and functioning of arbuscular mycorrhiza (AM) in pea (*Pisum sativum* L.). It is known that Legumes use a common symbiotic signaling pathway during the development of AM symbiosis with fungi of phylum *Glomeromycota*, and nitrogen fixing nodule with rhizobia bacteria. We showed that the majority of pea mutants impaired in the nodule development are also impaired in AM formation. Sequences of *PsNSP1* and *PsVapyrin* pea genes, which are necessary for the development of AM and nodule, have been identified. It was demonstrated that root transcriptome profiles of a wild type pea line Finale differed greatly, during the development of AM and nodule. At that, expression of hundreds of genes decreased during the AM development. Inoculation with rhizobia, on the contrary, was dominated by positively regulated genes. Mutations in the *PsVapyrin* gene (*sym36*), which is necessary for the penetration of rhizobia and AM fungi into the rhizodermis cells, as well as for the development of arbuscules in the root cortex cells, leads to an increase in the number of differentially expressed genes in both symbiosis. Unique groups of genes for each state of plant-microbial systems have been identified, as well as a representative group of genes, the expression of which in the roots decreases in any symbiotic interaction. It was shown that mutations in the genes encoding for transcription factors *PsNSP1* (*sym34*) and *PsNSP2* (*sym7*) involved in the regulation of biosynthesis of "branching factor" for hyphae, the strigolactones, lead to an altered mutant phenotype in pea with respect to an external mycelium development. The influence of AM-fungus inoculation on different physiological and biochemical parameters of the Finale line was analyzed depending on the stage of the plant ontogeny and conditions of phosphorus (P) nutrition. Addition of P led to a decrease in the level of mycorrhiza, while the effectiveness of symbiosis with AM-fungus was increased. A comparative analysis of the effects of inoculation with the AM fungus on the Finale line and a *sym19* mutant, which does not support the development of the intraradical mycelium, has shown that external colonization by the fungus can also positively influence the development and yield of plants, presumably due to a change in their hormonal balance. Acceleration of the mutant plants development during inoculation with the fungus corresponded to dynamics of a metabolic profile of the roots. At the same time, a high level of intraradical colonization is a factor that negatively affects the growth and development of plants of the Finale line. The study was supported by grants of RSF (17-76-30016), RFBR (16-04-01859) and SPbSU (1.37.534.2016).

Опыт применения современных подходов к геносистематике прокариот в таксономических исследованиях ризосферной микрофлоры

Щеголев С.Ю., Бурьгин Г.Л.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

E-mail: shegolev_s@ibppm.ru

Обзор публикаций последних лет по сравнительной геномике и биоинформатике, а также наш опыт таксономических исследований представителей ризосферной микрофлоры, демонстрируют неоднозначность видовой идентификации изолятов с применением традиционных филогенетических маркеров – последовательностей ДНК генов 16S рРНК и интергенного спейсера ITS1, обусловленную как консервативностью генов 16S рРНК, так и внутригеномной гетерогенностью рибосомного оперона *rrn*, связанной с гомологичной рекомбинацией ДНК и горизонтальным переносом генов. Подобная неоднозначность имеет место также при использовании последовательностей ДНК не только тех или иных отдельных генов, но и наборов таких генов. Их подавляющее большинство отличается независимой эволюцией и собственной эволюционной историей, что убедительно продемонстрировано в работах школы Е.В. Кунина. Смягчение данной проблемы связывают с развитием геномной таксономии микробов на основе результатов полногеномного секвенирования ДНК штаммов. Однако наша практика применения рекомендуемых тестов (MLSA, ANI, AAI, GGDC, сигнатур Карлина) на всем доступном комплекте полногеномных данных для бактерий родов *Azospirillum* и *Ochrobactrum* показала зависимость оценок систематического положения штаммов от типа используемых полногеномных данных, относящихся к базовой или подвижной составляющим пангенома. К этому добавляется ограниченность набора расшифрованных референтных геномов для достаточно широкого списка представителей различных таксономических групп, из-за чего видовой идентификация изолятов оказывается, как минимум, неполной. Так что единой генетической системы видовой идентификации изолятов (как и самой классификации прокариот) пока, по-видимому, не существует, и наиболее корректным на сегодняшний день в систематике прокариот остается полифазный подход с сочетанием традиционных молекулярно-генетических тестов с хемотаксономическими, физиологическими и культуральными свойствами исследуемых штаммов. Следует при этом заметить, что указанные тесты оперируют, как правило, филогенетическими маркерами из базовой составляющей пангенома, отражающими лишь часть эволюционной истории организмов, ограниченную во времени в той или иной степени (порой весьма значительно) без учета горизонтального переноса генов. Тем не менее, последний может играть определяющую роль в приобретении прокариотами разнообразных признаков, обеспечивающих их существование в конкретных экологических нишах и оказывающих решающее влияние на их видовую идентификацию.

Application experience of modern approaches to genetic systematics of prokaryotes in taxonomic studies of rhizosphere microflora

Shchyogolev S.Yu., Burygin G.L.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, Russia

A survey of publications over the recent years on comparative genomics and bioinformatics, together with our experience in taxonomic studies of representatives of rhizosphere microflora, reveal an ambiguity in identifying species of isolates while using traditional phylogenetic markers, DNA sequences of 16S rRNA genes and the intergenic spacer ITS1. This is caused both by the conservative nature of the 16S rRNA genes and by the intragenomic heterogeneity of the ribosomal operon *rrn* which is related to homologous DNA recombination and horizontal gene transfer. This ambiguity is also observed while using DNA sequences of not only certain genes but gene sets as well. Their absolute majority have an independent evolution and their own evolutionary history, which has been clearly demonstrated in reports of the scientific school of Eugene V. Koonin. Alleviation of this problem can be associated with the development of genomic taxonomy of microbes based on the results of whole genome DNA sequencing of strains. However, our practice of applying the recommended tests (MLSA, ANI, AAI, GGDC, Karlin's signatures) over all available sets of whole genome data for bacteria of the genera *Azospirillum* and *Ochrobactrum* has shown that evaluations of the taxonomic position of strains depend on the type of applied whole genome data related to the core or variable pangenome components. This goes along with a limited set of deciphered reference genomes for a relatively large list of representatives of different taxonomic groups, making species identification of isolates at minimum incomplete. Thus, it seems that so far there is no unified genetic system for species identification of isolates (as well as for prokaryote classification), and currently, in prokaryote systematics, the polyphasic approach combining traditional molecular genetic tests with chemotaxonomic, physiological and cultural properties of strains under study remains most correct. Note that the above-mentioned tests, as a rule, involve phylogenetic markers from the core pangenome part. They reflect only part of the evolutionary history of the organisms limited by time to a certain degree (sometimes significantly), without taking into account horizontal gene transfer. The latter, however, can play a decisive role in acquiring various traits by prokaryotes, providing for their existence in specific ecological niches and having a decisive influence on their species identification.

Трансгенное сорго с улучшенной перевариваемостью запасных белков: анализ наследования и экспрессии генетической конструкции для сайленсинга гамма-кафирина

Эльконин Л.А., Итальянская Ю.В., Панин В.М., Сарсенова С.Х.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока», Саратов, Россия

E-mail: elkonin@gmail.com

Генетическая инженерия является одним из наиболее перспективных методов селекции растений, особенно эффективным в плане создания новых линий и гибридов с модифицированным составом запасных белков семян. Это направление имеет особую актуальность для сорго – высокоурожайной засухоустойчивой злаковой культуры, отличающейся более низкой, по сравнению с другими злаками, питательной ценностью зерна, в основе которой лежит устойчивость его запасных белков (кафиринов) к протеолитическому расщеплению. Нами ранее посредством агробактериальной трансформации были получены трансгенные растения, несущие генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена гамма-кафирина – проламина, располагающегося по периферии белковых телец клеток эндосперма и препятствующего перевариванию основных запасных белков сорго – альфа-кафиринов. Было обнаружено, что полученные трансгенные растения отличаются значительно улучшенной перевариваемостью запасных белков в системе *in vitro*, а также модифицированной структурой эндосперма: полной или частичной редукцией стекловидного слоя. Целью дальнейших исследований являлось изучение стабильности наследования и экспрессии данных признаков у потомства (поколения Т3–Т4), а также экспрессии маркерного гена *bar*, присутствовавшего в составе вектора, использованного для получения трансгенных растений. Выявлено, что у растений из трех изученных семей поколения Т4 перевариваемость белков эндосперма достигает 85-90% (против 52-53% у исходной нетрансгенной линии Желтозерное 10 (Ж10)). Установлено, что данный признак проявляется у растений, выращиваемых как в тепличных условиях, так и в естественных условиях внешней среды. Выявлены растения, у которых высокая перевариваемость кафиринов сочетается с формированием модифицированного эндосперма, в котором стекловидный слой представлен в виде тонкого «серпика». В одной из изученных семей высокая перевариваемость сочеталась с уменьшенной массой зерновок. Зарегистрированы факты элиминации конструкции для РНК-сайленсинга при сохранении в генотипе трансгенных растений маркерного гена *bar*. Примечательно, в большинстве изученных семей у трансгенных растений, начиная с поколения Т2, отсутствовала устойчивость к глюфосинату аммония, свидетельствующая об отсутствии экспрессии маркерного гена *bar*, стабильно наследовавшегося вплоть до поколения Т4. Полученные результаты свидетельствуют о возможности получения агрономически-ценных линий сорго с высокой перевариваемостью кафиринов.

Transgenic sorghum with improved digestibility of endosperm proteins: inheritance and expression of the genetic construct for gamma-kafirin silencing

Elkonin L.A., Italyanskaya Yu.V., Panin V.M., Sarsenova S.Kh.

Agricultural Research Institute for South-East Region, Saratov, Russia

Genetic engineering is one of the most promising methods of plant breeding, especially effective in creating new lines and hybrids with a modified composition of seed storage proteins. This direction is of particular relevance for sorghum - a high-yielding drought-resistant cereal crop, which is characterized by a lower nutritional value of the grain, in comparison with other cereals, based on the stability of its grain storage proteins (kafirins) to proteolytic digestion. Earlier, by using agrobacterial transformation, we obtained transgenic plants bearing a genetic construct for RNAi-silencing of the gamma-kafirin-prolamin gene - prolamin protein located on the periphery of the protein bodies of endosperm cells and preventing digestion of the main storage sorghum proteins - alpha-kafirins. It was found that these transgenic plants were characterized by significantly improved *in vitro* digestibility of endosperm storage proteins, as well as by the modified endosperm structure: complete or partial reduction of the vitreous layer. The purpose of further studies was to study the stability of inheritance and expression of these traits in the offspring (T3-T4 generation), as well as the expression of the marker gene *bar*, which was present in the vector used to produce transgenic plants. It has been revealed that in plants from three families of the T4 generation the digestibility of endosperm proteins reaches 85-90% (against 52-53% in the original non-transgenic line Zheltozernoe 10, Z10). It is established that this trait is manifested in plants grown both in greenhouse conditions and in the natural environment. The plants have been revealed in which the high digestibility of kafirins is combined with the formation of a modified endosperm, in which the vitreous layer is represented as a thin "moon". The facts of elimination of the RNAi-silencing construct combining with the stable inheritance of the marker gene *bar* have been registered. It is noteworthy that in majority of studied families, since T2 generation, the transgenic plants were sensitive to glufosinate ammonium indicating the absence of expression of the marker gene *bar*, stably inherited up to the T4 generation. These data testify to the possibility of obtaining agronomically valuable sorghum lines with high digestibility of kafirins.

Влияние гриба *Rhizophagus irregularis* на гормональный статус и фотосинтез люцерны хмелевидной при развитии арбускулярной микоризы

^{1,2,3}Юрков А.П., ¹Крюков А.А., ¹Горбунова А.О., ¹Якоби Л.М., ¹Авдеева Г.С., ²Романюк Д.Д., ²Кирпичникова А.А., ²Пузанский Р.К., ²Шишова М.Ф.

¹ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

²ФГБОУ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ФГБОУ Российский государственный гидрометеорологический университет, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: yurkovandrey@yandex.ru

Арбускулярная микориза (АМ) – симбиоз, формируемый большинством (>200000 видов) наземных растений с грибами подотдела Glomeromycotina (240-348 видов), выделяемого в пределах отдела Mucoromycota. Основное действие гриба на растение связывают с повышением адаптации растения-хозяина к уровню фосфора в почве за счет усиления фосфатного питания. Несмотря на успехи в изучении этапов формирования АМ, механизмы развития эффективного АМ-симбиоза до сих пор не раскрыты. В связи с этим целью настоящего исследования было изучить влияние инокуляции АМ-грибом *Rhizophagus irregularis* штаммом RCAM00320 из коллекции ФГБНУ ВНИИСХМ на развитие сильно отзывчивой линии MIS-1 люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina*). Проведен микровегетационный эксперимент (световой поток ~1500-1700 лм, день/ночь – 16/8ч, температура ~24-26°С, влажность воздуха ~60-65%, полив растений до 0,6 полной влагоемкости, сосуды с почвенно-песчаной смесью 2:1 с низким уровнем доступного фосфора) с последующим иммуноферментным анализом фитогормонов в корнях и листьях, оценкой индексов микоризации по результатам микроскопии корней и оценкой содержания растворимых белков и пигментов методом экстракции из листовых пластинок и спектрометрии. Развитие АМ наблюдается, начиная с фазы развития округлого листа. Формируется АМ арум-типа с характерными арбускулами и везикулами. Результаты показали, что наиболее ранний отклик на микоризацию, выраженный в превышении значений показателя в варианте с инокуляцией АМ-грибом против контроля без АМ, наблюдался по содержанию хлорофилла, а в пересчете на белок в фазу развития 2-го настоящего листа (нл), а отклик по содержанию хлорофилла b наблюдался в фазу развития 3-го нл. Выявлено, что уровень абсцизовой кислоты (АБК) в корнях и листовых пластинках был существенно ($p < 0.05$) выше у растений без АМ в сравнении с инокулированными АМ-грибом в фазу 1-го и 2-го нл, соответственно. В фазу стеблевания растений содержание АБК в листьях и корнях АМ-растений достигло разницы в 1,4 и 2,1 раза в сравнении с растениями без АМ, соответственно. С фазы стеблевания до фазы цветения наблюдался существенный рост уровня АБК в листовых пластинках и корнях АМ-растений при менее существенном снижении – у растений без АМ. Обсуждается взаимосвязь параметров продуктивности, содержания гормонов, показателей фотосинтеза и микоризации. Работа выполнена при частичной поддержке грантами СПбГУ №1.37.534.2016, РФФИ-офи м №15-29-02753, РФФИ-а №18-016-00220.

Effect of the fungus *Rhizophagus irregularis* on the hormonal status and photosynthesis in *Medicago lupulina* during arbuscular mycorrhiza development

^{1,2,3}Yurkov A.P., ¹Kryukov A.A., ¹Gorbunova A.O., ¹Jacobi L.M., ¹Avdeeva G.S., ²Romanyuk D.D., ²Kirpichnikova A.A., ²Puzansky R.K., ²Shishova M.F.

¹All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia;

²St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia;

³Russian State Hydrometeorological University, St. Petersburg, Russia

Arbuscular mycorrhiza (AM) is a symbiosis formed by the majority (>200000 species) of terrestrial plants with fungi of the Glomeromycotina subdivision (240-348 species), included in the division Mucoromycota. The main fungus effect on plants is the increase in adaptation of host plant to the level of phosphorus in soil due to phosphate nutrition enhancement. Despite the progress in studying AM development stages, the mechanisms for effective AM development have not still been disclosed. In this regard, the purpose of this research was to estimate the effect of inoculation by AM-fungus *Rhizophagus irregularis* (strain RCAM00320 from ARRIAM collection) on the development of *Medicago lupulina* (highly responsive black medick MIS-1 line). Microvegetation experiment was conducted (luminous flux at ~1500-1700 lm, a 16h/8h day/night cycle, temperature of ~24-26°C, ambient air humidity ~60-65%, plant watering up to 0.6 of saturated water content, vessels with air-dry soil-sand mixture in 2:1 with low available phosphorus level) followed by enzyme immunoassay method for phytohormones in roots and leaves, evaluation of mycorrhization indexes based on root microscopy and evaluation of soluble proteins and pigments by extraction from leaf plates and by spectrometry. As observed, AM development started from the phase of rounded leaf. Arum-type of AM was formed with arbuscules and vesicles. The results showed earliest response to mycorrhization (which characterized as excess in parameters for AM-plants against nonmycorrhizal plants in control) was observed in chlorophyll “a” content related to protein at stage of 2nd true leaf development, but the response in chlorophyll “b” content was observed at stage of 3rd true leaf development. It was founded the level of abscisic acid (ABA) in roots and leaf plates was significantly ($p < 0.05$) higher in plants without AM compared to AM inoculated plants at stage of 1st and 2nd true leaf development, respectively. During plant shooting stage, the ABA content in the leaves and roots of AM plants reached a difference of 1.4 and 2.1 times in comparison with ABA content in control plants, respectively. From the shooting stage to the flowering, significant increase in ABA level in leaf plates and in roots of AM plants occurred against detected less significant decrease in ABA level in control plants. The relationships between productivity, water content, hormones content, photosynthesis and mycorrhization parameters is discussed. Research was supported in part the Saint-Petersburg State University, Project No. 1.37.534.2016; by the Russian Foundation for Basic Research, Projects No. 15-29-02753 and 18-016-00220.

Результаты селекционной работы с чистыми культурами ризобий Российского Дальнего Востока

Якименко М.В., Бегун С.А.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сои, г. Благовещенск, Амурская область

E-mail: mariy-y@yandex.ru

В результате длительного поиска и отбора из самых северных в мире природных популяций ризобий нодулирующих сою Восточно-Азиатского региона, во Всероссийском научно-исследовательском институте сои была создана уникальная коллекция чистых культур этих микроорганизмов. Первый коллекционный штамм ризобий сои (639a) был выделен в чистую культуру из почв Серышевского района Амурской области в 1974 году научным сотрудником института С.А. Бегуном и отнесён к виду *Bradyrhizobium japonicum*. В 1978 году из почв Бурейского района Амурской области был выделен в чистую культуру первый коллекционный штамм ризобий сои (Буд-2), отнесённый к быстрорастущему виду *Sinorhizobium fredii*. Массовое их выделение в чистую культуру началось с 1989 года, после появления публикаций в иностранных источниках и наработки методических подходов к осуществлению их идентификации. В настоящее время коллекция ризобий сои вида *Bradyrhizobium japonicum* включает 104 штамма различного происхождения. На 6 штаммов ризобий этого вида (639a, 648a, AC-17, BM-85, MM-117, SM-42) получены авторские свидетельства и патенты на изобретения. Коллекция ризобий сои вида *Sinorhizobium fredii* включает 70 штаммов различного происхождения. На 7 штаммов ризобий этого вида (БД-32, ББ-49, ББ-55, КБ-11, ТБ-467, ТБ-508, ТБ-643) получены патенты на изобретения. Коллекционные штаммы ризобий, отнесённые к видам *Bradyrhizobium japonicum* и *Sinorhizobium fredii* обладают следующими свойствами: медленно- и быстрорастущие; щелоче- и кислотообразующие; солеустойчивые и солечувствительные; термоустойчивые (+37...+42°C); растущие при оптимальной температуре выращивания (+26...+28°C) и термочувствительные; растущие при pH 6 – 8; вирулентные и теряющие вирулентность в процессе пересевов; газообразующие; растущие на средах с повышенным содержанием солей молибдена, стимуляторами и протравителями семян; обладающие различной окраской и консистенцией, каталазной активностью. В 2012 – 2015 годах, впервые, из природных популяций Российского Дальнего Востока (Амурская область, Магаданская область) были выделены в чистую культуру штаммы ризобий, способные нодулировать не только сою, но и вигну двух видов (*V. radiata* и *V. unguiculata*), фасоль золотистую. Эти штаммы были отнесены нами к виду *Bradyrhizobium elkanii*. В настоящий период коллекция ризобий нового вида *B. elkanii*, образующих клубеньки на сое, фасоле золотистой, вигне, включает 81 штамм.

The results of selection work with pure cultures of rhizobia of the Russian Far East

Yakimenko M.V., Begun S.A.

FSBSI All-Russian Scientific Research Institute of Soybean, Blagoveshchensk, Russia

As a result of the prolonged search and selection from the most northern in the world natural populations of rhizobia, nodulating soybean of the East-Asian region, a unique collection of pure cultures of these microorganisms was created at the All-Russian Scientific Research Institute of Soybean. The first collection strain of soybean rhizobia (639a) was isolated into pure culture from the soils of the Seryshevskiy district of the Amur region in 1974 by a researcher of the Institute S.A. Begun and was assigned to the species *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982). In 1978, the first collection strain of soybean rhizobia (BuD-2) was isolated into pure culture from the soils of the Bureyskiy district of the Amur region and was assigned to the fast-growing species *Sinorhizobium fredii*. Their mass selection into pure culture began in 1989, after the appearance of publications in foreign sources and the development of methodological approaches to their identification. At present, a collection of soybean rhizobia of the species *Bradyrhizobium japonicum* includes 104 strains of different origin. Copyright certificates and patents for inventions for 6 strains of rhizobia of this species (639a, 648a, AS-17, BM-85, MM-117, SM-42) were obtained. The collection of soybean rhizobia of the species *Sinorhizobium fredii* includes 70 strains of different origin. Patents for inventions for 7 strains of rhizobia of this species (BD-32, BB-49, BB-55, KB-11, TB-467, TB-508, TB-643) were obtained. The collection strains of rhizobia, assigned to the species *Bradyrhizobium japonicum* and *Sinorhizobium fredii*, has the following properties: slow- and fast-growing; alkaline- and acid-forming; salt-tolerant and salt-sensitive; thermostable (+37 ... +42); growing at the optimum growth temperature (+26 ... +28) and heat-sensitive; growing at pH of 6 - 8; virulent and losing virulence in the process of re-seeding; gas-forming; growing on media with an increased content of molybdenum salts, stimulants and seed disinfectants; having different color and consistency, catalase activity. In 2012-2015, for the first time, strains of rhizobia were isolated into pure culture from the natural populations of the Russian Far East (Amur region, Magadan region). The given strains of rhizobia are capable of nodulating not only soybean, but also two types of vigna (*V. radiata* and *V. unguiculata*), phaseolus aureus. We assigned these strains to the species *Bradyrhizobium elkanii*. At the present time, the collection of rhizobia of the new species *B. elkanii*, forming nodules on soybean, phaseolus aureus, vigna, includes 81 strains.

Создание культур генетически трансформированных (бородатых) корней подсолнечника при помощи штаммов А4 и 15834 *Agrobacterium rhizogenes*

¹Якупова А.Б., ¹Мусин Х.Г., ¹Баймухаметова Э.А., ^{1,2}Кулуев Б.Р.

¹Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

E-mail: alfiram@yandex.ru

Корни подсолнечника *Heliantus annuus* L. применяются при лечении моче- и желчнокаменной болезней. Заготовка корней подсолнечника для медицинских целей сопряжена с рядом проблем, из которых наиболее актуальны невозможность круглогодичного выращивания в условиях России, отсутствие приспособлений и машин для сбора корней и загрязнение корней пестицидами. В связи с этим представляет большой интерес получение культур изолированных генетически трансформированных (бородатых) корней подсолнечника, способных расти на безгормональных питательных средах. Целью нашей работы было создание бородатых корней подсолнечника при помощи штаммов А4 и 15834 *Agrobacterium rhizogenes* и оценка параметров их роста при выращивании на твердых средах. В результате исследования была выявлена большая эффективность штамма А4 *A. rhizogenes* чем штамма 15834 при агробактериальной трансформации семядольных эксплантов подсолнечника.

Generation of sunflower hairy root cultures with strains A4 and 15834 of *Agrobacterium rhizogenes*

¹Yakupova A.B., ¹Musin H.G., ¹Baimuhametova E.A., ^{1,2}Kuluev B.R.

¹Bashkir State University, Ufa, Russia

²Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, Ufa, Russia

Roots of sunflower *Heliantus annuus* L. are used in the treatment of urolithiasis and cholelithiasis. Harvesting of sunflower roots for medical purposes is associated with a number of problems, the most urgent of which is the impossibility of year-round cultivation in Russia, the lack of adaptations and machines for harvesting roots and the contamination of roots with pesticides. In this connection, it is of great interest to obtain cultures of isolated sunflower hairy roots that can grow on hormone-free nutrient media. The aim of our work was to generate hairy roots of sunflower with the strains A4 and 15834 of *Agrobacterium rhizogenes* and to evaluate the parameters of their growth when grown on solid and liquid nutrient media. As a result of the study, a greater efficacy of the A4 *A. rhizogenes* strain was revealed than strain 15834 in the agrobacterial transformation of sunflower cotyledon explants.

Формирование физиолого-биохимических реакций стрессоустойчивости в процессе клонального микроразмножения растений под действием биологических средств защиты *in vivo*

¹Янчевская Т.Г., ¹Гриц А.Н., ²Яруллина Л.Г.

¹Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси, Минск, Беларусь

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

E-mail: t_yanch@mail.ru

В настоящее время успешно применяется метод усиления защитных реакций растений при действии биологически активных препаратов – иммуностимуляторов. Биологическая активность таких препаратов связана с наличием специфических элиситорных сигнальных молекул, которые обеспечивают индукцию в растении сигнала о внедрении патогена. Механизмы индуцирования иммунных реакций растений, согласно современным представлениям, включают повышение экспрессии генов, запускающих каскад последовательных биохимических реакций, приводящих к синтезу защитных соединений, активизации гормональных и ферментных систем, осуществляющих перестройку клеточного метаболизма. Проведена оценка адаптационного потенциала регенерантов растений при клональном микроразмножении сортов картофеля и их устойчивости к абиотическому (недостаток вла-ги, химический, солевой) и биотическому (заражение X- и Y-вирусами картофеля) стрессу по активности Red/Ox ферментов и иммуноферментному анализу при выращивании в искусственном оптимизированном по химическому составу и агрофизическим свойствам ионообменном субстрате «Триона-М» для многократного использования в условиях *in vivo*. На фоне биотического и абиотического стрессов изучено действие биопрепарата на основе микробиологической культуры (*Bacillus subtilis*) на динамику изменения изоферментного спектра маркерных пероксидазы, супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы и уменьшение зараженности X- и Y-вирусами листьев растений картофеля. Важным аспектом следует считать возможность индуцирования антивирусной устойчивости растений посредством обработок бактериальными препаратами *in vivo*. Установлено, что антивирусная защита растений при действии препарата не зависит от характера стресса и является более эффективной по сравнению с биопестицидами, приводит к повышению продуктивности (увеличивает массу мини-клубней и содержание в них сухого вещества). Обработка бактериальным препаратом не влияла на молекулярную гетерогенность пероксидазы и супероксиддисмутазы, но изменяла относительную активность их изо-форм, повышала активность супероксиддисмутазы при применении как на интактных, так и на предварительно инфицированных X-, Y-вирусами картофеля. Полученные результаты свидетельствуют о том, что предобработка растений картофеля препаратом препятствует заражению их X-, Y-вирусами, индуцируя антивирусную устойчивость картофеля, сопровождающуюся изменением активности окислительно-восстановительных ферментов.

Formation of the physiological and biochemical reactions of stress resistance in the process of clonal plant micro propagation under the action of biological means of protection *in vivo*

¹Yanchevskaya T. G., ¹Grits A.N., ²Yarullina L.G.

¹Institute of Experimental Botany of the Belarus National Academy of Sciences, Minsk, Belarus

²Institute of Biochemistry and genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

The method of strengthening defence reactions of plants under the action of biologically active products-immunostimulators in this time successfully applied. The biological activity of these drugs is associated with the presence of elisitor-specific signaling molecules, which provide induction in plant signal about the introduction of a pathogen. The mechanisms of induction of immune responses of plants, according to modern views, include increased gene expression, triggering a cascade of consecutive biochemical reactions leading to the synthesis of protective compounds, activation hormonal and enzymatic systems, adjusting of cellular metabolism. An evaluation of the adaptive capacity of regenerants of plants at clonal micropropagation of potato cultivars and their resistance to abiotic (lack of moisture, chemical, salt) and biotic (infection of the X-and Y-potato viruses) stress on Red/Ox activity of enzymes and immunoenzymatic analysis of cultivation in artificial optimized agrochemical composition and agrophysics properties of ion-exchange substrate "Triona-M" for repeated use *in vivo*. Against the backdrop of biotic and abiotic stress is studied on the basis of the biological action of microbiological culture (*Bacillus subtilis*) on changes in izoenzymatic range marker peroxidase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and reducing the incidence of X-and Y-viruses leaves of potato plants. An important aspect to be considered the possibility of induction of antiviral resistance through treatments of bacterial drugs *in vivo*. Determined that antivirus protection of plants under the action of the drug does not depend on the nature of stress and is more effective than biopesticides, leads to increased productivity (increases the mass of mini-tubers and contents in them dry substances). Processing of bacterial drug do not affect molecular heterogeneity of peroxidase and superoxide dismutase, but changed the relative activity of their isoforms, enhances the activity of superoxide dismutase in applying both the intact and previously infected X-, Y-potato viruses. The results suggest that pretreatment of potato plants with the *B. subtilis* drug prevents virus infection, inducing the antiviral resistance of the potato, accompanied by a change in the activity of redox enzymes.

Authors index

- Abdurashytov S., 4, 5
 Abdurashytova E., 4, 5
 Abubakirova R.I., 261
 Afonin A.M., 40, 94, 111, 149, 193, 232, 264
 Ageeva M.V., 30, 61, 62
 Akhiyarova G.R., 6, 7
 Akhtemova G.A., 111, 264
 Aktuganov G.E., 48
 Akosah Y.A., 8
 Alekseenko O.P., 137
 Alekseeva V.V., 218
 Alen'kina S.A., 87
 Aleschenkova Z.M., 67, 162, 230
 Alisoy F.A., 190
 Allagulova Ch.R., 88, 257
 Allaguvatova R. Z., 89, 127
 Alrashidi A. A., 90
 Andronov E. E., 91, 121, 163, 173, 246
 Anisimova L.G., 29
 Antonova E.V., 201
 Antonets K.S., 9, 59, 128, 147
 Ananyeva I.N., 67
 Anarjan M.B., 73
 Arkhipova T.N., 10, 45, 48
 Artyukhin A.E., 11, 152
 Asadova S.Sh., 92
 Asaturova A. M., 93, 169, 244, 247
 Astafjeva O.V., 164
 Astapchuk I. L., 93
 Avalbaev A.M., 88
 Avdeeva E.S., 109, 253
 Avdeeva G.S., 264, 267
 Azarakhsh M., 184
 Azarova T.S., 12, 65
 Babaev M.S., 29
 Babak O.G., 258
 Babakov A.V., 186
 Babynin E.V., 194
 Baimuhametova E.A., 269
 Bakaeva M.D., 41
 Bakulina A.V., 206
 Balandina S.A., 214
 Baranova E.N., 107, 242
 Baranova G.B., 107
 Baranskaya M.I., 16
 Baymiev Al.Kh., 38, 50, 95, 112, 226
 Baymiev An.K., 96, 114, 130
 Baubekova D.G., 97
 Begun S.A., 268
 Belimov A.A., 12, 65, 100, 118, 121, 163, 173, 246, 255
 Belousov M.V., 59
 Belousova M.E., 59
 Belova M.M., 99
 Belovezets L.A., 192
 Benkovskaya G.V., 13
 Beregovaya Yu.V., 100
 Berestetskiy A. O., 102, 223
 Berestovoy M.A., 103
 Berezhneva Z.A., 46, 101
 Bezmeltseva O.M., 206
 Bezler N.V., 98
 Bezrukova M.V., 88, 257
 Bilalova E.G., 104
 Blagova D.K., 15, 50, 105
 Bobodzhanova Kh.I., 106
 Bobusheva S.T., 24, 25
 Bogatyrev V.A., 253
 Bogoutdinova L.R., 107, 242
 Bondarenkova A.D., 214
 Borisov A., 111
 Borisova G.G., 14
 Borodina I.A., 129
 Bortsova O.A., 108
 Bovin A.V., 138
 Boyarkina S.V., 256
 Boyko E.V., 213
 Boyko M.S., 150
 Boykova I.V., 209
 Budanova A.A., 110
 Bugaeva E.N., 36, 57
 Bulynina S.S., 199
 Burkhanova G.F., 15, 19, 113, 219
 Burov A.M., 84
 Buryanov Ya.I., 218
 Burygin G.L., 27, 30, 43, 78, 109, 110, 160, 265
 Bybin V.A., 192
 Chaban I.A., 242
 Chaikovskaya L.A., 16, 17
 Chaikovsky V. A., 248
 Chebotar V.K., 18
 Chemeris A.V., 46, 56, 174, 175, 204, 250, 251
 Cherednichenko M.Yu., 63, 99, 141
 Cherepanova E.A., 15, 19, 187
 Cherkasova M.E., 200, 202, 252
 Cherepuhina I.V., 98
 Chetverikov S.P., 48, 216
 Chirak E. R., 173
 Chumakov D.S., 253
 Chumakov M.I., 117, 134, 254
 Churikova O.A., 42
 Daminova A.G., 30, 31, 61, 62, 123
 Darkazanli M., 20
 Dashkova I.O., 135
 Davidovich N.A., 21
 Deineko E.V., 136
 Dega L.A., 26
 Demchenko K.N., 22, 245
 Denisova A.Yu., 27
 Didovich A.N., 137
 Didovich S.V., 137
 Dmitriev A.A., 23, 60
 Dobrynin P., 243
 Dodueva I.E., 53, 184
 Dolgikh A.V., 138
 Dolgikh E.A., 138
 Dolgikh V.V., 77
 Dolgov S.V., 242
 Domracheva L.I., 139, 140, 153, 168
 Drevova A.N., 141
 Doolotkeldieva T.D., 24, 25
 Dubrovskaya E.V., 214, 239
 Dubina E.V., 142
 Dyatlova Yu.A., 238
 Dykman L.A., 253
 Efremova O.S., 26
 Egorova A.M., 75

- Egorova M.A., 80, 81
 Egovtseva A.Yu., 144
 Elkonin L.A., 266
 Enikeev A.G., 256
 Erina N.V., 146
 Ermekkaliev T.S., 122, 123
 Ermolova V.P., 128, 147
 Ermoshin A.A., 101
 Evseeva N.V., 27, 78, 110, 160
 Evstigneeva S.S., 241
 Evsyukov S.V., 231
 Fadeev V.S., 156, 240
 Farkhutdinov R.G., 151
 Fateryga A.V., 174
 Fedonenko Yu.P., 70, 83, 143, 241
 Fedorina J.V., 264
 Filip'echeva Yu.A., 110
 Finnegan P.M., 34
 Fisenko P.V., 26
 Fokina A.I., 139
 Galishev B.A., 236
 Galimzianova N.F., 48
 Galin I.R., 28, 68
 Galushko A.S., 108
 Gambarova P.I., 92
 Gancheva M.S., 184
 Garaev I.A., 29
 Garagozov T.G., 190
 Garipova S.R., 29
 Gaysina L.A., 89, 127
 Gerasimova S.V., 39
 Gilmaeva A.V., 120
 Gilvanova E.A., 119
 Gladkov G.V., 121
 Gerus A.V., 235
 Glagoleva E.S., 236
 Glupov V.V., 237
 Gra O.A., 156
 Grinev V.S., 241
 Grishechkina S.D., 128, 147
 Gritchik M.V., 37, 85
 Grits A.N., 86, 270
 Gogolev Y.V., 30, 31, 61, 62, 122, 126
 Gogoleva N.E., 30, 31, 125, 122
 Goldenkova-Pavlova I.V., 103, 124, 156, 220, 240
 Golovanov Ya.M., 205
 Golovatskaya I.F., 213
 Golovina L.A., 125
 Golubev S.N., 214, 239
 Goncharova A.M., 197
 Gorbunova A.O., 267
 Gorgulko T.V., 137
 Gorshkov A.P., 126
 Gorshkov V.Y., 30, 31, 61, 62, 109, 123
 Gorschkova O.V., 89
 Gostev E.F., 127
 Gubaev R.F., 30, 31, 61, 123
 Gubaidullina G.M., 127
 Guliy O.I., 129
 Gumenko R.S., 96, 114, 130
 Gumerova G.R., 131, 174, 204
 Guro P.V., 116, 133
 Gusev Yu.S., 117, 134, 254
 Gutorova O.V., 117, 254
 Gvildis D.E., 256
 Hadieva G.F., 8
 Hassan G.O.O., 32
 Homyak A. I., 244
 Iasakov T.R., 33
 Ibragimov R.I., 86
 Ignatieva A.N., 188
 Ignatov A.N., 36, 57
 Ignatov V.V., 70, 241
 Ilchibaeva K.V., 127
 Ilina E.L., 22
 Ilnitskaya E.T., 51
 Ilyasova A.A., 34
 Ishmuratova M.M., 104, 125
 Ishmuratova M.Yu., 155
 Iskakova A.B., 76
 Islamov B.R., 30
 Ismailov T.T., 122
 Italyanskaya Yu.V., 266
 Ivanova E.A., 154
 Ivanova T.A., 112
 Ivanov R.S., 6
 Jacobi L.M., 35, 267
 Kabanova A.P., 36, 57
 Kabardaeva K.V., 156, 240
 Kabil F., 213
 Kagirowa A.S., 131
 Kalashnikova E. A., 90
 Kalko G.V., 157
 Kameneva I.A., 37, 55
 Kamnev A.A., 158, 238
 Karamova N.S., 32
 Karasev E.S., 159
 Karapetian J., 74
 Karavaeva O.A., 129
 Kargapolova K.Yu., 109, 160
 Kartyzhova L.E., 161, 162
 Kashapova G.M., 114
 Kazakova K.A., 186
 Kazartsev I.A., 180
 Kezimana P., 23, 60
 Khafizova G., 243
 Khairullin R.M., 29
 Khaitov A.E., 106
 Khairullin R.M., 29, 176, 224, 229
 Khairullina M.M., 264
 Khakimova L.R., 38, 50, 95, 112, 226
 Khaliluev M.R., 107, 242, 258
 Khalitova A.I., 212
 Khlebtsov N.G., 253
 Khlestkina E.K., 39
 Kichigina N.E., 12
 Kilchevsky A.V., 208
 Kimeklis A.K., 121, 163, 246
 Kirakosyan R. N., 90
 Kirienko A.N., 138
 Kirpichnikova A.A., 267
 Kiseleva I.S., 20, 79
 Kislinskaya E.G., 98
 Kitaeva A.B., 177, 245
 Klepikova A.V., 164
 Klimenko N. N., 16, 165
 Klimenko N.I., 166
 Klimenko O.E., 166
 Kliukova M.S., 40, 149, 264
 Kliver S.F., 9
 Knirel Yu.A., 57, 70
 Knyazev A.V., 46, 101, 174

- Kochkin D.V., 236
 Koftin O.V., 82
 Kojemyakov A.P., 35, 179
 Kolesnikova M.V., 98
 Kolomiets E.I., 86
 Komakhin R.A., 186
 Koncevova A.A., 54
 Koninskaya N.G., 189
 Konkova N.G., 174
 Konnova S.A., 70, 83, 241
 Kononenko N.V., 242
 Konorov E.A., 42, 81
 Konurbaeva M.U., 25
 Kopteva T.S., 146
 Korobova A.V., 7
 Korotkova A.M., 39
 Korshunova T.Yu., 41
 Korzhenkov A.A., 36, 57
 Kosareva I.A., 12
 Koshcheeva O.I., 14
 Kosolapova A.O., 59
 Kostylev P.I., 142
 Kotova T.M., 157
 Kovaleva I.A., 146
 Kovina A.L., 153, 168
 Kovtunov E.A., 122
 Kozhevnikova A.D., 167
 Kozitsyn A. E., 169
 Kozlova E.V., 54
 Krasnobaeva I.L., 209
 Krasnov G.S., 23, 60
 Krasov A.I., 110
 Krinitsina A.A., 42
 Krinitsina A.S., 81
 Krotikov A.A., 100
 Kruglov Yu.V., 182
 Kruglova N.N., 28, 68
 Kryuchkova Ye.V., 43
 Kryukov A.A., 267
 Kryukov V.Y., 237
 Kryukova A.V., 205
 Kryzhko A., 44
 Kudoyarova G., 6, 7, 10, 45
 Kudryavtseva A.V., 23
 Kukharchyk N.V., 106
 Kulaeva O.A., 149, 264
 Kulikov E.E., 57
 Kuluev A.R., 175
 Kuluev B.R. 11, 46, 56, 69, 71, 101, 131, 152, 174, 204, 269
 Kumar A., 79
 Kunsbaeva D.F., 89, 127
 Kupryashina M.A., 47, 84
 Kuramshina Z.M. , 176, 229
 Kurbatova A.I., 54
 Kurchak O.N., 121, 163, 246
 Kusakin P.G., 177, 245
 Kuzakova O.V., 175
 Kuzina E.V., 171
 Kuzmina M.V., 157
 Kuzmina L.Yu., 10, 48
 Kuznetsov V.I., 88, 172
 Kuznetsova I.G., 173, 246
 Kuznetsova E.N., 49
 Kuznetsova L., 44
 Kyzin A.A., 178
 Labunskaya E.A., 236
 Lambers H., 34
 Laktionov Y.V., 179
 Lastochkina O.V., 29
 Lavina A.M., 38, 50, 95, 112, 226
 Lebedeva M.A., 184
 Lednev G.R., 180
 Leonova I.N., 181
 Leontieva M.R., 80
 Leppyanen I.V., 138
 Levchenko M.V., 180
 Likhenko I.E., 181
 Lisina T.O., 182
 Loginov O.N., 41, 171
 Lomadze S.V., 127
 Lomovatskaya L.A., 170
 Loshchinina E.A., 84
 Loskutov S.I., 12, 65
 Lubyanova A.R., 88, 257
 Lukatkin A.A., 183
 Lukatkin A.S., 183
 Lutfullin M.T., 8
 Lutova L.A., 53, 184
 Lysenko E.A., 185
 Lyubun E.V., 43, 203
 Madzharova N.V., 186
 Makarkina M.V., 51
 Makarova L.E., 192, 197
 Makarova N.M., 12, 255
 Maksimov A.Yu., 212, 259
 Maksimov I.V., 15, 19, 105, 113, 187, 219
 Maksimova T.I., 105
 Maksimova Yu.G., 259
 Maksutova V.O., 52
 Malakhova K.V., 191
 Maleva M.G., 14, 79
 Malova A.V., 8,
 Malovichko Y.V., 53, 184
 Malyarovskaya V.I., 189
 Malysh Y.M., 188
 Mamchenkova P.V., 238
 Mamedova M.G., 190
 Maramokhin E.V., 191
 Mardanshin I.S., 13
 Mardanova A.M., 8
 Markova Yu. A., 192
 Maslennikova D.R., 88, 257
 Maslikova T.I., 94, 193
 Matniyazov R.T., 132, 175
 Matora L.Yu., 27, 110
 Matveeva T., 243
 Mazilov S.I., 117, 134
 Mazina S.E., 54
 Melentiev A.I., 48
 Melnichuk T.N., 37, 55, 144
 Melnikova N.V., 23, 60
 Mikhailovskaya N.A., 115
 Mikhaylova E.V., 11, 46, 56, 101, 152, 174, 204, 205
 Mikshina P.V., 30
 Mindubaev A.Z., 194
 Minligareyeva E.V., 195
 Minnebaev L.F., 196
 Miranda Chikurova N.C., 19
 Mironycheva A.A., 122 , 123
 Miroshnikov K.A., 36, 57
 Miroshnikov K.K., 57
 Mitina G.V., 77

- Mitrofanova I.V., 145
 Mohammed W.S., 199
 Moiseeva E.M., 254
 Moiseeva Ye.M., 117, 134
 Morits A.S., 197
 Morozov V.N., 198
 Mulina S.A., 18
 Muntyan A.N., 201
 Muntyan V.S., 200, 201, 202, 222, 252
 Muratova A.Yu., 203, 239
 Murodova S., 58
 Musin Kh.G., 204, 269
 Mustafaev O.N., 156, 220, 240
 Mustafina A.N., 205
 Myasina Y.B., 89
 Nasonov A.I., 207
 Naumovich N.I., 67
 Nazarova Y.I., 206, 261
 Nekrashevich N.A., 208
 Nikitina V.E., 47, 84, 87
 Nikolaichik E.A., 61
 Nikonorov Y.M., 13, 46
 Nizhnikov A.A., 9, 59, 128, 147
 Novakovskiy R.O., 23, 60
 Novikova I.I., 209
 Nujnaya T.V., 113
 Nukolova A.Yu., 210
 Omelichkina Y.V., 256
 Onishchuk O.P., 121, 163, 211
 Osipova E.V., 122, 123
 Ovsienko O.L., 16, 17
 Panin V.M., 266
 Panova G.G., 108
 Panikovskaya K.A., 14
 Parfirova O.I., 31, 61, 109
 Pavlenko O.S., 103, 156
 Pavlova O.A., 225
 Pavlova Yu.A., 212
 Pawlowski K., 22
 Perfileva A.I., 82
 Petrova O.E., 30, 31, 61, 62, 123
 Petyurenko M.Yu, 98
 Pilyuk Ya.E., 67
 Pishchik V.N., 118, 148
 Plyusnin I.N., 213
 Polev D., 243
 Polivanova O.B., 63
 Popov A.A., 148
 Popova I.A., 110
 Potapova O.A., 70
 Pozdnyakova N.N., 214, 239
 Prasad V., 64
 Pravdina O.Y., 184
 Probatova N.S., 69
 Provorov N.A., 121, 163, 215
 Puhalsky Ya.V., 12, 65, 118, 121, 173
 Pusenkova L.I., 29
 Puzansky R.K., 264, 267
 Pylaev T.E., 84, 253
 Radchenko A.F., 37
 Radchenko L.A., 37
 Rafikova G.F., 171, 216
 Rakhmangulov R.S., 189
 Rogozhin E.A., 77, 217
 Rogozhina E.V., 66
 Romanenko A.S., 170
 Romanova T.A., 128
 Romanovskaya T.V., 86
 Romanyuk D.D., 267
 Roumiantseva M.L., 200, 201, 202, 222, 252
 Rozhmina T.A., 23, 60
 Ruban M.G., 142
 Rukavtsova E.B., 218
 Rummyantsev S.D., 113, 219
 Sadovskaya N.S., 220
 Sadykova L.R., 38, 50, 95, 112, 221, 226
 Safronova V.I., 12, 121, 163, 173, 246
 Saksaganskaia A.S., 200, 222
 Salimova D. R., 223
 Salina E.A., 181
 Samarina L.S., 189
 Samorodova A.P., 184
 Sarsenova S.Kh., 266
 Sarvarova E.R., 105, 224
 Savushkin A.I., 210
 Sazanova A.L., 12, 163, 173, 246
 Schafikova T.N., 256
 Schmidt K.N., 263
 Seliverstova E.V., 246
 Semenov A.A., 256
 Semenova E.V., 12
 Senderskiy I.V., 77, 225
 Serbaeva E.R., 38, 50, 226
 Seregin I.V., 167
 Sergeev V.S., 227
 Sergeeva J.P., 62
 Sergushkina M.I., 206
 Shahdparvar S., 74
 Shakhnazarova V. Yu., 138, 255
 Shakirova F.M., 88, 257
 Shapkin V.M., 100
 Shaposhnikov A.I., 12, 65, 255
 Shaposhnikov A.I., 12, 65, 255
 Shashkov A.S., 70
 Shcherbakov A.V., 18
 Shcherbakova E.N., 18
 Shchyogolev S.Yu., 27, 110, 265
 Shematorova E.K., 258
 Shestopal O.L., 150
 Shilova A.V., 259
 Shilovckii V.N., 142
 Shipunova A.A., 260
 Shirokikh A.A., 261
 Shirokikh I.G., 140, 206, 261, 262
 Shirokov A.A., 110
 Shishova M.F., 264, 267
 Shneider M.M., 36, 57
 Shpak D.V., 150
 Shpakovski D.G., 258
 Shpakovski G.V., 258
 Shtark O.Y., 59, 149, 264
 Shumny V.K., 39
 Shvets D.Yu., 69
 Sidorov R.A., 103, 231
 Sigida E.N., 70, 109, 143, 241
 Simonova E. O., 228
 Skolotneva E.S., 181
 Skugoreva S.G., 139, 140
 Slovokhotov I.Yu., 258
 Smirnova E.A., 107, 242
 Smirnova I.I., 37
 Smirnova Yu. V., 229

- Solovyeva A.I., 231
 Solovyova E.A., 67, 230
 Sorokan A.V., 13
 Speranskaya A.S., 42
 Spivak S.G., 258
 Stasyuk A.I., 181
 Stavtseva I.V., 145
 Stepanova A.Yu., 231
 Stetsenko D.S., 164
 Strelnikova S.R., 186
 Strunnikova O.K., 255
 Stupko V.Yu., 76
 Subbotin A. M., 228
 Sukhanova N.V., 89
 Sukhareva A.S., 56
 Sulima A.S., 94, 149, 193, 232, 264
 Sumskaya M.A., 98
 Sungurtseva I.Yu., 203
 Surkina A.K., 83
 Sviridova O.V., 118, 148
 Taipova R.M., 71
 Talat F., 72, 73, 74
 Tarasova N.B., 30, 123
 Tarchevsky I.A., 75
 Tarlachkov S.V., 218
 Tchebotarev L. Y., 249
 Terenteva E.V., 78
 Terletskaia N.V., 76
 Tikhonovich I. A., 40, 94, 111, 138, 149, 173, 193, 232, 234, 264
 Timofeev S.A., 77
 Titova J.A., 209, 233
 Tkachenko A.A., 53, 184
 Tkachenko O.V., 27, 78, 160
 Tokarev Y.S., 188, 235
 Tolmachev S.Yu., 118
 Tomilova O.G., 237
 Tomilova S.V., 236
 Toschakov S.V., 36, 57
 Tovstik E.V., 140, 168
 Trefilova L.V., 153, 168
 Tretyakova M.S., 192
 Tripti, 79
 Tsarev A.A., 77
 Tsavkelova E.A., 80, 81
 Tsivileva O.M., 82
 Tsukanova K.A., 18
 Tsvetkov V.O., 52, 86
 Tsyganov V.E., 126, 177, 245, 246
 Tsyganova A.V., 126, 177, 245, 246
 Tsygichko A.A., 247
 Tugarova A.V., 158, 238
 Tuhtamanova A.S., 236
 Turkovskaya O.V., 43
 Turkovskaya O.V., 43, 214, 239
 Turskaya A.L., 192
 Tvorogova V.E., 184
 Tyrin A.A., 240
 Tyurin A.A., 103, 156, 220
 Valentovich L.N., 249
 Vasilieva E.N., 94, 111
 Velichko N.S., 83
 Verkhozina A.V., 173
 Vershinina Z.R., 38, 50, 95, 112, 221, 226
 Veselov D.S., 6, 68
 Veselov S.Yu., 6, 7, 10
 Veselova S.V., 105, 113, 219
 Vetchinkina E.P., 84
 Vidershpan A.N., 213
 Vildanova G.I., 127
 Vishnevskaya N.A., 255
 Vishnyakova M.A., 12
 Vladimirova A.A., 96, 114, 130
 Voitka D.V., 115
 Volkova G. V., 93
 Volobueva O.G., 119, 116
 Volodartzeva Y.V., 188
 Vologin S.G., 8
 Volokhina I.V., 117, 134, 254
 Voloshina A.D., 194
 Volynchikova E.A., 81
 Vorob'ev V.N., 30
 Vorobyov N.I., 118, 148
 Yagudina I.R., 32
 Yakhno V.V., 147
 Yakimenko M.V., 268
 Yakubovskaya A.I., 5, 37, 55, 85
 Yakupova A.B., 269
 Yanchevskaya T. G., 86, 270
 Yaroslavtseva O.N., 237
 Yarullina L.G., 86, 270
 Yatsevich K. K., 208
 Yegorova N.A., 145
 Yevstigneyeva S.S., 143
 Yuldashev R.A., 88
 Yurkov A.P., 267
 Yuzefovich E.K., 115
 Zaitsev B.D., 129
 Zambriborshch I.S., 150
 Zaplatkin A.N., 18
 Zaripova A.A., 151
 Zaytsev D.Yu., 28
 Zdorovenko E.L., 57, 83
 Zheleznyakov S.V., 35
 Zhemiyakin S.V., 148
 Zhernakov A.I., 149, 264
 Zhevnova N. A., 93
 Zhukov V.A., 40, 94, 111, 149, 193, 232, 264
 Zhukovskaya N.V., 167
 Ziganshin A.M., 199
 Ziganshina E.E., 199
 Zobova N.V., 76
 Zolotuhina A. S., 223
 Zontikov D.N., 191
 Zulkarnaeva E.Sh., 152
 Zyablitsin A.V., 23
 Zyabreva A.A., 36
 Zykova Yu.N., 153