



**АГРОТЕХНОЛОГИИ  
БУДУЩЕГО**



**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ  
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РАН**



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ»**

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РАН**

**ПРОГРАММА и СБОРНИК ТЕЗИСОВ  
V Всероссийской школы-конференции с международным участием  
для молодых ученых «Молекулярно-генетические и клеточные  
аспекты растительно-микробных взаимодействий»**



**Санкт-Петербург  
2021 год**

УДК 579.262  
ББК 28.4я43  
П78

**П78 ПРОГРАММА и СБОРНИК ТЕЗИСОВ V Всероссийской школы-конференции с международным участием для молодых ученых «Молекулярно-генетические и клеточные аспекты растительно-микробных взаимодействий».** – М.: Издательство «Перо», 2021. – 5,9 Мб. [Электронное издание]

ISBN 978-5-00189-643-2

V Всероссийская школа-конференция с международным участием для молодых ученых «Молекулярно-генетические и клеточные аспекты растительно-микробных взаимодействий» посвящена обсуждению актуальных проблем исследования молекулярных механизмов взаимодействий растений с различными микроорганизмами. В результате молодые ученые ознакомились с последними достижениями в изучении бобово-ризобияльного и актиноризного симбиоза, симбиоза лишайников, различных патогенных систем, ассоциативных взаимодействий растений с ризосферными бактериями. Проведение конференции способствовало укреплению научного сотрудничества и повышению интереса научной молодежи к исследованиям растительно-микробных взаимодействий. В данном сборнике опубликованы тезисы докладов и программа школы-конференции.

Мероприятие проводится при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2020-920 от 16.11.2020 о предоставлении гранта в виде субсидии из Федерального бюджета Российской Федерации. Грант предоставлен в рамках государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

УДК 579.262  
ББК 28.4я43

ISBN 978-5-00189-643-2

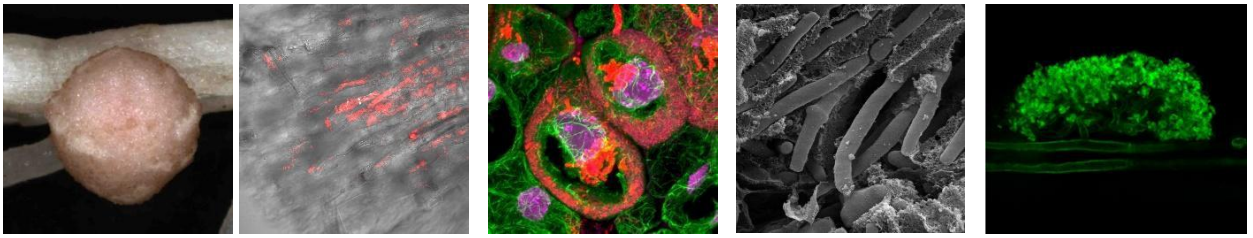
© Авторы, 2021

## ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ ШКОЛЫ-КОНФЕРЕНЦИИ

Тихонович И.А., председатель	д.б.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ВНИИСХМ, декан биологического факультета СПбГУ, Санкт-Петербург
Проворов Н.А.	д.б.н., директор ВНИИСХМ, Санкт-Петербург
Цыганов В.Е.	д.б.н., г.н.с., зав. лабораторией молекулярной и клеточной биологии ВНИИСХМ, ученый секретарь Объединенного совета по проблемам развития агропромышленного комплекса, СПбНЦ РАН, Санкт-Петербург

## ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ ШКОЛЫ-КОНФЕРЕНЦИИ

Цыганов В.Е., председатель	д.б.н., г.н.с., зав. лабораторией молекулярной и клеточной биологии ВНИИСХМ, ученый секретарь Объединенного совета по проблемам развития агропромышленного комплекса, СПбНЦ РАН, Санкт-Петербург
Антонец К.С.	к.б.н., в.н.с. лаборатории протеомики надорганизменных систем ВНИИСХМ, Санкт-Петербург
Горшков А.П.	м.н.с. лаборатории молекулярной и клеточной биологии ВНИИСХМ, Санкт-Петербург
Джапаридзе Л.А.	к.б.н., ученый секретарь Объединенного научного совета «Биология и медицина», СПбНЦ РАН, Санкт-Петербург
Иванова К.А.	м.н.с. лаборатории молекулярной и клеточной биологии ВНИИСХМ, Санкт-Петербург
Жуков В.А.	к.б.н., в.н.с., зав. лабораторией генетики растительно-микробных взаимодействий ВНИИСХМ, Санкт-Петербург
Жуланов Д.В.	главный экономист ВНИИСХМ, Санкт-Петербург
Китаева А.Б.	к.б.н., н.с. лаборатории молекулярной и клеточной биологии ВНИИСХМ, Санкт-Петербург
Колесник И.А.	ведущий референт ВНИИСХМ, Санкт-Петербург
Кусакин П.Г.	м.н.с. лаборатории молекулярной и клеточной биологии ВНИИСХМ, Санкт-Петербург
Нижников А.А.	д.б.н., в.н.с., зав. лабораторией протеомики надорганизменных систем ВНИИСХМ, Санкт-Петербург
Серова Т.А.	к.б.н., н.с. лаборатории молекулярной и клеточной биологии ВНИИСХМ, Санкт-Петербург
Цыганова А.В.	к.б.н., в.н.с. лаборатории молекулярной и клеточной биологии ВНИИСХМ, Санкт-Петербург



**ПРОГРАММА**  
**V ВСЕРОССИЙСКОЙ ШКОЛЫ-КОНФЕРЕНЦИИ С**  
**МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ ДЛЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ**  
**«МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И КЛЕТОЧНЫЕ АСПЕКТЫ**  
**РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ»**

**6 октября**

**Регистрация участников 9:00 – 10:00**

10:00 Открытие конференции – д.б.н. В.Е. Цыганов, Председатель Оргкомитета 5-й Школы конференции, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербургский научный центр РАН, Санкт-Петербург

10:05 – 10:10 Приветственное слово – д.б.н. М.И. Орлова, директор Санкт-Петербургского научного центра РАН, Санкт-Петербург

10:10 – 10:15 Вступительное слово – академик РАН И.А. Тихонович, ВГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург

**Заседание 1** Председатель – д.б.н. Е.А. Долгих, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург

10:15 – 10:55 Лекция 1 *Принцип дополнительности геномов и растительно-микробные взаимоотношения.* академик РАН И.А. Тихонович, ВГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург

10:55 – 11:35 Лекция 2 *Actinorhizal symbioses.* Prof. Katharina Pawlowski, Department of Ecology, Environment and Plant Sciences,

Stockholm University, Sweden

**11:35 – 12:05 Кофе-брейк**

12:05 – 12:45 Лекция 3 *Live cell and deep tissue imaging during plant-microbe interactions and plant development*. Dr. Ton Timmers, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Cologne, Germany

12:45 – 13:25 Лекция 4 *Инфицированная клетка корневого клубенька: проблемы ионного транспорта*. к.б.н. Е.Э. Федорова, ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

13:25 – 14:05 Лекция 5 *Роль меристемных генов в микробно-индуцированных новообразованиях*. проф., д.б.н. Л.А. Лутова, ВГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

**14:05 – 15:15 Обед**

**Заседание 2** Председатель – к.б.н. Е.Е. Андронов, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург

15:15 – 15:30 *Фосфонаты как участники растительно-микробного взаимодействия*. О.И. Парфирова, Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань

15:30 – 15:45 *Изменение паттернов метилирования ДНК в терминально дифференцированных клетках *Rhizobium leguminosarum**. А.М. Афонин, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург

15:45 – 16:00 *Сравнительный анализ общегеномного разнообразия микросимбионтов козлятника восточного и лекарственного в популяции на Северном Кавказе*. Е.С. Карасев, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург

16:00 – 16:15 *Количественный анализ организации цитоскелета в клетках симбиотического клубенька*. П.Г. Кусакин, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург

- 16:15 – 16:30 *Анализ локализации области терминации репликации у Sinorhizobium meliloti.* М.Е. Владимирова, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург
- 16:30 – 16:45 *Роль микробных сообществ в интродукции тимьяна обыкновенного (Thymus vulgaris L.).* Е.К. Жаркова, ВГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва
- 16:45 – 17:00 *Эффективность PGPR-бактерий при микроклональном размножении картофеля в моделируемых условиях осмотического стресса.* А.Ю.Денисова ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И.Вавилова, Саратов
- 17:00 – 17:15 *Клубеньковые бактерии дикорастущих бобовых растений, произрастающих в арктических регионах России.* к.б.н. Д.С. Карлов, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург

### 7 октября

**Заседание 3** Председатель – д.б.н. В.Е. Цыганов, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербургский научный центр РАН, Санкт-Петербург

9:45 – 10:25 Лекция 6 *Разработка платформы для маркер-ориентированной селекции ячменя на устойчивость к гемибактериальным патогенам.* академик РАН, проф. О.С. Афанасенко, ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

10:25 – 11:05 Лекция 7 *Симбиогенез и органеллогенез: модели эволюции клеточного генома.* д.б.н. Н.А. Проворов, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург

**11:05 – 11:35 Кофе-брейк**

11:35 – 12:15 Лекция 8 *Специализация фитопатогенных грибов: эволюция*

*геномов и защита растений.* к.б.н. Ф.Б. Ганнибал, ФГБНУ  
Всероссийский научно-исследовательский институт защиты  
растений, Санкт-Петербург

12:15 – 12:55 Лекция 9 *Антимикробные пептиды — молекулярный ответ растений на биотический стресс!* к.х.н. Е.А. Рогожин, ФГБУН  
Институт биоорганической химии им. академиков М.М.  
Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

12:55 – 13:35 Лекция 10 *Уроки симбиоза от лишайников.* проф., д.б.н. Ф.В.  
Минибаева, Казанский федеральный университет, Казанский  
институт биохимии и биофизики – обособленное научное  
подразделение ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань

**13:35 – 14:45 Обед**

**Заседание 4** Председатель – к.б.н. А.В. Цыганова, ФГБНУ "Всероссийский  
научно-исследовательский институт сельскохозяйственной  
микробиологии", Санкт-Петербург

14:45 – 15:00 *Штамм Bacillus subtilis IB-22 повышает уровень АБК у дефицитного по этому гормону мутанта ячменя.* З.А.  
Ахтямова, Уфимский Институт биологии – обособленное  
структурное подразделение ФГБНУ Уфимского федерального  
исследовательского центра РАН, Уфа

15:00 – 15:15 *Роль глутатиона, гомоглутатиона и их соотношения в защитных реакциях и развитии симбиотического клубенька гороха посевного (Pisum sativum).* К.А. Иванова, ФГБНУ  
"Всероссийский научно-исследовательский институт  
сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург

15:15 – 15:30 *Серая (красчатая) снежная плесень: разнообразие возбудителей и степень их вирулентности.* Е.А. Рязанов,  
ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный  
университет, Казань

15:30 – 15:45 *Роль арбускулярной микоризы в экспансии сорных Asteraceae*  
Д.М. Малыгин, ФГБНУ Всероссийский научно-  
исследовательский институт защиты растений, Санкт-  
Петербург

15:45 – 16:00 *RolB/C-подобный ген у голубики и брусники.* Р.Р. Жидкин,



ВГБОУ ВО Санкт - Петербургский государственный университет , Санкт-Петербург

16:00 – 16:15 *Изменение микрофлоры ризосферы озимой пшеницы при применении удобрений в условиях южной лесостепи Западной Сибири.* к.с.-х.н. Н.Н. Шулико, ФГБНУ "Омский аграрный научный центр", Омск

**16:15 – 16:30 Кофе-брейк**

**16:30 – 18:00 Постерная сессия**

1. *Экспрессия гена кукумопинсинтазы у культурного арахиса (*Arachis hypogaea* L.).* В.Д. Бемова, ВГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет , Санкт-Петербург
2. *Роль гетеротримерных G-белков в развитии симбиоза у гороха посевного и люцерны слабоусеченной.* А.Д.Бовин, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург
3. *Влияние почвы на метагеномы симбиотических клубеньков гороха.* Э.С. Грибченко, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург
4. *Структура микробного сообщества чернозема южного ризосферы пшеницы озимой в условиях применения ассоциативных штаммов.* А.Ю. Еговцева, ФГБУН "Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма", Симферополь
5. *Симбиотический мутант люцерны хмелевидный и его фенотипические особенности в связи с эффективностью микоризного симбиоза.* Т.В.Калинина, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург
6. *Характеристика штамма *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* NaPi, супрессирующего фенотипические проявления мутаций в гене гороха (*Pisum sativum* L.) *PsSym40*.* Е.А. Киричек, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург
7. *Сравнение эффективности выделения РНК из растительных тканей при подготовке к транскриптомному анализу с использованием реагентов Purezol, RNazol, Trizol.* Т.Р. Кудряшова, ФГАОУ ВО Санкт-



Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

8. *Протеомные маркеры штаммов *Bacillus thuringiensis* обнаруживают связь с функциональными и эволюционными характеристиками штаммов, но не с их серологической классификацией.* Ю.В. Маловичко, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург
9. *Изменение внутри- и внеклеточной концентрации ионов  $H^+$  в листьях ячменя, индуцированное салицилатом и грибным заражением.* Л.В. Пашкевич, Минск, Беларусь
10. *Гены *CLE*, регулирующие развитие симбиотических клубеньков у гороха посевного.* Д.С. Садикова, ВГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
11. *Особенности ионного баланса корневого клубенька *Medicago truncatula* в условиях длительного солевого стресса.* Н.А. Трифонова, М.И. Королева, ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва
12. *Оценка влияния развития арбускулярной микоризы на экспрессию генов аквапоринов у *Medicago lupulina*.* П.В.Филатов, ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург
13. *Генотипы гороха по-разному реагирующие на комбинированную инокуляцию ризобиями и арбускулярными микоризными грибами в контексте развития семян и связанных с этим метаболических сдвигов.* М.А. Червацкая, ВГБОУ ВО Санкт - Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
14. *Предсказание амилоидогенных свойств C-терминальных участков трёхдоменных токсинов *Cry*.* А.Е. Шиков, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург
15. *Изменение протеома бактерий *Rhizobium leguminosarum* под влиянием экзогенных конечных продуктов глубокого гликирования.* Ю.С. Шумилина, ВГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

## 8 октября

**Заседание 5** Председатель – д.б.н. А.А. Белимов, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург

10:00 – 10:40 Лекция 11 *Роль фитогормонов во взаимодействии растений и ризосферных бактерий в нормальных и стрессовых условиях.* проф., д.б.н. Г.Р. Кудоярова, ФГБУН Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа

10:40 – 11:20 Лекция 12 *Омиксные подходы в изучении растительно-микробных патосистем на примере исследования патокомплекса снежной плесени озимых злаков.* проф., д.б.н. Ю.В. Гоголев, Казанский федеральный университет, Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное научное подразделение ФИЦ Казанского научного центра РАН, Казань

### **11:20 – 11:50 Кофе-брейк**

11:50 – 12:30 Лекция 13 *T-ДНК природных ГМО в филогенетических исследованиях.* проф., д.б.н. Т.В. Матвеева, ВГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

12:30 – 13:10 Лекция 14 *Эволюция генетических программ развития бокового корня и симбиотического клубенька: сходства и различия.* к.б.н. К.Н. Демченко, ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

### **13:10 – 14:30 Обед**

**Заседание 6** Председатель – к.б.н. В.А. Жуков, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург

14:30 – 14:45 *Определение структуры и функции белка Svx - предполагаемого фактора вирулентности *Pectobacterium atrosepticum*.* Н.В. Тендюк, ФИЦ "Казанский научный центр Российской академии наук", Казань

14:45 – 15:00 *Влияние фунгицидов Винтаж МЭ и Титул Дуо на*

*ультраструктуру симбиотических клубеньков гороха (Pisum sativum L.).* А.П. Горшков, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург

15:00 – 15:15 *Изучение амилоидных свойств белков наружной мембраны Rhizobium leguminosarum.* А.О. Косолапова, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург

15:15 – 15:30 *Возбудители розовой снежной плесени: разнообразие и вирулентность.* А.Р. Мещеров, ФИЦ "Казанский научный центр Российской академии наук", Казань

15:30 – 15:45 *Молекулярно-генетическая идентификация растения семейства Яснотковые используемого для поддержания коллекции грибов арбускулярной микоризы.* А.Е. Калинина, ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

15:45 – 16:00 *Организация тубулинового цитоскелета в клетках клубеньков детерминированного типа.* к.б.н. А.Б. Китаева, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург

16:00 – 16:15 *Анализ старения симбиотических клубеньков гороха посевного (Pisum sativum L.), индуцированного высокой температурой.* к.б.н. Т.А. Серова, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург

16:15 – 16:30 *Комплексное взаимодействие растений горчицы белой, ризосферных бактерий Ochrobactrum cytisi IPA 7.2 и поллютантов.* А.В. Олексенко, ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов

16:30 - 16:45 *Протеогеномные основы полифункциональной активности Bacillus thuringiensis.* М.Е. Белоусова, ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Санкт-Петербург

**16:45            Закрытие конференции**

## ТЕЗИСЫ ЛЕКЦИЙ ПРИГЛАШЕННЫХ ДОКЛАДЧИКОВ

### Разработка платформы для маркер-ориентированной селекции ячменя на устойчивость к гемибитрофным патогенам

Афанасенко Ольга<sup>1</sup>, Новокази Флютур<sup>2</sup>, Лашина Нина<sup>1</sup>, Розанова Ирина<sup>3</sup>, Мироненко Нина<sup>1</sup>, Гофман Анастасия<sup>1</sup>, Баранова Ольга<sup>1</sup>, Зубкович Александр<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Julius Kuehn-Institute, Institute for Resistance Research and Stress Tolerance, Quedlinburg, Germany

<sup>3</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>4</sup>Научно-производственный центр по земледелию НАН Беларуси, Жодино

E-mail: [Olga.s.afan@gmail.com](mailto:Olga.s.afan@gmail.com)

Круг патогенов, к которым целесообразно проводить селекцию на устойчивость определяется вредоносностью, доминирующих в определенной агроклиматической зоне болезнями. Среди известных 75 болезней ячменя, повсеместно распространенными и вредоносными являются пятнистости листьев, вызываемые гемибитрофными патогенами аскомицетами *Pyrenophora teres f. teres*, *Cochliobolus sativus*. Потери урожая на восприимчивых сортах от пятнистостей листьев могут достигать 40%. Среди сортов ячменя, зарегистрированных в Государственном реестре селекционных достижений, устойчивые к этим болезням отсутствуют. Высокий уровень генетической защиты растений достигается возделыванием генетически разнообразных по устойчивости сортов. В геноме ячменя на всех хромосомах обнаружено 20 регионов (meta-QTL), в которых находятся локусы устойчивости к разным болезням, включающие 8 горячих точек (hot spots) устойчивости к группе патогенов (Schweizer, Stein, 2011). Большинство генов устойчивости ячменя к микромицетам кодируют белки с сайтом связывания нуклеотидов и регионом обогащенных лейцином повторов (CC-NBS-LRR или CNL). Из 175 выявленных CNL 23% сгруппированы в 15 кластеров и более половины из них расположены на хромосомах 1Н и 7Н (Andersen et al., 2016). Несмотря на имеющиеся результаты по идентификации «главных» генов и локусов количественной устойчивости (QTL) ячменя к *P. teres f. teres* до сих пор не разработаны удобные для использования в селекции молекулярные маркеры (ММ) выявленных локусов. В результате ассоциативного картирования в коллекции из 449 сортов и образцов ячменя (GWAS) нами выявлены 15 локусов устойчивости к *P. teres f. teres*, на всех хромосомах ячменя и ММ ассоциированные с признаком устойчивости к патогену [Novokazi et al., 2019a]. Для широко специализированного возбудителя темно-бурой пятнистости ячменя *C. sativus* в результате GWAS обнаружено 38 значимых ассоциаций маркер – признак устойчивости [Novokazi et al., 2019b]. Определены SNP-гаплотипы ячменя, для которых характерен высокий уровень проростковой и взрослой устойчивости к *P. teres f. teres* и *C. sativus*. В результате генотипирования с использованием технологии компетентной аллель-специфической ПЦР (KASP) на хромосоме 3Н в интервале 52.0 – 54.3 сМ определены 11 SNP, которые со 100% эффективностью ко-сегрегировали с устойчивостью к *P. teres f. teres* в дигиплоидной популяции (CLS x Harrington) и с эффективностью 81-84% в гибридных популяциях Fox x Gezine и Morex x Gezine. Эти маркеры могут быть использованы в селекции при создании сортов ячменя устойчивых к *P. teres f. teres*.

Исследования поддержаны грантом РФФИ № 20-516-00007.

## **Принцип дополнительности геномов и растительно-микробные взаимоотношения**

И.А. Тихонович

Санкт-Петербургский госуниверситет, биологический факультет, Санкт-Петербург,  
Университетская наб., 9/7, Россия

ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин, ш.

Подбельского, д. 3, Россия

*E-mail:* [ARRIAM2008@yandex.ru](mailto:ARRIAM2008@yandex.ru)

Возможность растений переживать неблагоприятные условия и адаптироваться к «вызовам» окружающей среды часто зависит не от самих растений-хозяев, а от их микросимбионтов, которые колонизируют растения, например, индуцируя образование специализированных органов – клубеньков – на корнях бобовых растений. Стратегия адаптационной способности растений заключается в том, чтобы не накапливать в своем геноме все возможные функции, а поддерживать сравнительно небольшой набор детерминант, которые определяют возможность вступать в симбиоз с широким спектром представителей почвенной микрофлоры, причем именно тогда, когда это необходимо растению. В таких микробно-растительных системах (МРС) происходит функциональное объединение генетических систем хозяина и симбионта в единый симбиогеном, таким образом реализуется принцип дополнительности геномов. Возможности такого симбиогенома привлекают все большее внимание, поскольку позволяют заменить частично или полностью применение экологически высокорисковых агрохимикатов на интегральные свойства про- и эукариот, объединенных в МРС.

В результате исследований членов консорциума НЦМУ «Агротехнологии будущего» показана возможность микробиома осуществлять следующие функции: оптимизация питания растений азотом и фосфором, защита от фитопатогенов, стрессорных факторов (засуха, например), стимуляция роста и развития, улучшения качества продукции, путем поселения высокоэффективных штаммов полезных микроорганизмов. Эти достижения, которые будут представлены в докладе, основываются на комплексном подходе, обеспеченном в структуре НЦМУ, объединяющем генетиков, микробиологов, биохимиков, молекулярных биологов, растениеводов, агрохимиков, почвоведов, экологов и других специалистов, а также готовящем кадры, что позволяет решать задачи, недоступные традиционным формам организации научных исследований.

Исследования выполнены при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашений № 075-15- 2020-920 и № 075-15- 2020-922 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении грантов в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

## Специализация фитопатогенных грибов: эволюция геномов и защита растений

Ганнибал Ф.Б.

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: [fgannibal@vizr.spb.ru](mailto:fgannibal@vizr.spb.ru)*

В сельском хозяйстве идет постоянное соперничество между человеком и культурными растениями с одной стороны и микроскопическими фитопатогенными грибами – с другой. Новым способам и средствам защиты растений от болезней и новым иммунным реакциям растений грибы противопоставляют высокую скорость адаптации. Важным компонентом этой гонки является большое генетическое разнообразие фитопатогенных грибов и структурно-функциональные особенности их генома, обеспечивающие возможность переключения между сапротрофным и паразитическим образами жизни и возможность перехода с одних растений-хозяев на другие.

Такие механизмы, как половая и парасексуальная рекомбинация, которые способствуют комбинативной изменчивости, изучаются уже достаточно давно. Достижения последних лет в области геномики позволили продвинуться в исследовании хромосомных aberrаций грибов и в анализе их влияния на патогенность. Установлено, что перестройки генома посредством транслокаций сформировали в геноме некоторых грибов – патогенов растений особые участки хромосом богатые генами, необходимыми для инфекционного процесса. При этом пока что получено совсем немного данных о влиянии копийности генов на признаки, связанные с патогенностью.

У ряда грибов описаны уникальные генетические элементы – хромосомы патогенности – минихромосомы (В-хромосомы, добавочные хромосомы), содержащие гены, связанные с патогенностью, например, ответственные за синтез хозяин-специфичных фитотоксинов. Известно, что штаммы в условиях чистой культуры после ряда пассажей могут утрачивать хромосомы патогенности, оставаясь при этом жизнеспособными и не меняясь морфологически. Очевидно, эти хромосомы относительно легко могут переноситься горизонтально между близкими видами и превращать непатогенный штамм в узко специализированного патогена.

Несмотря на обнаружение множества важных, порой завораживающих, фактов, к настоящему моменту ещё не сформировалось достаточно ясное понимание того, насколько перечисленные выше особенности фитопатогенных грибов влияют на скорость их эволюции.

**Омиксные подходы в изучении растительно-микробных патосистем на примере исследования патокомплекса снежной плесени озимых злаков.**

Гоголев Ю.В.<sup>1,2</sup>, Горшков В.Ю.<sup>1</sup>, Терц И.Д.<sup>1</sup>, Хамо Х.<sup>2</sup>, Коннова Т.А.<sup>1</sup>,  
Гоголева Н.Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук»

<sup>2</sup> Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета

*Email:* [gogolev.yuri@gmail.com](mailto:gogolev.yuri@gmail.com)

Снежная плесень – тяжелое заболевание растений, вызываемое психрофильными или психротолерантными грибами, из которых виды *Microdochium* являются наиболее вредоносными. Наше исследование направлено на выявление комплексных характеристик сообщества видов *Microdochium*, колонизирующих озимую рожь (*Secale cereale*) и вызывающих снежную плесень в регионах Среднего Поволжья. Были охарактеризованы грибковые и бактериальные сообщества растений озимой ржи, пораженных розовой снежной плесенью. Двадцать один штамм *M. nivale* был выделен, классифицирован на основе области внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2) и охарактеризован по морфологии, синтезу внеклеточных ферментов и вирулентности. Для видов *Microdochium* впервые выявлено несколько типов внеклеточной ферментативной активности. Для девяти штаммов, контрастных по вирулентности была определена структура генома и получены транскриптомые данные, что позволило использовать инструменты сравнительной и функциональной геномики для выявления факторов вирулентности и построения первичных карт ассоциированных генетических маркеров. Наше исследование показывает, что генетически и фенотипически различные штаммы *M. nivale* одновременно колонизируют растения озимой ржи на общей территории, используя различные паттерны факторов вирулентности, в том числе, внеклеточных ферментов. Характер течения заболевания во многом определяется структурой патокомплекса, обладающего совокупностью факторов вирулентности.

Перспективные исследования связаны с селекцией устойчивых растений и разработкой мер борьбы с заболеванием. Материал для исследования факторов резистентности был получен в результате транскриптомного анализа инфицированных растений разных сортов. Также были охарактеризованы бактериальные сообщества ризосферы, филлосферы и эндофитов при разном течении заболевания, что будет использовано для поиска микроорганизмов, обладающих биопротекторными свойствами.

Исследования поддержаны грантом Министерства образования и науки РФ (грант № 075-15-2019-1881). Эксперименты по секвенированию РНК проведены при поддержке РФФИ (проект №17-14-01363).



## Эволюция генетических программ развития бокового корня и симбиотического клубенька: сходства и различия

Демченко К.Н.

Ботанический институт им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: [demchenko@binran.ru](mailto:demchenko@binran.ru)

Боковые корни возникают у большинства растений выше зоны растяжения, однако существует группа семейств, виды которых формируют примордии бокового корня непосредственно в меристеме родительского. Ключевым фактором при обоих типах инициации бокового корня является ауксин. В свою очередь, симбиотические клубеньки иницируются сходно с боковыми корнями выше зоны растяжения, но в ответ на восприятие ризобияльных бактерий на поверхности корня. Изучение развития актиноризных клубеньков (Shen et al., 2020), а также ризобияльных клубеньков с недетерминированным ростом у некоторых мутантов гороха (*cochleata* и др.) показывает возможное сходство некоторых генетических программ инициации этих органов и бокового корня (Couzigou et al., 2012). Ризобияльные Nod-факторы рецептируются клетками ризодермы, что, в свою очередь, активизирует трансдукцию, опосредованного цитокинином, сигнала в коре корня и перицикле. Было показано, что, несмотря на различия в инициации боковых корней и клубеньков, они имеют перекрывающиеся программы развития. Так у мутантов по гену *LOB-DOMAIN PROTEIN 16 (LBD16)* обнаруживаются эквивалентные дефекты в инициации клубеньков и боковых корней (Schiessl et al., 2019). Для понимания взаимосвязи корневой и клубеньковой программ развития мы проведем сравнительный анализ этих двух генетических программ. Будут показаны сходства и различия в гистогенезе бокового корня и симбиотических клубеньков различного типа. Филогенетический анализ, а также анализ уровней экспрессии генов семейства LBD в ответ на экзогенный ауксин, позволил выявить ортологи LBD генов *Arabidopsis* у других видов. Кроме того, нами был проанализирован паттерн экспрессии генов LBD при различных типах инициации бокового корня у растений, различающихся местом его инициации, а также при инициации симбиотических клубеньков. Выявлены различия в распределении гистологической активности промоторов генов *LBD16* и *LBD18*, обсуждаются возможные мишени продуктов этих генов. Наши исследования позволили предложить эволюционную схему участия белков семейства LBD в регуляции инициации и развития боковых органов корня – симбиотических клубеньков и боковых корней. Мы проанализируем известные *pro et contra* в теории происхождения симбиотического клубенька как латерального органа корня.

Исследования поддержаны грантами РФФИ № 20-16-00115 и РФФИ 19-04-01079\_a (локализация *LBD*).

1. Couzigou, J.-M., Zhukov, V., Mondy, S., Abu el Heba, G., Cosson, V., Ellis, T. H. N., et al. (2012). *NODULE ROOT* and *COCHLEATA* maintain nodule development and are legume orthologs of *Arabidopsis* *BLADE-ON-PETIOLE* genes. *Plant Cell* 24(11), 4498-4510.
2. Schiessl, K., Lilley, J. L. S., Lee, T., Tamvakis, I., Kohlen, W., Bailey, P. C., et al. (2019). *NODULE INCEPTION* recruits the lateral root developmental program for symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Curr. Biol.* 29(21), 3657-3668.e3655.
3. Shen, D., Xiao, T. T., Velzen, R. v., Kulikova, O., Gong, X., Geurts, R., et al. (2020). A homeotic mutation changes legume nodule ontogeny into Actinorhizal-type ontogeny. *Plant Cell*, tpc.00739.02019.

## **Роль фитогормонов во взаимодействии растений и ризосферных бактерий в нормальных и стрессовых условиях**

Кудоярова Г.Р.

Уфимский институт биологии, УФИЦ РАН, Уфа, Россия

*E-mail: guzel@anrb.ru*

Гормоны играют важную роль во взаимодействии растений и ризосферных бактерий. Об этом, в частности, свидетельствует способность микроорганизмов влиять на экспрессию регулируемых гормонами генов. Изменения гормонального статуса растений могут быть результатом синтеза или разрушения гормонов бактериями, или изменений в метаболизме гормонов в самих растениях. Фитогормоны регулируют жизненно важные процессы в растениях, такие как минеральное питание, водные отношения, устойчивость к патогенам и функционирование антиоксидантных систем. Стимуляция роста корней под влиянием гормонов может улучшить минеральное питание и водный обмен. Активация под влиянием гормонов антиоксидантных систем растений помогает защитить растения от окислительного стресса, который сопровождается неблагоприятных воздействий. Бактерии могут оптимизировать минеральное питание растений путем фиксации атмосферного азота или солюбилизации фосфатов, тем самым косвенно влияя на концентрацию фитогормонов в растениях, поскольку их гормональный статус зависит от доступности элементов минерального питания. Таким образом, способность ризосферных бактерий влиять на гормональный статус растений, вероятно, участвует в большинстве известных механизмов их действия на рост растений. Однако воздействие бактерий на гормональные системы растений может быть как полезным, так и вредным для растений в зависимости от условий окружающей среды, поскольку предполагается, что ингибирование (а не стимуляция) роста растений защищает их от действия стрессовых факторов. Результат воздействия микробов на гормональную систему растений меняется в зависимости от того, выращиваются ли растения в оптимальных или стрессовых условиях. Эта информация может помочь выбрать оптимальные свойства ризосферных бактерий для повышения с их помощью устойчивости и урожайности растений.

## **Роль меристемных генов в микробно-индуцированных новообразованиях**

Лутова Л.А., Додуева И.Е.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail:* [la.lutova@gmail.com](mailto:la.lutova@gmail.com)

Развитие многоклеточных организмов, в частности, высших растений, зависит от системного контроля дифференцировки и пролиферации клеток, локальное нарушение которого может привести к неконтролируемому делению клеток и развитию новообразования. Обычно новообразования растений возникают под действием разнообразных фитопатогенов (от бактерий и вирусов до паразитических нематод и членистоногих). Изучение новообразований у растений помогает выявить системные механизмы, контролирующие пролиферацию и дифференцировку растительных клеток. Так, изучение опухолей растений привело к открытию таких важных явлений, как агробактериальная трансформация (Chilton et al. 1977) и горизонтальный перенос генов от бактерий к растениям (Fürner et al., 1986). Растения содержат функциональные ортологи многих онкогенов и опухолевых супрессоров животных, однако мутации в них не являются онкогенными. Причиной этого может быть тот факт, что у высших растений пролиферация клеток и органогенез происходят в основном в меристемах - структурах, содержащих пулы стволовых клеток, таких, как апикальные меристемы побега и корня. Помимо регуляторов клеточного цикла, активность меристем контролируется определенными семействами транскрипционных факторов (ТФ): в частности, гомеодомными ТФ семейств WOX и KNOX. К числу функций этих ТФ относится регуляция уровня фитогормонов, главным образом, ИУК и цитокининов, а также ответа на них. Экспрессию генов WOX, в свою очередь, регулирует система CLAVATA, которая включает в себя пептидные гормоны CLE и их рецепторы. Колонизацию растений микроорганизмами регулирует сложная система, которая была сформирована путем длительной коэволюции и включает в себя молекулярный диалог (обмен сигнальными молекулами) между партнерами: так, белки-эффекторы микроорганизма, секретирясь в ткани растения, помогают преодолеть иммунитет и изменять физиологию растения- хозяина. Ряд фитопатогенов, индуцирующих новообразования, могут вызывать гормональный дисбаланс в растении за счет своей способности синтезировать фитогормоны или за счет эффекторов, которые могут влиять на их транспорт и сигналинг. Одним из ярких примеров фитогормональной мимикрии является способность определенных патогенов и симбионтов растений продуцировать пептидные фитогормоны разных классов, в частности CLE. Таким образом, активация меристемных программ при растительно-микробных взаимодействиях может происходить под влиянием как растительных, так и микробных индукторов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2020-922 от 16.11.2020 о предоставлении гранта в виде субсидии из Федерального бюджета Российской Федерации. Грант предоставлен в рамках государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

## **Т-ДНК природных ГМО в филогенетических исследованиях**

Матвеева Т.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9,

Санкт-Петербург, 199034, Россия

*E-mail: radishlet@gmail.com*

Агробактерии – это сборная группа почвенных бактерий, которая характеризуется способностью индуцировать развитие корончатых галлов или волосистых (косматых) корней в результате переноса и экспрессии в растениях генов ее Т-ДНК. Такие новообразования можно рассматривать как трансгенные ткани на нетрансгенном растении. Вместе с тем, было показано, что в природе встречаются растения, в геномах которых имеются гомологи генов Т-ДНК, передающиеся из поколения в поколение миллионы лет. Такие растения называются природно-трансгенными или природными ГМО. Они являются результатом горизонтального переноса генов от агробактерий к растениям в ходе их эволюции. Т-ДНК в их геномах получила название клеточной (клТ-ДНК). На сегодняшний день описано несколько десятков видов таких растений и этот список постоянно пополняется. В ходе доклада будет рассмотрена возможность использования клТ-ДНК в филогенетических исследованиях на примере некоторых природных ГМО.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2020-922 от 16.11.2020 о предоставлении гранта в виде субсидии из Федерального бюджета Российской Федерации. Грант предоставлен в рамках государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

## **Lessons of symbiosis from lichens**

Minibayeva F.V.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC KazSC RAS, Kazan, Russia

*E-mail:* [minibayeva@kibb.knc.ru](mailto:minibayeva@kibb.knc.ru)

Symbiosis is the long-term interaction between the symbiotic partners that leads to the development of cooperative molecular mechanisms and often gives them new functions in symbiotic entities. That is why symbiosis is an important mechanism that promotes the diversity of ecosystems. Mutualistic relationships between fungi and algae and/or cyanobacteria result in the unique features that make lichens adaptive to a hostile environment. Lichens do not possess conventional structural or functional mechanisms to maintain water content, therefore desiccation occurs rapidly, shutting down metabolism. Yet, in contrast to many other life forms, lichens cope well with changes in water availability and have an outstanding ability to revitalize from the dry state. The morphological, physiological, and ecological uniqueness of lichens has been described for more than a century. However, there are significant gaps in our understanding about how the lichen symbiosis operates at the molecular level. At present it is clear that the lichen thallus is a complex microcosm, which merges several fungal species, algae, cyanobacteria, and a microbiome. Chlorolichens convert carbohydrate to polyols and transport them to respective mycobionts, whereas cyanolichens translocate carbohydrate in the form of glucose to their mycobionts. Mycobiont metabolism is fuelled by such carbohydrate translocation. In addition to carbohydrates, photobionts also supply thallus by oxygen in return for carbon dioxide from their mycobionts. The production of lichen substances by mycobionts and the production of phytohormones and/or carbohydrates by photobionts may play key roles in the recognition of symbionts. The composition and diversity of lichen microbiota are influenced by the nature of lichen secondary metabolites driven mainly by the primary mycobiont and the type of primary lichen photobiont. Our understanding of the signalling networks and pathways responsible for symbiotic establishment and maintenance of lichens is still very limited. Such knowledge could provide insights into how lichen symbionts benefit from the symbiosis with regards to nutrient supply, which conditions allow lichens to produce secondary metabolites, and how symbiosis helps lichens to tolerate stresses such as drought, light stress, and toxic metals.

## **Симбиогенез и органеллогенез: моделирование эволюции клеточного генома**

Проворов Н.А.

ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, С.-Петербург

*E-mail: [provorovnik@yandex.ru](mailto:provorovnik@yandex.ru)*

Модели симбиогенетики открывают широкие возможности для решения ряда общебиологических проблем, включая реконструкцию ранних этапов эволюции генома. Используемые для этого подходы основаны на том, что в ходе редуционной эволюции, приводящей к трансформации бактерий в органеллы, наиболее высокую стабильность проявляют древние генные системы, тогда как недавно возникшие системы подвергаются быстрой утрате. На первых этапах этой эволюции происходила утрата “операционных”, и лишь затем “информационных” генов, показывая, что репликация и экспрессия генома являются более древними его функциями, чем контроль клеточного метаболизма. Среди “информационных” генов наименее стабильными оказались гены ДНК-зависимых матричных процессов (репликации, транскрипции, репарации, рекомбинации), которые утрачиваются раньше, чем гены РНК-зависимого процесса трансляции. Поэтому логично предположить, что древнейшие клеточные организмы имели РНК-геномы, на основе которых возникли современные ДНК-геномы. Продуктами поздних стадий органеллогенеза являются безгеномные органеллы, сохранившие базовые жизненные функции – обмен веществ и размножение. Это позволяет предположить, что анцестральные протоклетки были лишены собственных геномов. Их приобретение моделируют опыты по интродукции молекул РНК или ДНК в абиогенно полученные коацерватные капли: у возникших биосистем скорость репродукции выше, чем у исходных компонентов.

На основании представленных данных мы предполагаем, что эволюция клеточных организмов включала ряд интегративных процессов: а) интродукцию молекул РНК в состав коацервата с образованием протоклеток, содержащих РНК-геномы; б) образование эукариотических клеток путем объединения прокариот с ДНК-геномами, возникшими на основе РНК-геномов; в) переход эукариот к многоклеточности и формирование холобионтов, которые осуществляют хостинг микробных сообществ, выполняющих важные для хозяев трофические, защитные и регуляторные функции. Таким образом, сопоставление постоянных и временных органелл позволяет представить эволюцию эукариот как процесс поэтапного усложнения клеточных и надклеточных структур, которое определяется объединением неродственных организмов и приводит к расширению их адаптивного потенциала.

Исследования выполнены при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15- 2020-920 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

## Антимикробные пептиды — молекулярный ответ растений на биотический стресс!

Рогожин Е.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург-Пушкин, Россия

*E-mail:* [rea21@list.ru](mailto:rea21@list.ru); [erogozhin@vizr.spb.ru](mailto:erogozhin@vizr.spb.ru)

Антимикробные пептиды (АМП) представляют собой ключевые факторы врожденного иммунитета растений к стрессовым факторам различной природы. Их структурно-функциональное разнообразие в достаточной степени велико, что в значительной степени расширяет их биологическую активность и определяет участие в процессах, ассоциированных не только непосредственно с защитной функцией, но и в физиологии и биохимии растений. Что касается их участия непосредственно в иммунитете растений к биотическим стрессам (в первую очередь, поражение фитопатогенными микроорганизмами), то в настоящий момент достоверно показано, что представители только трех структурных семейств антимикробных пептидов (дефензины, тионины и липид-переносящие белки) задействованы в индуцированном ответе растений на инфекцию. Однако мировые научные исследования последних 10-15 лет в предметной области позволяют рассматривать АМП в широком смысле как основополагающие компоненты не только конститутивного, но и индуцированного иммунитета, что требует уточнения их позиционирования среди имеющегося многообразия молекул, участвующих в ответе растения на биотический стресс.



## Проблемы ионного транспорта инфекционной клетки корневого клубенька *Medicago truncatula*

Федорова Е.Э.

Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва, Россия

E-mail: elenafedorova06@mail.ru

Корневые клубеньки отличаются высокой чувствительностью к солевому стрессу, но системные причины низкой толерантности к засолению пока не выяснены. Мы предположили, что возможности инфицированной клетки по поддержанию ионного баланса ухудшаются по мере роста колонии симбиосом в симпласте.

Мы исследовали распределение ионов  $K^+$  и  $Na^+$  методом рентгеновского микроанализа и низкотемпературной сканирующей электронной микроскопии (РМСЭ) в инфицированных и неинфицированных клетках по зонам развития корневых клубеньках в условиях солевого стресса. С целью выяснения роли ионных транспортеров был также проведен анализ *in silico* 30 ионных переносчиков растения-хозяина и микросимбионта по зонам клубенька. Уровень экспрессии генов переносчиков  $K^+$  из группы транспортеров КТ-НАК-КУР, ионных каналов *MtAKT* и *MtSKOR/GORK* и генов из группы  $Na^+/K^+$ обменников *MtNHX1*, *MtNHX6*, *MtNHX7*, *MtNHX7-like*, *MtNHX8* и *MtCHX18* был измерен методом ПЦР в реальном времени. Локализация белков транспортеров *MtAKT1*, *MtSKOR* и *MtNHX6*, *MtNHX7* в клубеньках проводилась методами конфокальной микроскопии и иммуноцитохимии (1,2). Согласно данным РМСЭ уровень  $K^+$  в симбиосомах уменьшился в зоне азотфиксации (z3) в сравнении с зоной инфекции (z2), а вакуолярный пул  $K^+$  в инфицированных клетках истощился в зоне старения (z4). Неинфицированные клетки не показали подобной динамики. Иммунолокализация белков *MtAKT* и *MtSKOR/GORK* выявила уменьшение уровня сигнала обоих каналов на цитоплазматической мембране зрелых инфицированных клеток (1). Солевой стресс привел к уменьшению содержания  $K^+$  и увеличению содержания  $Na^+$  в бактериоидах, цитоплазме и вакуолях в зрелых клетках (z3). После солевого стресса наличие белков *MtNHX6* и *MtSKOR/GORK* на мембранах в инфицированных клетках снизилось, белки в значительной части были обнаружены в эндосомах и молодых вакуолях, наблюдались признаки ускоренного старения клеток (2). При этом паттерн иммуносигнала белков в неинфицированных клетках не изменился.

**Вывод:** В зрелых инфицированных клетках доступность  $K^+$  низка, что связано, возможно, с быстрым исчерпанием ресурса, необходимого и для клетки растения-хозяина и для большой колонии внутриклеточных бактерий. Ухудшение доступности также связано с нарушением локализации транспортных белков на мембранах, что также уменьшает уровень внутриклеточного транспорта. Солевой стресс вызывает дополнительное повреждение, которое включает дальнейшее подавление ионных переносчиков  $K^+$  и потерю их с мембран-таргетов. Ряд обменников из группы NHX7/8, способных удалить  $Na^+$ , перестают экспрессироваться в инфицированных клетках, белки транспортеров быстро теряют паттерн локализации, что приводит к накоплению  $Na^+$  в цитоплазме клеток и бактериоидах, старению клетки и прекращению симбиоза. Комплексным результатом этих событий является низкая толерантность корневого клубенька к солевому стрессу. Возможные механизмы изменений будут обсуждены в докладе.

1. Fedorova EE, Coba de la Peña T, Lara-Dampier V, Trifonova NA, Kulikova O, Pueyo JJ, Lucas MM. . Potassium content diminishes in infected cells of *Medicago truncatula* nodules due to the mislocation of channels *MtAKT1* and *MtSKOR/GORK*. J Exp Bot. 2021 2(4):1336-1348. doi: 10.1093/jxb/eraa508.

2. Trifonova N., Kamyshinsky R., Coba de la Peña T., Koroleva M., Lara-Dampier V., Kulikova O., Presniakov M., Pueyo J.J., Lucas M., Fedorova E.E. Alterations in intracellular  $Na^+/K^+$  balance in root nodules of *Medicago truncatula* under salt stress. (2021, submitted)

## Actinorhizal Symbioses

Katharina Pawlowski

Department of Ecology, Environment and Plant Sciences, Stockholm University, 106  
91 Stockholm, Sweden

*E-mail: katharina.pawlowski@botan.su.se*

All root nodule symbioses – legume/rhizobia and actinorhizal symbioses – go back to a common ancestor. The new paradigm of the evolution of nitrogen-fixing root nodule symbioses assumes that the common ancestor was symbiotic. This ancestral symbiosis can have only involved one microsymbiont – a rhizobium or a *Frankia* strain. The polyphyly of the oxygen protection systems for nitrogenase indicates the latter, as *Frankia* strains can provide their own oxygen protection system. Thus, there should have been a microsymbiont exchange in two lineages – legumes and *Parasponia* (Cannabaceae, Rosales).

Without a doubt, legumes are the most successful group of root nodule-forming plants. What can be the reason? Different hypotheses exist for the reason why the root nodule symbiosis was lost in the majority of lineages. The only hypothesis that could affect legumes and actinorhizal plants differently is the cheater hypothesis. However, no evidence exists that microbial cheaters affect actinorhizal plants more than legumes. Is there a feature of actinorhizal plants that makes their root nodule symbiosis evolutionary unstable?

Phylogenetically, *Frankia* strains can be grouped in four clusters. The analysis of the earliest divergent cluster, cluster-2, has been hampered by the fact that with two exceptions, cluster-2 strains could never be cultured. Meanwhile, we have sequenced several *Frankia*-enriched metagenomes of *Frankia* cluster-2 strains or strain assemblages using DNA isolated from nodules of host plants growing in Asia, the Mediterranean, North America, New Zealand, Papua-New Guinea, the Philippines and Taiwan. Phylogenetically, the genomes from New Zealand, Papua New Guinea, the Philippines, Taiwan form a lineage of *Frankia* cluster-2 that is different from that distributed in continental Asia, the Mediterranean and western North America. The evolution and spreading of host and microsymbiont and the genetic differences between the two lineages of cluster-2 *Frankia* will be discussed with particular attention to loss of saprotrophic capabilities which might have affected the maintenance of the symbiosis during allopatric speciation.

## **Live cell and deep tissue imaging during plant-microbe interactions and plant development**

Ton Timmers

Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Cologne, Germany

*E-mail: ton.timmers@toulouse.inra.fr*

Microscopy in general, and botanical microscopy in particular, has seen a tremendous development since the cloning of the green fluorescent protein and the publication of its sequence in 1992. Fluorescence microscopy has become a widely applicable technology for imaging cellular components at high resolution both in living and fixed tissues and enable the study of cellular organisation in high detail, observe gene activity and measure the interaction of molecules thereby giving information on cellular processes that were difficult or not at all possible to obtain before. Live cell imaging has become a standard in botanical microscopy and microscope systems compatible with long-term live experiments exist today. The first part of my presentation is dedicated to the systems available within my institute in Cologne and will focus on imaging parameters needed for proper live cell imaging.

Many plant organs are opaque for light and imaging fluorescent signals deep within these organs is difficult. Recently, clearing techniques came available that allow observing fluorescent signals in whole plant organs from leaves, roots, flowers and whole legume nodules up to several mms in size. Although, this has increased our capacity to look deep inside plant organs, it remains challenging to image a comparable volume within living organs either isolated or attached to the plant. Our ideas and methods to obtain deep tissue imaging in living plant tissue are the second part of my presentation.

## ТЕЗИСЫ УСТНЫХ ДОКЛАДОВ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

### Изменение паттернов метилирования ДНК в терминально дифференцированных клетках *Rhizobium leguminosarum*

Алексей Афонин, Эмма Грибченко, Евгений Зорин, Татьяна Аксенова, Антон Сулима,  
Дарья Романюк, Владимир Жуков  
E-mail: aafonin@arriam.ru

Бактерии группы *Rhizobia* обладают уникальной способностью образовывать симбиозы с растениями семейства *Fabaceae*. Так называемый «перекрестный обмен» молекулярными сигналами играет решающую роль в формировании указанных симбиозов, помогая синхронизировать процессы в симбионтах, приводя к образованию азотфиксирующих клубеньков. В процессе формирования симбиоза оба организма претерпевают значительные изменения своего состояния. Растение образует клубенек, в то время как бактерии терминально дифференцируются в бактериоиды - азотфиксирующую форму, неспособную к свободному существованию. Хотя репликация бактериальной ДНК в бактериях является общепризнанным фактом, ранее этот процесс не исследовался подробно для растений гороха. Целью этого исследования было охарактеризовать геномный состав штамма RCAM1026 в культуре и в условиях бактериоидов, чтобы идентифицировать изменения, происходящие во время терминальной дифференцировки. Был исследован штамм RCAM1026, обычно используемый для экспериментов по инокуляции. Культуру свободноживущих клеток собирали после одного дня культивации при 28 ° C в среде TY. Бактериоидную ДНК выделяли из бактериоидов, которые выделяли через четыре недели после инокуляции клубеньками, образовавшимися на корнях растений сорта Frisson. Секвенатор MinION (Oxford Nanopore) использовался для секвенирования генома. Сначала сравнивали геномы двух бактериальных форм, чтобы исследовать возможные события геномной перестройки. Полученная сборка для свободноживущей культуры состояла из 5 кольцевых репликонов, из которых симбиотическая плазмида показывала в два раза меньшее покрытие. Сборка бактериоидного генома не показала отчетливых структурных изменений, но относительная представленность хромосомы была в два раза большей, чем у остальных репликонов, что означает, что хромосома размножается больше во время образования бактериоида. Интересно, что все плазмиды имели очень похожее покрытие. Алгоритмы Megalodon и Nanodisco были использованы для исследования различий в метилировании между свободноживущей культурой и бактериоидами. В свободноживущей культуре были обнаружены два различных паттерна метилирования: GANTC и GGCGCC; только один отчетливый паттерн метилирования был обнаружен в геноме бактериоида: GGCGCC. Сайт GGCGCC, по-видимому, представляет сайт рестрикционного фермента, ранее не описанный для *R. leguminosarum*. Мотив GANTC был гораздо менее распространен в бактериоидах, чем в свободноживущей культуре, что может быть связано с терминальной дифференцировкой бактериоидов, которые не подвергаются делению клеток и могут приводить к увеличению числа копий хромосом. Отсутствие метилирования может быть одним из механизмов, переводящих бактерии из свободноживущего в дифференцированное состояние. Исследование паттернов метилирования, относящихся к конкретным генам, в сочетании с исследованием транскриптома может пролить свет на конкретные гены, регулируемые метилированием в бактериоидах.

Работа поддержана грантом РФФИ [№ 19-316-51014].

**Штамм *Bacillus subtilis* IB-22 повышает уровень АБК у дефицитного по этому гормону мутанта ячменя**

Ахтямова З.А.<sup>1</sup>, Архипова Т.Н.<sup>1</sup>, Мартыненко Е.В.<sup>1</sup>, Нужная Т.Н.<sup>1,2</sup>, Кузьмина Л.Ю.<sup>1</sup>,  
Иванов Р.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Уфимский институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук»

<sup>2</sup> ФГБНУ «Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук»

*E-mail:* [akhtyamovazarina@gmail.com](mailto:akhtyamovazarina@gmail.com)

Способность продуцировать фитогормоны и влиять на их метаболизм в растениях – важное свойство ризосферных бактерий, определяющее их влияние на рост растений. Поскольку абсцизовая кислота (АБК) снижает устьичную проводимость и увеличивает способность тканей проводить воду, поддержание водного баланса у растений салата на фоне активации их роста было связано, в том числе, с накоплением АБК под воздействием бактерий. В связи с предполагаемой ролью АБК представляло интерес проверить, зависит ли ответная реакция растений ячменя на бактериальную обработку от их способности синтезировать АБК.

Растения выращивали на светоплощадке. Проростки обрабатывали бактериальной суспензией одновременно с посадкой. Оценивали содержание АБК, относительное содержание воды, содержание хлорофилла и уровень нефотохимического тушения, площадь листьев и массу побегов. С помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени определяли уровень транскриптов генов ячменя, ответственных за метаболизм АБК: *HvNCED1* и *HvNCED2*, кодирующих диоксигеназу 9-цис-эпокароотиноидов (ключевой фермент синтеза АБК) и *HvCYP707A1*, кодирующий АБК гидроксилазу, катализирующую распад АБК. Сравнение дефицитного по АБК мутанта ячменя Az34 и растений его родительского генотипа Steptoe выявило стимуляцию роста растений обоих генотипов при бактериальной обработке. Масса побегов и площадь листьев необработанного бактериями мутанта была примерно на 30 % меньше по сравнению со Steptoe. Стимулирующий эффект бактерий проявлялся в увеличении площади листа на 15% у Steptoe и на 35% у Az34 и массы побега на 18% и 41% соответственно. В результате уменьшалась разница между растениями двух генотипов по фенотипу. У дефицитного мутанта наблюдалось повышение уровня АБК более, чем в 2 раза под влиянием *Bacillus subtilis* IB-22, что было обусловлено как способностью бактерий продуцировать АБК, так и снижать активность распада АБК в растениях ячменя. Результаты, полученные в данной работе, свидетельствуют о том, что отдельные штаммы бактерий способны повышать уровень АБК в растениях, компенсируя генетически обусловленный дефицит этого гормона.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90007.

## Протеоеномные основы полифункциональной активности *Bacillus thuringiensis*

Белоусова М.Е.<sup>1,\*</sup>, Маловичко Ю.В.<sup>1,2</sup>, Шиков А.Е.<sup>1,2</sup>, Лобов А.А.<sup>2,3</sup>, Нижников А.А.<sup>1,2</sup>, Антонец К.С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский институт сельскохозяйственной микробиологии (ФГБНУ ВНИИСХМ), Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет (СПбГУ), Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Институт цитологии РАН (ИНЦ РАН), Санкт-Петербург, Россия

[\\*m.belousova@arriam.ru](mailto:m.belousova@arriam.ru)

Безопасное сельское хозяйство требует развития биологических средств борьбы с вредителями, соответствующих требованиям эффективности, экологичности и технологичности. Одним из самых популярных биологических инсектицидов является грамположительная спорообразующая почвенная бактерия *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), а именно препараты на основе ее кристаллических белковых токсинов (Cry) и спор [1]. Однако, спектр производимых бактерией факторов вирулентности значительно шире репертуара ее инсектицидных токсинов. Так, *Bt* может оказывать ростостимулирующее, фунгицидное и бактерицидное действие [2], а ее инсектицидные эффекты не всегда определяются только токсинами Cry [3]. Для того чтобы изучить разнообразие белков, продуцируемых *Bt*, и разобраться в их функциях, мы исследовали протеомы трех разных подвидов *Bt*: *thuringiensis*, *darmstadiensis* и *israelensis* с помощью флуоресцентного двумерного гель-электрофореза (2D-DIGE) и жидкостной хроматографии / тандемной масс-спектрометрии [3]. Было показано, что вегетативная культура содержит большее разнообразие белков, чем спорующая культура. Среди белков вегетативной культуры были обнаружены ферменты клеточного метаболизма, фолдинга и метаболизма белков, а также два фактора вирулентности - металлопротеаза CalY и нейтральная протеаза NprB. В спорующих культурах было обнаружено меньше белков, однако большинство из них представляют факторы вирулентности. Это белки CalY, InhA1 и NprB. Также в протеоме подвида *israelensis* удалось обнаружить Cyt1-подобный белок и ETX/MTX2-подобные Cry-токсины [3]. Используя протеомный подход, нам не удалось обнаружить белки Cry в протеомах исследованных штаммов, однако наличие генов, кодирующих эти белки, в геномах штаммов, относящихся к соответствующим серотипам, было показано нами ранее [2,4]. Вероятно, сложность выявления белков Cry связана с низкой эффективностью солиubilизации этих белков в классических буферах для выделения белка и может решиться благодаря дополнительным стадиям обработки.

Таким образом, нами были выявлены отличия протеомов спорующих и вегетативных культур *Bt*. Различие в количестве выявленных белков согласуются с общим представлением о метаболической неактивности бактерий на стадии споруляции. И хотя количество белков больше на стадии вегетативного роста, вирулентные свойства штамма характеризуются, в основном, белками, обнаруженными на стадии споруляции [3].

Исследование поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 20-316-70020).

1. Bravo A., Likitvivatanavong S., Gill S.S., Soberyn M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2011, 41(7). 423-31. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>

2. Белоусова М.Е., С.Д. Гришечкина, В.П. Ермолова, К.С. Антонец, А.В. Марданов, А.Л. Ракитин., А.В. Белецкий., Н.В. Равин., А.А. Нижников. Секвенирование генома штамма *Bacillus thuringiensis* var. *Darmstadiensis* 56 и изучение инсектицидной активности биологического препарата на его основе // *Сельскохозяйственная биология*, 2020. 1(55). 87-96. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.1.87rus>

3. Shikov, A.E., Malovichko, Y.V., Lobov, A.A., Belousova, M.E., Nizhnikov, A.A., Antonets, K.S. The Distribution of Several Genomic Virulence Determinants Does Not Corroborate the Established Serotyping Classification of *Bacillus thuringiensis* // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. 22. e2244. <https://doi.org/10.3390/ijms22052244>

4. Ермолова В.П., Гришечкина С.Д., Белоусова М.Е., Антонец К.С., Нижников А.А. Инсектицидные свойства *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*. Сообщение II: Сравнительный морфологический и молекулярно-генетический анализ кристаллогенных и акристаллогенных штаммов // *Сельскохозяйственная биология*. 2019., 54., 1281-1289. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.6.1281eng>

## Анализ локализации области терминации репликации у *Sinorhizobium meliloti*

Владимирова М.Е., Румянцева М.Л.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,

Пушкин-8, г.Санкт-Петербург, Россия

E-mail: [mariacherkasova@arriam.ru](mailto:mariacherkasova@arriam.ru)

Район терминации репликации (*terC*) один из важнейших участков, в котором завершается репликация хромосомы бактерий. Последовательности *terC* консервативны, но не гомологичны у бактерий разных видов, что затрудняет определение их локализации. На модельных объектах показано, что в районе *terC* изменяются структурные характеристики хромосомы.

В данной работе впервые выполнен биоинформатический поиск и анализ *terC* для клубеньковых бактерий вида *Sinorhizobium meliloti*, на примере высокоэффективного симбионта *Medicago lupulina* L6-AK89 и референс штамма Rm1021 с использованием двух подходов: (I) оценка расположения 8-ми нуклеотидного мотива GGGCAGGG (далее НМ);

(II) анализ асимметрии GC. Поиск проводили с использованием BLASTn и GenSkew.

Всего в хромосоме L6-AK89 выявлено 278 НМ. Встречаемость НМ на + цепи составила  $6,7 \pm 2,6$  на каждые 100 т.п.н. в диапазоне 1-170 т.п.н, тогда как в диапазоне 171-358 т.п.н. имелись только единичные НМ. На - цепи установлено сходное расположение НМ:  $1 \pm 0,8$  НМ на 100 т.п.н. в диапазоне 1-170 т.п.н, и резкое увеличение встречаемости НМ до  $7,3 \pm 3,6$  в диапазоне 171-358 т.п.н. Анализ GC асимметрии показал, что точка GC-перегиба находилась в диапазоне 170-171 т.п.н. на хромосоме L6-AK89. Район *terC* L6-AK89 составил в длину 9,9 т.п.н. и располагался в координатах 170-171 т.п.н. Аналогично был проведен поиск *terC* на хромосоме референс-штамма *S. meliloti* Rm1021 (8.3 т.п.н.). Анализ последовательностей *terC* у штаммов L6-AK89 и Rm1021 показал, что они гомологичны (99%), однако внутри *terC* L6-89 расположен ген транспозазы, что обусловило различия в протяженности изучаемого района хромосомы. Таким образом, на основании структурных характеристик хромосом штаммов L6-AK89 и Rm1021 разработан методический подход определения локализации последовательности *terC* для *S. meliloti* и показано, что данная область может содержать последовательности мобильных элементов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2020-920 от 16.11.2020 о предоставлении гранта в виде субсидии из Федерального бюджета Российской Федерации. Грант предоставлен в рамках государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».



## Влияние фунгицидов Винтаж МЭ и Титул Дуо на ультраструктуру симбиотических клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.)

Горшков А.П.<sup>1</sup>, Цыганова А.В.<sup>1</sup>, Цыганов В.Е.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский научный центр РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

E-mail: [artemius1993@yandex.ru](mailto:artemius1993@yandex.ru)

*Аннотация.* Изучены проявления негативного влияния системных комбинированных фунгицидов триазольного класса на ультраструктурную организацию клубеньков гороха дикого типа линии SGE и сорта Finale.

*Ключевые слова:* симбиотический клубенек, фунгицид, клеточная стенка, бактериоид, Винтаж МЭ, Титул Дуо.

В сельскохозяйственном производстве широко применяются различные средства защиты растений, в том числе фунгициды. Создаются новые коммерческие фунгициды комбинированного действия, к такому типу препаратов относятся Винтаж МЭ и Титул Дуо. Ранее было показано, что фунгициды могут оказывать негативное влияние на бобово-ризобийный симбиоз, тем не менее, исследования влияния фунгицидов Винтаж МЭ и Титул Дуо на клубенькообразование и, в частности, на структуру клубеньков не проводились. Целью данной работы было изучить влияние различных концентраций данных фунгицидов на ультраструктурную организацию клубеньков линии гороха посевного (*Pisum sativum* L.) дикого типа SGE и сорта Finale. Растения были выращены в сосудах с вермикулитом, опрыскивание фунгицидами производилось на 10-й и 20-й дни после инокуляции. Винтаж МЭ был использован в концентрации 1:200 (рекомендованная производителем), 1:100, 1:20, а Титул Дуо в концентрации 1:500 (рекомендованная производителем), 1:250, 1:50. При рекомендованных производителем концентрациях не наблюдалось влияния фунгицидов на развитие растений, однако количество клубеньков было снижено. При более высоких концентрациях замечена редукция как стеблей, так и корней, количество клубеньков снижалось ещё больше. На ультраструктурном уровне при рекомендованных концентрациях обнаружены следующие аномалии: просветление и истончение клеточных стенок, накопление полигидроксibuтирата (ПОБ) в бактериоидах. При концентрациях 1:100 и 1:250 аномалии клеточных стенок были выражены сильнее – наблюдалось их набухание, искривление и просветление во всех гистологических зонах клубенька. Стенки инфекционных нитей также подвергались набуханию и просветлению. В бактериоидах наряду с ПОБ были выявлены крупные сферические включения средней электронной плотности неизвестной природы. При самых высоких концентрациях 1:20 и 1:50, наряду с вышеописанными изменениями, в инфицированных клетках присутствовали бактериоиды аномальной формы и плотности, а также мультивезикулярные тельца в центральной вакуоли. Таким образом, Винтаж МЭ и Титул Дуо негативно влияют на развитие симбиотических клубеньков гороха на ультраструктурном уровне.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-920 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

## **Эффективность PGPR-бактерий при микроклональном размножении картофеля в моделируемых условиях осмотического стресса**

Денисова А.Ю.<sup>2</sup>, Евсеева Н.В.<sup>1</sup>, Ткаченко О.В.<sup>2</sup>, Бурьгин Г.Л.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

<sup>2</sup>Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов, Россия

E-mail: [alena.denisova1408@yandex.ru](mailto:alena.denisova1408@yandex.ru)

Стресс засухи является одним из самых разрушительных факторов, отрицательно влияющих на культурные растения. PGPR-бактерии могут оказывать протекторное действие на растения против осмотического стресса. Предполагаемые механизмы воздействия ризобактерий включают изменение фитогормонального статуса растений, синтез осмолитов, повышение активности антиоксидантных ферментов. Проведение исследований функционирования растительно-микробных ассоциаций в контролируемых условиях *in vitro* делает возможной оценку целевых факторов в изучаемых системах.

Цель работы – исследование влияния бактерий *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 и их смешанных культур на физиолого- морфологические и биохимические параметры микроклонов картофеля в условиях осмотического стресса *in vitro*.

Микрорастения картофеля сорта Невский из коллекции микроклонов картофеля *in vitro* ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ инокулировали 2 штаммами бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН. Бактерии добавляли в концентрации 10<sup>6</sup> кл/мл в жидкую среду Мурасиге-Скуга. Осмотический стресс создавали полиэтиленгликолем (М.м. 6000) в концентрации 25 г/л. Оценивали физиолого-морфологические параметры растений, содержание малонового диальдегида (МДА), активность ферментов пероксидазы и каталазы в листьях на 7-ые сутки действия стресса и на 7-ые сутки репарации.

Бактеризация способствовала смягчению действия стресса, что проявлялось в снижении уровня малонового диальдегида в листьях, как продукта перекисного окисления липидов в растительных клетках. Коинокуляция дополнительно приводила к повышению активности пероксидазы и каталазы, что способствовало более быстрому снижению окислительного стресса в растениях. Штамм *O. cytisi* IPA7.2, ранее выделенный нами из ризосферы картофеля, оказывал более значительное протекторное действие на физиолого- биохимические процессы в растениях при стрессе и репарации по сравнению с *A. baldaniorum* Sp245.

Полученные результаты расширяют представление об эффекте коинокуляции растений ризобактериями и антиоксидантной защите растений в условиях осмотического стресса. Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 19-016-00116.

## Роль микробных сообществ в интродукции тимьяна обыкновенного (*Thymus vulgaris* L.)

Жаркова Е. К.

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева

E-mail: [ekzharkova.tsha@yandex.ru](mailto:ekzharkova.tsha@yandex.ru)

При интродукции растений важно стабилизировать микробные сообщества, ассоциированные с культивируемым видом, так как при смене условий произрастания, при предпосевной обработке семян с использованием методов химической или термической скарификации растение может лишиться свойственных ему микробных симбионтов. Так же ассоциативные микроорганизмы могут испытывать негативное влияние со стороны физико-химических факторов почвы и микробных сообществ, присущих зоне интродукции.

Объектом исследования служил тимьян обыкновенный (*Thymus vulgaris* L.), культивируемый на делянках коллекционного участка Овощной опытной станции им. В. И. Эдельштейна (г. Москва) и микробные сообщества, ассоциированные с этим фармакопейным лекарственным растением. При проведении исследования были использованы как классические (выделение чистых культур микроорганизмов, оценка антимикробной активности), так и современные (метагеномное секвенирование и секвенирование по Сэнгеру, геноиндикация) микробиологические методы.

Установлено, что количественные показатели и видовое разнообразие микробных сообществ, ассоциированных с фитосферой тимьяна обыкновенного (*T. vulgaris* L.), интродуцированного в зону дерново-подзолистых почв (г. Москва), не одинаково для различных частей фитосферы тимьяна. Количество копий генов бактерий, архей и грибов и гена *Nif H*, отвечающего за азотфиксацию у прокариот, уменьшается при удалении от корней. Для ризосферы тимьяна обыкновенного (*T. vulgaris* L.) характерно наличие микроорганизмов, способных к синтезу росторегулирующих и антимикробных веществ, а также способных к разложению ароматических, в частности, фенольных соединений. Тимьян обыкновенный (*T. vulgaris* L.), интродуцированный в зону дерново-подзолистых почв, способен к синтезу фенольных соединений, обладающих высокой антимикробной активностью по отношению к микроорганизмам из различных систематических групп.

Полученные результаты могут быть использованы для дальнейших исследований, связанных с адаптацией тимьяна обыкновенного (*T. vulgaris* L.) в зоне дерново-подзолистых почв, включая разработку методов повышения уровня ассоциативной азотфиксации, повышения устойчивости к фитопатогенам, вредителям и неблагоприятным условиям окружающей среды.

## ***RolB/C*-подобный ген у голубики и брусники**

Жидкин Р.Р.<sup>1</sup>, Антропов Д.О.<sup>2</sup>, Чиненко С.В.<sup>3</sup>, Матвеева Т.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>2</sup> ГБНОУ «Санкт-Петербургский городской дворец творчества юных», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБУН «Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

E-mail: [st085586@student.spbu.ru](mailto:st085586@student.spbu.ru)

Широко распространенное в прокариотическом мире явление горизонтального переноса генов также наблюдается и у эукариотических организмов. Одним из наиболее изученных таких примеров является перенос генов от бактерии “*Agrobacterium*” *sp.* к растительным организмам. Поскольку в результате агробактериальной трансформации T-DNA переносится в геном реципиента, то в ходе эволюции эти последовательности могут закрепиться в геноме растения. Тогда такие последовательности называются cT-DNA, а растения – природно- трансгенными.

На сегодняшний день найдено значительное число природно-трансгенных растений. Одним из таких организмов является клюква крупноплодная *Vaccinium macrocarpon*, в геноме которой биоинформатическими методами был найден *rolB/C*-подобный ген агробактериального происхождения.

Поскольку голубика *Vaccinium uliginosum* и брусника *Vaccinium vitis-idaea* относятся к тому же роду, что и клюква крупноплодная, то целью работы было описание данной последовательности у форм голубики и брусники, произрастающих на географическом удалении друг от друга и в разных экологических условиях. Работа проводилась на материале голубики, собранном в следующих географических объектах: Карельский перешеек, Хибинские горы, Ненецкий АО, национальный парк Югыд-ва, плато Путорана, Ленинградская область; и на материале брусники, собранном в следующих географических объектах: Хибинские горы, Ненецкий АО, национальный парк Югыд-ва, плато Путорана, Ленинградская область.

В результате выполнения данной работы во всех проанализированных образцах найдена полноразмерная последовательность *rolB/C*-подобного гена, причем, обнаруженные последовательности характеризуются низким количеством однонуклеотидных замен в пределах вида и высоким уровнем сходства между видами. Так на уровне ДНК сходство исследуемого гена у *V. macrocarpon* и *V. vitis-idaea* составляет 96%, *V. macrocarpon* и *V. uliginosum* – 95%. Также, были обнаружены два географически близких образца голубики (национальный парк Югыд-ва), отличающиеся по нуклеотидному составу интактного *rolB/C*- подобного гена от прочих образцов голубики.

Низкое количество однонуклеотидных замен свидетельствует о стабилизирующем отборе в пользу интактной последовательности изучаемого гена. Данное свидетельство может указывать на возможное функционирование *rolB/C*-подобного гена в геномах *V. uliginosum* и

*V. vitis-idaea*. Для дальнейшего изучения роли этого гена необходимо создание генно-инженерных конструкций для трансформации модельных растений.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2020-922 от 16.11.2020 о предоставлении гранта в виде субсидии из Федерального бюджета Российской Федерации. Грант предоставлен в рамках государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

## **Роль глутатиона, гомоглутатиона и их соотношения в защитных реакциях и развитии симбиотического клубенька гороха посевного (*Pisum sativum*)**

Иванова К.А., Цыганов В.Е.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург, Россия

*E-mail:* [kivanova@arriam.ru](mailto:kivanova@arriam.ru)

Водорастворимый антиоксидант и окислительно-восстановительный буфер растений – тиол глутатион (GSH) участвует в регуляции развития и реакции на биотический и абиотический стресс у растений, выполняя ряд уникальных функций, не позволяющих заменить его другим тиолом или антиоксидантом. У бобовых растений обнаружен уникальный гомолог GSH – гомоглутатион (hGSH), который, вероятно, также участвует в адаптации к стрессу у растений, включая клубенькообразование. Эти тиолы могут как выполняют роль антиоксидантов для нормального протекания высокочувствительных реакций симбиотической фиксации азота, так и участвовать в индукции и супрессии защитных реакций, сопровождающих формирование клубенька. В рамках работы была проанализирована роль тиолов GSH и hGSH и их соотношения в развитии и функционировании симбиотических клубеньков гороха (*Pisum sativum*). Биосинтез и содержание тиолов были проанализированы в клубеньках и неинокулированных корнях гороха дикого типа и мутантов, заблокированных на разных стадиях развития клубеньков. Были изучены действие ингибитора биосинтеза (h)GSH и влияние обработки экзогенным GSH на клубенькообразование. Соотношение GSH и hGSH в клубеньках *P. sativum* изменяется после выхода бактерий из инфекционных нитей, что является необходимым условием развития симбиотического клубенька. С использованием симбиотических мутантов *P. sativum* было показано, что индукция защитных реакций в неэффективных клубеньках сопровождается изменением в метаболизме GSH и hGSH. Низкое содержание тиолов по сравнению с клубеньками дикого типа было ассоциировано с деградацией симбиотических структур и ранним старением клубеньков мутанта *sym40-1*, тогда как более высокое содержание hGSH в клубеньках мутанта *sym33-3* коррелировало с нарушением процесса инфекции и индукцией экспрессии генов, ассоциированных с защитными реакциями. В неэффективных симбиотических клубеньках недостаток тиолов приводит к нарушению развития меристемы, роста инфекционных нитей и деления симбиосом, а в эффективных – к преждевременной деградации симбиотических структур. Обработка раствором GSH (1 мМ) способствовала как увеличению степени инфицирования клубеньков, так и усилению защитных реакций в неэффективных клубеньках мутанта *sym33-3*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-16-00117.

**Молекулярно-генетическая идентификация растения семейства Яснотковые используемого для поддержания коллекции грибов арбускулярной микоризы**

Калинина А.А.<sup>1</sup>, Кудряшова Т.Р.<sup>1</sup>, Крюков А.А.<sup>2</sup>, Аронова Е.Б.<sup>1</sup>, Юрков А.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт  
сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail:* [7359572@mail.ru](mailto:7359572@mail.ru)

Арбускулярная микориза (АМ) является наиболее распространенным растительно-микробным симбиозом. Грибы помогают растениям в усвоении питательных веществ из почвы, водном снабжении, в то время как получают от растений продукты фотосинтеза – углеводы и жирные кислоты. Грибы АМ не способны развиваться в отсутствие растения хозяина. Для поддержания коллекции грибов требуется хорошо изученная растительно-микробная система. В ФГБНУ ВНИИСХМ для такой системы используется *Plectranthus australis*, экземпляры которого много лет назад были получены из БИН РАН. Неожиданным оказалось отсутствие сиквенсов *P. australis* в результатах Illumina MiSeq после анализа микробных сообществ на корнях этого растения с использованием универсальных праймеров. В тоже время были обнаружены сиквенсы растения относящегося к семейству Яснотковых (*Lamiaceae*), без определения до рода. Сложность морфологической идентификации данного растения обусловлена отсутствием фазы цветения в условиях поддержания коллекции грибов АМ.

Цель работы: используя методы молекулярно-генетической идентификации установить вид растения. Планируется также более точная морфологическая оценка данного растения. Экстракция ДНК растительных тканей будет проведена СТАВ методом после перетирания листьев с жидким азотом. Амплификация должна быть проведена с универсальными праймерами ITS4 и ITS5, с последующим секвенированием по Сэнгеру. Филогенетический анализ будет проведен в пакете программ Mega7.

Научные исследования проводятся при поддержке РФФИ №19-29-05275-МК, а также РФФИ №20-016-00245.



## Сравнительный анализ общегеномного разнообразия микросимбионтов козлятника восточного и лекарственного в популяции на Северном Кавказе.

Карасев Е.С.<sup>1</sup>, Хосид С.Л.<sup>1</sup>,

Андронов Е.Е.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: [evgenii1991.karasev@gmail.com](mailto:evgenii1991.karasev@gmail.com)

Бобово-ризобиальный симбиоз издавна являлся объектом самого пристального научного интереса. Кроме очевидного практического значения, это явление может служить моделью для фундаментальных исследований эволюционных процессов и видообразования. Особый интерес для таких исследований представляет бобово-ризобиальный симбиоз козлятника и его ризобий. Род козлятника представлен двумя видами: козлятник восточный (*Galega orientalis*) и козлятник лекарственный (*Galega officinalis*). Их микросимбионты, соответственно, по своей хозяйской специфичности подразделяются на 2 биовара. При перекрёстной инокуляции на корнях растений образуются клубеньки, не способные фиксировать азот. Эта особенность, по-видимому, является начальным этапом видообразования, что делает этот симбиоз перспективной моделью для фундаментальных исследований.

Прошлые исследования этой модели проводились в популяции Северного Кавказа (Andronov, 2003, Osterman, 2011, Карасев, 2017). Северный Кавказ является генцентром козлятника восточного. Это означает, что в этом регионе данный вид имеет крайне высокую степень разнообразия. В то же время козлятник лекарственный появился в данном регионе относительно недавно. В прошлых исследованиях было показано, что в данной популяции ризобии козлятника показывают уровни разнообразия, соответствующие разнообразию растения-хозяина. Эти данные получены на основании анализа AFLP-фингерпринтов, а также секвенирования отдельных участков генома. Однако быстрое развитие новых методов высокопроизводительного секвенирования открывает новые возможности для анализа данной выборки в масштабах целого генома. В данном исследовании мы, в отличие от ранних работ, выполненных на уровне отдельных генов, провели сравнительный анализ полных геномов 14 штаммов *Neorhizobium galegae* Северо-Кавказской популяции. Анализ ANI (Average Nucleotide Identity) коровой части генома показал, что штаммы биовара *orientalis* по данным анализа полных геномов значительно более разнообразны по сравнению с биоваром *officinalis*. Кроме того, общее число генов во всех исследованных штаммах биовара *orientalis* оказалось выше, чем у *officinalis*, а коровый компонент, напротив, ниже. Распределение коэффициентов dN/dS у генов биовара *officinalis* оказалось смещено в сторону негативного отбора по сравнению с биоваром *orientalis*, что может свидетельствовать как о специфике отбора, так и являться следствием низкого полиморфизма в популяции биовара *officinalis*. Особый интерес представляют данные о функциональной принадлежности генов с повышенным и пониженным полиморфизмом, а также генов, находящихся под действием различного типа отбора у обоих биоваров.

Работа проводилась на средства гранта РФФ 19-16-00081

1. Andronov E., Terefework Z., Roumiantseva M., Dzyubenko N., Onichtchouk O., Kurchak O., Dresler-Nurmi A., Young J. P., Simarov B., Lindstrom. Symbiotic and



- Genetic Diversity of *Rhizobium galegae* Isolates Collected from the *Galega orientalis* Gene Center in the Caucasus.//Applied and Environmental Microbiology, 2003, V69(2), p. 1067-1074. DOI: 10.1128/AEM.69.2.1067–1074.2003
2. Österman J . Chizhevskaya E., Andronov E., Fever D., Terefework Z., Roumiantseva M., Onichuk O., Dresler-Nurumi A., Simarov B., Dzybenko N., Lindstrom K. *Galega orientalis* is more diverse than *Galega officinalis* in Caucasus—whole-genome AFLP analysis and phylogenetics of symbiosis-related genes.// 2011
  3. Карасев Е.С., Чижевская Е.П., Симаров Б.В., Проворов Н.А., Андронов Е.Е. Сравнительный анализ симбиотических генов различных групп клубеньковых бактерий методом построения метадеревьев.//СельхозБиология, 2017, V.52(5), p. 995 – 1003.

## Клубеньковые бактерии дикорастущих бобовых растений, произрастающих в арктических регионах России

Карлов Д.С.<sup>1</sup>, Гуро П.В.<sup>1</sup>, Сазанова А.Л.<sup>1</sup>, Сексте Э.А.<sup>1</sup>, Алехина И.А.<sup>2</sup>,  
Большаянова О.Д.<sup>2</sup>, Белимов А.А.<sup>1</sup>, Сафронова В.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ГНИЦ «Арктический и антарктический научно-исследовательский институт», Санкт-Петербург, Россия

E-mail: [deniskarlov23@gmail.com](mailto:deniskarlov23@gmail.com)

Формирование азотфиксирующего симбиоза с клубеньковыми бактериями в экстремальных почвенно-климатических условиях Арктики играет важную роль для роста и продуктивности растений, их адаптации к среде обитания и конкуренции за экологическое пространство. С целью выявления микросимбионтов арктических бобовых растений семена *Hedysarum arcticum*, *Oxytropis adamsiana*, *O. nigrescens* и *Astragalus alpinus*, собранные в дельте реки Лены (Якутия) и на плато Путорана (Красноярский край), были инокулированы почвенными образцами, отобранными в местах обитания этих растений. Всего из корневых клубеньков было выделено 33 бактериальных штамма, 8 из которых на основе анализа гена 16S рРНК (*rrs*) были отнесены к клубеньковым бактериям родов *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Tardiphaga* и *Bosea* (порядок Rhizobiales). Известно, что представители родов *Mesorhizobium* и *Rhizobium* обладают широкой хозяйской специфичностью, тогда как представители родов *Bosea* и *Tardiphaga* часто выделяются из клубеньков бобовых растений, однако способность этих бактерий к самостоятельному клубенькообразованию не описана. С помощью секвенирования генов “домашнего хозяйства” (*atpD*, *rpoB*, *dnaK* и *gyrB*) было уточнено таксономическое положение штаммов, выделенных из клубеньков *H. arcticum* и принадлежащих к видам *T. robiniae*, *R. herbae* и *M. loti*. Из растений *H. arcticum* и *O. nigrescens*, произрастающих на плато Путорана, были выделены два изолята наиболее родственные видам *B. lathyri* и *R. grahamii*, соответственно. Поскольку оба изолята имели низкие уровни сходства *rrs* с ближайшими типовыми штаммами *B. lathyri* R-46060<sup>T</sup> (99.0%) и *R. grahamii* CCGE 502<sup>T</sup> (99.1%), можно предположить, что они относятся к потенциально новым видам клубеньковых бактерий.

Таким образом, в настоящей работе представлены первые данные о разнообразии ризобий из арктических бобовых растений. Дальнейшее исследование позволит создать коллекцию холодоустойчивых ризобияльных штаммов, представляющих собой уникальные генетические ресурсы для создания и адаптации пастбищных фитоценозов в условиях потепления климата и глобальной перестройки растительных ландшафтов в Арктике.

Работа проведена при поддержке гранта РНФ № 20-76-10042.

## ОРГАНИЗАЦИЯ ТУБУЛИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В КЛЕТКАХ КЛУБЕНЬКОВ ДЕТЕРМИНИРОВАННОГО ТИПА

А.Б. Китаева<sup>1</sup>, А.П. Горшков<sup>1</sup>, П.Г. Кусакин<sup>1</sup>, А.Р. Садовская<sup>2</sup>,  
А.В. Цыганова<sup>1</sup>, В.Е. Цыганов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Российской академии наук, 196608, ш. Подбельского, 3, г. Пушкин 8, г. Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: [anykitaeva@gmail.com](mailto:anykitaeva@gmail.com)

Тубулиновый цитоскелет играет важную роль в установлении бобово-ризобияльного симбиоза. При анализе организации тубулинового цитоскелета в недетерминированных клубеньках пяти видов Бобовых были выявлены общие паттерны кортикальных и эндоплазматических микротрубочек в клетках меристемы, неинфицированных клетках, клетках зоны инфекции. В то же время различные виды формировали упорядоченный или неупорядоченный паттерны эндоплазматических микротрубочек в инфицированных клетках зоны азотфиксации (Kitaeva et. al, 2016, 2021). Для того, чтобы выяснить являются ли выявленные закономерности общими и для клубеньков детерминированного типа, были проанализированы морфология бактериоидов и организация тубулинового цитоскелета в клубеньках *Glycine max*, *G. soja*, *Phaseolus vulgaris* и *Lotus japonicus*.

Организация кортикальных и эндоплазматических микротрубочек в клетках меристемы и инфицированных клетках зоны инфекции клубеньков детерминированного типа сходна с организацией, наблюдаемой в клетках клубеньков недетерминированного типа. В неинфицированных клетках клубеньков *P. vulgaris* и *L. japonicus* кортикальные микротрубочки формировали упорядоченный паттерн, располагаясь параллельно друг другу и перпендикулярно продольной оси клетки, также как в недетерминированных клубеньках. В то же время в клубеньках *G. max* и *G. soja* в неинфицированных клетках кортикальные микротрубочки формировали неупорядоченный паттерн, располагаясь под разными углами. В азотфиксирующих клетках клубеньков всех четырех видов эндоплазматические микротрубочки формировали неупорядоченный паттерн. В отличие от недетерминированных клубеньков кортикальные микротрубочки азотфиксирующих клеток всех видов формировали упорядоченный паттерн.

Таким образом, были выявлены как сходства, так и различия в организации тубулинового цитоскелета в недетерминированных и детерминированных клубеньках.

Работа поддержана РФФИ 20-316-70004.

1. Kitaeva, A.B.; Demchenko, K.N.; Tikhonovich, I.A.; Timmers, A.C.J.; Tsyganov, V.E. Comparative analysis of the tubulin cytoskeleton organization in nodules of *Medicago truncatula* and *Pisum sativum*: bacterial release and bacteroid positioning correlate with characteristic microtubule rearrangements. *New Phytol.* 2016, 210, 168-183, doi:10.1111/nph.13792.
2. Kitaeva, A.B.; Gorshkov, A.P.; Kirichek, E.A.; Kusakin, P.G.; Tsyganova, A.V.; Tsyganov, V.E. General Patterns and Species-Specific Differences in the Organization of the Tubulin Cytoskeleton in Indeterminate Nodules of Three Legumes. *Cells* 2021, 10, 1012. <https://doi.org/10.3390/cells10051012>

## Изучение амилоидных свойств белков наружной мембраны *Rhizobium leguminosarum*

Косолапова А.О.<sup>1,2</sup>, Белоусов М.В.<sup>1,2</sup>, Нижников А.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория №7 протеомики надорганизменных систем, ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Россия, Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, Санкт-Петербург

E-mail: [a.kosolapova@arriam.ru](mailto:a.kosolapova@arriam.ru)

Амилоидами называют неразветвленные белковые фибриллы, обладающие «кросс-бета» пространственной структурой. Амилоиды разделяют на патологические, ассоциированные с развитием неизлечимых заболеваний человека и животных, и функциональные, выполняющие различные физиологические функции. На данный момент наибольшее разнообразие функциональных амилоидов выявлено у бактерий. Бактериальные амилоиды могут являться структурным компонентом матрикса биопленок и белковых оболочек, играть роль в регуляции активности токсинов и факторов вирулентности. Многие функциональные амилоиды вовлечены во взаимодействие патогенных микроорганизмов с клетками и тканями многоклеточных хозяев [1]. Ранее нашим коллективом было выявлено наличие функциональных амилоидов у симбиотической бактерии *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Было показано, что белки наружной мембраны RopA и RopB образуют амилоиды *in vitro*. Более того, было обнаружено наличие амилоидных фибрилл во внеклеточной капсуле, образуемой бактериями в глубоком стационаре, а также увеличение количества белка RopA при стимуляции бактериальных клеток флавоноидом лютеолином [2]. В ходе работы мы показали, что белок RopA образует фибриллы, обладающие амилоидными свойствами, на поверхности бактериоидов, в то время как белок RopB образует амилоидные фибриллы как на поверхности бактериоидов, так и недифференцированных клеток *R. leguminosarum* bv. *viciae*, выделенных из неэффективных корневых клубеньков. Эти данные позволяют предположить, что образование амилоидных фибрилл белком RopB является конститутивным процессом и не зависит от жизненной формы *R. leguminosarum* bv. *viciae*, в отличие от образования амилоидов белком RopA, формирование которых усиливается при стимуляции лютеолином.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 17-16-01100.

1. Kosolapova, A.O.; Antonets, K.S.; Belousov, M.V.; Nizhnikov, A.A. Biological Functions of Prokaryotic Amyloids in Interspecies Interactions: Facts and Assumptions. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 7240. <https://doi.org/10.3390/ijms211972402>.
2. Kosolapova, A.O.; Belousov, M.V.; Sulatskaya, A.I.; Belousova, M.E.; Sulatsky, M.I.; Antonets, K.S.; Volkov, K.V.; Lykholay, A.N.; Shtark, O.Y.; Vasileva, E.N.; Zhukov, V.A.; Ivanova, A.N.; Zykin, P.A.; Kuznetsova, I.M.; Turoverov, K.K.; Tikhonovich, I.A.; Nizhnikov, A.A. Two Novel Amyloid Proteins, RopA and RopB, from the Root Nodule Bacterium *Rhizobium leguminosarum*. *Biomolecules* 2019, 9, 694. <https://doi.org/10.3390/biom9110694>

## Количественный анализ организации цитоскелета в клетках симбиотического клубенька

Кусакин П.Г.<sup>1</sup>, Китаева А.Б.<sup>1</sup>, Цыганов В.Е.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной Микробиологии», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский научный центр РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: [kussakin@gmail.com](mailto:kussakin@gmail.com)*

В условиях азотного голодания, например, на бедных азотом почвах на корнях Бобовых образуется новый орган — азотфиксирующий клубенёк. В ходе его развития почвенные бактерии ризобии проникают в клетки клубенька, при этом инфицированные растительные клетки дифференцируются. В отличие от клеток корня, для которых характерен анизотропный рост, инфицированные клетки клубенька начинают расти изодиаметрически, что приводит к значительному увеличению их объёма, позволяя размещаться в их цитоплазме десяткам тысяч бактериоидов. Поскольку в данный процесс вовлечены перестройки как тубулинового, так и актинового цитоскелета, сравнительный анализ организации цитоскелета в клетках симбиотического клубенька различных видов бобовых представляет большой интерес. Однако микротрубочки и микрофиламенты образуют в клетке сложно устроенную сеть и визуальное сравнение организации цитоскелета различных клеток зачастую затруднено, поэтому для такого анализа необходимы адекватные количественные методы. В данной работе для анализа характера организации цитоскелета использовались трёхмерные конфокальные изображения инфицированных и неинфицированных клеток симбиотических клубеньков различных видов. Определение ориентации элементов цитоскелета осуществлялось при помощи программы MicroFilament Analyser, после чего рассчитывались частоты углов. Анализ характера распределения элементов цитоскелета в растительной клетке проводился с помощью программы AnalyzeSkeleton, для каждой клетки рассчитывались 6 параметров: количество ветвей, суммарная длина ветвей, индекс прямизны ветвей, количество разветвлений, степень ветвления цитоскелета, среднее количество разветвлений на один скелет в клетке. В ходе анализа было установлено, что получаемые характеристики позволяют проводить анализ организации и перестроек как тубулиновых микротрубочек, так и актиновых микрофиламентов в различных клетках клубеньков Бобовых.

Работа поддержана грантами РНФ 16-16-10035 и РФФИ 20-316-70004.

## Роль арбускулярной микоризы в экспансии сорных *Asteraceae*

Малыгин Д.М., Сокорнова С.В.

Всероссийский Научно-исследовательский Институт Защиты Растений, Санкт-Петербург,  
Российская Федерация

E-mail: [mymryk@gmail.com](mailto:mymryk@gmail.com)

Среди нежелательной растительности встречаются представители семейства *Asteraceae*, например, инвазивные *Solidago canadensis*, *Leucanthemum vulgare*, *Senecio inaequidens* и трудноискоренимые сорные виды *Cichorium intubus*, *Cirsium arvense*, *Sonchus arvensis*, *Centaurea cyanus*. Эти виды проявляют крайне высокую экологическую пластичность, которая может обуславливаться симбиотическими отношениями с почвенными микромицетами, например, за счет образования арбускулярной микоризы и микоризных сетей. Впервые это было показано для золотарника канадского, инвазивного вида, признанного высокоопасным в таких странах мира как Белоруссия, Люксембург, Китай, Словакия и Япония [1, 2].

Анализ микобиоты, основанный на представленных в NCBI (на 01.08.2021) около 40 тыс нуклеотидных ДНК-последовательностей грибов, приуроченных к 32 родам семейства *Asteraceae*, содержащим наиболее вредоносные виды, позволил выделить три содержащие филогенетически близкие виды растений группы, доля арбускулярно микоризных грибов в почвенной микобиоте которых была более 50%. В первую входят представители образующих одну секцию триб *Senecioneae*, *Anthemideae*, *Astereae* и *Gnaphalialae*; во вторую — *Cichoreae*, в третью — *Cardueae* [3]. К первой группе были приурочены представители различных порядков Glomeromycetes, в том числе Paraglomerales, Archaeosporales, Diversisporales и Glomerales, ко второй и третьей — только представители Glomerales (*Glomus* и *Rhizophagus*). Валидация полученных данных проводилась микроскопией криосрезов корней растений триб *Cardueae*, *Astereae*, *Anthemideae* и *Cichorieae*, собранных на территории Петергофского и Пушкинского района СПб. Полученные данные подтвердили данные анализа ДНК-последовательностей.

Таким образом, при разработке средств борьбы с представителями сорных *Asteraceae* в том числе *Solidago canadensis*, *Cirsium arvense*, *Cichorium intubus*, необходимо учитывать их способность успешно образовывать АМ и МС.

Работа выполнена с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ «Хромас».

1. Jin, L.; Gu, Y.; Xiao, M. et al. *Funct. Plant Biol.* 2004, 31(10): 979-976;
2. Dong, L.J.; Ma, L.N.; He, W.M. *Appl. Soil. Ecol.* 2021, 157: 103763;
3. Mandel, J.; Dikow, R.; Siniscalchi, C. et al. *PNAS* 2019, 116(28): 14083-14088.

### **Возбудители розовой снежной плесени: разнообразие и вирулентность**

Мещеров А.Р.<sup>1</sup>, Гоголева О.А.<sup>1</sup>, Пономарева М.Л.<sup>1</sup>, Пономарев С.Н.<sup>1</sup>, Балкин А.С.<sup>1</sup>,

Гоголева Н.Е.<sup>2</sup>, Петрова О.Е.<sup>2</sup>, Осипова Е.В.<sup>2</sup>, Гоголев Ю.В.<sup>2</sup>, Горшков В.Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр  
Российской академии наук", г. Казань, РФ.

<sup>2</sup>Казанский институт биохимии и биофизики - обособленное структурное  
подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
"Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр Российской  
академии наук", г. Казань, РФ.

*E-mail:* [strosaz125@gmail.com](mailto:strosaz125@gmail.com)

Розовая снежная плесень — это опасное заболевание, вызываемое психротолерантными грибами рода *Microdochium*, поражающими растения под снежным покровом. Несмотря на то, что это заболевание приводит к потере до 70% урожая озимых культур, его возбудители практически не охарактеризованы, и таксономический состав патокомплекса снежной плесени не описан. В связи с этим целью нашего исследования является создание коллекции современных изолятов грибов-возбудителей розовой снежной плесени и характеристика их генетического и фенотипического разнообразия, в том числе вирулентности. Изоляты грибов были выделены из растений озимых злаков, пораженных снежной плесенью. В ходе анализа морфологических характеристик культур выделенных грибов 127 изолятов были отнесены к роду *Microdochium*. В результате анализа нуклеотидных последовательностей ITS2 выделенных изолятов были разделены на 4 филогенетические группы. Изоляты имели разную вирулентность в отношении растений ржи. У части выделенных изолятов проанализированы внеклеточные ферментативные активности, которые могут играть роль факторов вирулентности: целлюлаза, ксиланаза, пектатлиаза, инвертаза, лигнинпероксидаза, протеаза, амилаза, арабинофуранозидаза. При этом не было обнаружено корреляций между уровнем ферментативных активностей и вирулентностью. Учитывая, что проанализированные изоляты обитали в пределах одного ареала можно сделать заключение, что развитие снежной плесени происходит в результате коллективного действия отдельных разновидностей, каждый из которых вносит свой вклад в общий пул факторов вирулентности. В настоящее время ведется поиск детерминант вирулентности грибов-возбудителей снежной плесени, а также продолжается работа по характеристике изолятов собранной коллекции.

Исследование поддержано мегагрантом № 075-15-2019-1881 Министерства науки и высшего образования РФ.



## Комплексное взаимодействие растений горчицы белой, ризосферных бактерий *Ochrobactrum cytisi* ПА 7.2 и поллютантов

Олексенко А.В.<sup>1</sup>, Крючкова Е.В.<sup>2</sup>, Ткаченко О.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова, Саратов, Россия

<sup>2</sup> ИБФРМ РАН институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов  
Российской академии наук, Саратов, Россия

E-mail: [aleksandra.oleksenko@yandex.ru](mailto:aleksandra.oleksenko@yandex.ru)

В настоящее время различные пестициды, в том числе гербициды сплошного действия и медьсодержащие фунгициды, широко используются в растениеводстве, и их применение неуклонно растет, что приводит к накоплению в почве и ингибирующему действию на сельскохозяйственные растения. Одним из факторов повышения устойчивости растений к неблагоприятным химическим воздействиям могут служить ризосферные бактерии.

Целью исследования было изучение влияния *O. cytisi* ПА 7.2 на устойчивость горчицы белой (*Sinapis alba* L.) к ионам меди и глифосату, а также на транспорт поллютантов в различные части растений.

Семена горчицы высевали в сосуды со стерильным песком, содержащим: 1 мМоль сульфата меди; 0,2 мМоль глифосата; оба загрязнителя вместе в тех же концентрациях. Контролем служили растения, выращенные без поллютантов. На 5 сутки после всходов половину вариантов обрабатывали суспензией *O. cytisi* ПА7.2 в

концентрации  $10^6$  клеток в мл раствора. На 30 сутки измеряли морфометрические показатели растений: высота побега и длина корня (см), количество листьев (шт.), масса побега сухая и сырая, масса корней сухая и сырая (г). Измерения содержания ионов меди проводили на атомно- абсорбционном спектрометре, используя электротермический метод атомизации образцов. Было установлено, что ионы меди в почве не оказывали существенного влияния на всхожесть и рост растений. *O. cytisi* ПА7.2 без наличия загрязнителей стимулировали накопление сухого вещества корней и побегов (соответственно в 1,5 и 2,6 раза), а в сочетании с ионами меди – биомассы корней (в 1,5 раза). Комплексное загрязнение ингибировало накопление сырой массы растений в 1,61 раза по сравнению с контролем, при этом сухая масса побега достоверно не изменялась. Бактерии в присутствии сульфата

меди препятствовали накоплению ионов металла в надземной части растений, но при комплексном загрязнении повышали транслокацию меди в побеги (в 1,6 раза). Глифосат оказывал ингибирующее влияние на длину побегов (в 1,93 раза) и содержание фотосинтетических пигментов (в 1,4 раза). Присутствие *O. cytisi* ПА7.2 не снижало стрессового воздействия глифосата, что необходимо учитывать при использовании горчицы белой в севообороте и в качестве сидерата и фитомелиоранта.



## Фосфонаты как участники растительно-микробного взаимодействия

Парфирова О.И.<sup>1</sup>, Горшков В.Ю.<sup>1,2</sup>, Петрова О.Е.<sup>1</sup>, Смолобочкин А.В.<sup>3</sup>, Исламов Б.Р.<sup>1</sup>,  
Гоголева Н.Е.<sup>1,2</sup>, Гоголев Ю.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр Российской академии наук", Казань, Россия

<sup>2</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>3</sup> Институт органической и физической химии им. А.Е.Арбузова – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр Российской академии наук", Казань, Россия

E-mail: [parfirovaolga.i@gmail.com](mailto:parfirovaolga.i@gmail.com)

Поиск новых факторов вирулентности фитопатогенных микроорганизмов представляет большой интерес с точки зрения получения фундаментальных знаний об инфекционных заболеваниях растений и разработки подходов для их контроля. В качестве потенциальных факторов вирулентности могут выступать фосфонаты – соединения, в структуре которых присутствует связь углерод-фосфор. Для ряда фосфонатов продемонстрированы гербицидные и антимикробные свойства. Ранее было установлено, что среди фитопатогенов к синтезу фосфонатов способны *Pseudomonas syringae* и *Pantoea ananatis*. Роль фосфомицина псевдомонад в патогенезе не установлена, а для пантафоса пантои были продемонстрированы гербицидные свойства, и показано, что это соединение повышает вирулентность данного фитопатогена.

Кластер генов, аннотированных как ферменты метаболизма фосфонатов, был обнаружен и в геноме фитопатогенной бактерии *Pectobacterium atrosepticum* (*Pba*). С помощью транскриптомного анализа мы показали, что экспрессия данных генов, активируется в условиях *in planta* и наиболее активно на поздней стадии колонизации растения, сопряженной с развитием мягкой гнили. Нами были выдвинуты гипотезы о роли фосфонатов в патогенезе, согласно которым они могут: 1) обладать гербицидными свойствами и усугублять развитие инфекции; 2) служить инструментом конкурентной борьбы пектобактерий с другими микроорганизмами во время колонизации растения-хозяина.

Чтобы проверить, действительно ли пектобактерии продуцируют фосфонаты, были подобраны условия *in vitro*, которые индуцируют экспрессию генов, связанных с фосфонатами, и проведена экстракция фосфонатов из супернатантов культур *Pba*. Для обнаружения фосфонатов была использована ЯМР-спектроскопия. Спектры ЯМР <sup>31</sup>P для полученных образцов показали сигналы, характерные для фосфонатов. Для получения мутанта по генам, связанным с биосинтезом фосфонатов, применяли локус-специфический мутагенез. Мутант с делецией *Δfom1* не продуцировал эти метаболиты.

Таким образом, мы впервые детектировали внеклеточные низкомолекулярные фосфонаты у фитопатогенных пектобактерий. В настоящее время мы проводим сравнительный анализ стратегии взаимодействия растений с дикой и *Δfom1*-мутантной формами пектобактерии и проверяем их вирулентность.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-14-00194.

## Серая (кrapчатая) снежная плесень: разнообразие возбудителей и степень их вирулентности

Рязанов Е.А.<sup>1</sup>, Мещеров А.Р.<sup>2</sup>, Гоголева О.А.<sup>2</sup>, Пономарева М.Л.<sup>2</sup>, Пономарев С.Н.<sup>2</sup>,  
Горшков В.Ю.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр Российской академии наук", Казань, Россия.

<sup>3</sup>Казанский институт биохимии и биофизики - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр Российской академии наук", Казань, Россия.

E-mail: [eg.ryazanov@gmail.com](mailto:eg.ryazanov@gmail.com)

Серая (кrapчатая) снежная плесень — это опасное заболевание озимых злаковых культур, вызываемое психрофильными фитопатогенами рода *Typhula*: *ishikariensis* и *Typhula incarnata*. Характерной чертой этого заболевания является то, что его грибы-возбудители поражают растения зимой под снежным покровом, что сильно усложняет возможности контроля снежной плесени, что в результате может приводить к внушительным (более 50 %) потерям урожая озимых культур. Несмотря на всю вредоносность, грибы рода *Typhula* являются одними из самых плохо охарактеризованных фитопатогенов. В связи с этим целью нашего исследования было создание коллекции современных изолятов грибов-возбудителей серой снежной плесени. Изоляты грибов были выделены с растений озимой ржи (*Secale cereale*), озимой пшеницы (*Triticum aestivum*) и озимой тритикале (*Triticosecale*), пораженных снежной плесенью. По морфологическим характеристикам колоний культур грибов выделенные изоляты были разделены на два вида: *Typhula ishikariensis* и *Typhula incarnate*. Для оценки вирулентности изолятов была использована методика отсеченных листьев. В ходе эксперимента были инфицированы листья растений ржи, пшеницы и тритикале в разных физиологических состояниях – закалённые и без закалки. На основе оценки степени поражения листовой пластинки изоляты были распределены на четыре группы по степени вирулентности: сильновирулентные, умеренновирулентные, слабовирулентные и авирулентные. Кроме того, мы выявили, что степень поражения растения зависит не только от агрессивности изолята, но и от физиологического статуса колонизируемого патогеном растения (закаленное/без закалки). В настоящее время проводится поиск зависимости между принадлежностью изолятов к филогенетической группе и степенью вирулентности.

Исследование поддержано мегагрантом № 075-15-2019-1881 Министерства науки и высшего образования РФ.

**Анализ старения симбиотических клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum* L.), индуцированного высокой температурой**

Серова Т.А., Китаева А.Б., Цыганов В.Е.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»,  
196608, ш.

Подбельского, 3, г. Пушкин 8, г. Санкт-Петербург, Россия

E-mail: [t\\_serova@rambler.ru](mailto:t_serova@rambler.ru)

Симбиоз бобовых растений с азотфиксирующими бактериями является одним из источников обогащения почвы биологическим азотом. Известно, что различные абиотические факторы индуцируют преждевременное старение симбиотических клубеньков и снижение биологической фиксации азота. Наблюдаемое в настоящее время глобальное потепление делает особенно актуальным исследование влияния высоких температур на функционирование симбиотических клубеньков.

В работе были использованы растения гороха посевного (*Pisum sativum* L.) лабораторной линии SGE, подвергавшихся температурной обработке посредством выращивания растений при 28 °С, начиная с 3-х недель после инокуляции. Сбор материала для анализа проводили через 1-е, 3-и, 5-е, 7-е и 9-е сутки с начала экспозиции.

В ходе визуальной оценки было отмечено изменение окраски клубеньков от розовой на зеленовато-коричневую, начиная с 3-х суток выращивания при высокой температуре. Изменение окраски начиналось в области зоны инфекции, распространяясь со временем к основанию клубенька и его апикальной части. В ходе анализа гистологической структуры клубенька было выявлено разрушение клеток зоны инфекции уже на 1-е и 3-и сутки воздействия повышенной температурой. На 9-е сутки экспозиции было отмечено полное разрушение клеток клубенька.

В условиях стресса, вызванного воздействием повышенной температуры, активация процесса деградации в симбиотических клубеньках сопровождалась возрастанием экспрессии генов, ассоциированных со старением и защитными реакциями. Уже на первые сутки экспозиции в условиях высокой температуры также было отмечено значительное повышение уровня транскриптов генов белков теплового шока. Уровень транскриптов гена фермента биосинтеза гиббереллинов напротив, был ниже в подвергавшихся повышенной температуре клубеньках по сравнению с контролем уже на первые сутки экспозиции.

Таким образом, была показана активация старения и защитных реакций симбиотического клубенька гороха в условиях воздействия повышенной температуры с первоначальным повреждением апикальной части клубенька.

Работа поддержана грантом Российским научным фондом (21-16-00117).

## Определение структуры и функции белка Svх - предполагаемого фактора вирулентности *Pectobacterium atrosepticum*

Тендюк Н.В.<sup>1</sup>, Горшков В.Ю.<sup>2</sup>, Гоголева Н.Е.<sup>2</sup>, Коннова Т.А.<sup>2</sup>, Осипова Е.В.<sup>2</sup>, Петрова О.Е.<sup>2</sup>, Гоголев Ю.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», г. Казань, РФ

<sup>2</sup>Казанский институт биохимии и биофизики - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр Российской академии наук", г. Казань, РФ

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

Пектобактерий относят к наиболее вредоносным фитопатогенам, вызывающим опасные заболевания культурных растений. Ключевыми факторами их вирулентности считаются ферменты, разрушающие полимеры растительной клеточной стенки. Однако у пектобактерий есть еще ряд потенциальных детерминант патогенности, механизмы действия ряда из которых не известны. К предполагаемым факторам вирулентности пектобактерий относится белок Svх *Pectobacterium atrosepticum*. В нашей работе для выяснения функций данного белка был проведен биоинформатический анализ его аминокислотной последовательности, в ходе которого было выявлено, что Svх-подобные белки есть не только у фитопатогенов, но и у свободно живущих, а так же мутуалистических бактерий. На филогенетическом дереве, построенном по аминокислотным последовательностям, Svх- подобные белки фитоассоциированных микроорганизмов образуют отдельную кладу, что не соответствует принятой филогении данных организмов и может свидетельствовать о направленной эволюции данных белков у фитопатогенов. По результатам анализа аминокислотной последовательности с помощью серверов NCBI Conserved Domain Search, Phyre2, HMMER, I-TASSER у Svх белка *P. atrosepticum* было предсказано наличие двух функциональных доменов – протеазного и ацилтрансферазного. Активный сайт протеазного домена предположительно образован цинк-связывающим мотивом HEXXH...E, характерным для цинковых металлопротеаз. Для экспериментального подтверждения наличия у Svх белка предсказанных ферментативных активностей, был получен очищенный препарат рекомбинантного белка. Очистку белка проводили методом аффинной хроматографии на сорбенте Strep-tactin superflow. У полученного препарата Svх белка была выявлена протеазная активность. В настоящее время продолжают работы по предсказанию третичной структуры и выяснению влияния Svх белка на иммунные ответы растений для изучения роли данного белка в патогенезе, индуцируемом пектобактериями.

Исследование поддержано мегагрантом № 075-15-2019-1881 Министерства науки и высшего образования РФ.

## Изменение микрофлоры ризосферы озимой пшеницы при применении удобрений в условиях южной лесостепи Западной Сибири

Шулико Н.Н., Тукмачева Е.В.

Омский Аграрный научный центр, Омск,  
Россия

E-mail: [shuliko-n@mail.ru](mailto:shuliko-n@mail.ru)

В опыте с озимой пшеницей (сорт Омского АНЦ *Прииртышская*) для предпосевной обработки семян был использован биопрепарат ризоагрин на основе *Agrobacterium radiobacter* шт. 204 (ВНИИСХМ, г. Пушкин). Опыт трехфакторный: **фактор А** – фон с внесением минеральных удобрений N15P23, **В** – солома, **С** – инокуляция. Численность микроорганизмов в ризосфере культуры учитывалась путем посева на твердые питательные среды [1].

Среди вариантов опыта наиболее высокой общей численностью микроорганизмов выделялись следующие: инокуляция семян озимой пшеницы на фоне N15P23, а также с применением удобрений: минеральных, органического и бактериального.

Олигонитрофилы среди определяемых почвенных микроорганизмов являются самой многочисленной группой. Их количество колебалось от 90,3 млн. на контроле до 154-198 млн. КОЕ/г в вариантах опыта. При применении соломы количество олигонитрофилов возрастало на 27-34% к контролю, в варианте с инокуляцией на фоне удобрений – на 119,7%, под влиянием всех видов применяемых удобрений – на 70,6% к контролю.

Количество фосфатмобилизующих бактерий было наиболее высоким в вариантах с инокуляцией семян на фоне минеральных удобрений и на этом же фоне с дополнительным внесением соломы, что свидетельствует о положительном влиянии инокуляции семян на фосфатный режим питания растений.

Количество нитрификаторов на неудобренном фоне составило 2,7-3,3 тыс. КОЕ/г, при внесении минеральных удобрений их число увеличилось до 4,0-5,3 тыс. КОЕ/г. Наибольшая численность нитрифицирующих бактерий была отмечена в варианте с применением органо- минеральной системы удобрений видимо, не только за счет трансформации азота почвы и удобрений, но и дополнительной фиксации азота атмосферы.

Численность почвенных грибов в наибольшей степени возрастала в вариантах с инокуляцией семян озимой пшеницы (43,6-49,9% к контролю), а также при внесении соломы и минеральных удобрений – на 23,5-40% к контролю, составляя 60,5-90,7 тыс. КОЕ/г.

Достоверным являлось в опыте сочетание влияния всех изучаемых видов удобрений – минеральных N15P23, органического (солома), бактериального (ризоагрин) на общую численность определяемой микрофлоры, что связано с увеличением массы растительных остатков в пахотном слое почвы, а также дополнительным азотом ассоциативной (ризофера культуры) азотфиксации.

1. Теппер Е.З. Практикум по микробиологии учебное пособие для вузов / под ред. В.К. Шильниковой. – Москва: Дрофа, 2004. – 256 с.

## ТЕЗИСЫ СТЕНДОВЫХ СООБЩЕНИЙ

### Экспрессия гена кукумопинсинтазы у культурного арахиса (*Arachis hypogaea* L.)

Бемова В.Д.<sup>1</sup>, Матвеева Т.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail:* [viktoria.bemova@yandex.ru](mailto:viktoria.bemova@yandex.ru)

В лаборатории генной и клеточной инженерии в последние годы активно изучают природно-трансгенные растения. Это виды, в геномах которых обнаружены последовательности, гомологичные Т-ДНК *Agrobacterium rhizogenes* (называемые клеточной Т-ДНК или клТ-ДНК). Их предковые формы были трансформированы и смогли дать начало новым видам, в геномах которых стабильно передавалась Т-ДНК, получавшая название клеточной (клТ-ДНК), а растения, ее содержащие, называют природно-трансгенными. Недавно клТ-ДНК была обнаружена в растениях рода *Arachis*, исследуется ее роль в контроле растительно-микробных взаимодействий.

В геномах видов рода *Arachis* выявлены гомологи агробактериальных генов опинсинтаз: кукумопинсинтазы (*cus*) и дезоксифруктозилглутаминсинтазы (*mas2*), в геномах *A.hypogaea*, *A.duranensis* и *A.monticola* имеется полноразмерный ген *cus* с интактной *orf*. Возможно, это влияет на растения, так как опины различного типа могут привлекать в ризосферу определенные микроорганизмы, которые ими питаются. Однако экспрессируется ли ген до настоящего момента оставалось неизвестным. Нами была проанализирована экспрессия гена *cus* в различных органах 9 линий культурного арахиса (*A. hypogaea*) из коллекции ВИР, имеющих разное географическое происхождение и отличающиеся по морфологическим признакам. В ходе работы выявлена тканеспецифичная экспрессия гена *cus* в образцах арахиса и обнаружены линии контрастные по уровню его экспрессии, наибольший уровень экспрессии наблюдается в корнях. Проведена предварительная оценка хозяйственно- ценных признаков арахиса (вызреваемость, урожайность, жирнокислотный состав масла), однако взаимосвязи с интенсивностью экспрессии гена *cus* пока не выявлено.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21-14-00050.



## Роль гетеротримерных G-белков в развитии симбиоза у гороха посевного и люцерны слабоусеченной.

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

E-mail: [dol2helen@yahoo.com](mailto:dol2helen@yahoo.com)

Развитие бобово-ризобиального симбиоза (БРС) начинается с обмена сигналами между партнерами, что приводит к активации внутриклеточного пути передачи сигнала, стимулирующего периодические изменения в концентрации кальция (кальциевые волны) в ядре и, в конечном итоге, повышению уровня экспрессии генов, ответственных за развитие симбиоза. В связи с тем, что наиболее хорошо изученные регуляторы пути передачи сигнала в БРС являются общими и для другого типа симбиоза – с грибами арбускулярной микоризы, неясно, как растения различают своих симбионтов. Наше исследование сосредоточено на выявлении и изучении потенциальных молекулярных

«переключателей» развития того или иного типа симбиоза – гетеротримерных G-белков. В качестве объектов использованы значимый с агрономической точки зрения горох *Pisum sativum* L. и модельное растение люцерны слабоусеченная *Medicago truncatula* Gaertn. Для оценки влияния гетеротримерных G-белков на развитие БРС, для генов *Gbeta1* и *Gbeta2*, кодирующих бета-субъединицы гетеротримерных G-белков и играющих ключевую роль в передаче сигнала, использовали метод РНК-интерференции (RNAi) и анализ локализации экспрессии исследуемых генов с помощью репортерных конструкций с геном *GUS* под контролем соответствующего промотора. Кроме того, было проверено взаимодействие G-белков с потенциальными партнерами – фосфолипазами C и D (PLC, PLD) с помощью метода ко-иммунопреципитации и бимолекулярной флуоресцентной комплементации. Подавление экспрессии гена *Gbeta1* приводило к уменьшению количества клубеньков у изучаемых бобовых, но не оказывало влияния на развитие главного корня и количество боковых корней. Была выявлена специфичная локализация экспрессии гена *MtGbeta1* в процессе клубенькообразования. Полученные результаты предполагают важную роль гена *Gbeta1* в контроле развития симбиоза, что согласуется с данными для бобовых растений с другим типом клубенькообразования, таких как соя *Glycine max* [1]. Эксперименты по ко-иммунопреципитации показали возможное взаимодействие субъединиц G-белка с PLC, что может влиять на изменение внутриклеточного содержания кальция при развитии симбиоза. Локализация экспрессии гена *Gbeta2* была выявлена в развивающихся примордиях клубеньков и в сформированных клубеньках, но также была ассоциирована и с примордиями боковых корней. У растений гороха с подавлением экспрессии гена *Gbeta2* (*Gbeta2*-RNAi) было выявлено увеличение числа примордиев клубеньков, остановившихся в развитии. Вместе с тем, подавление экспрессии *Gbeta2* у *M. truncatula* привело к существенному снижению количества клубеньков и боковых корней. Это предполагает возможную роль этой формы гетеротримерного G-белка в регуляции ранних стадий развития клубеньков на этапе перехода от программы формирования бокового корня к клубеньку.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-920 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Choudhury, S. R., Pandey, S. (2013). *Plant physiology*, 162(1), 522-533.

## Влияние почвы на метагеномы симбиотических клубеньков гороха

Грибченко Э.С., Афонин А.М., Зорин Е.А., Сулима А.С.

ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: [gribemma@gmail.com](mailto:gribemma@gmail.com)

Горох посевной может образовывать симбиоз с клубеньковыми бактериями, в результате чего на корнях растений развиваются клубеньки, населенные бактериями, фиксирующими атмосферный азот. Эффективность азотфиксации и польза от нее для растительно-микробной системы зависят как от генотипа растения, так и от генотипа бактерий. Эта работа исследует, способно ли растение отбирать наиболее полезные штаммы бактерий из почвы или же бактериальное сообщество играет ведущую роль в формировании профиля «симбиотического микробиома».

В опытах использовали растения линий Frisson, Triumph, 8274, 3358 и 2 разных почвы-черневая тайга и дерново-подзолистая почва. Растения гороха инокулировали суспензиями почв на основе PBS. Растения использовали для анализа эффективности связывания и для выделения бактериоидов. Полный метагеном микробного сообщества бактериоидов в клубеньках был секвенирован с использованием технологии секвенирования Oxford Nanopore. Сборка производилась с помощью flye (v 2.8), полученные сборки сравнивались друг с другом и с мета-сборкой из всех клубеньков. Было возможно восстановить до 20 мегабаз геномных данных из образцов секвенирования (2-3 полных генома ризобий) после нескольких итераций удаления неизбежного загрязнения ДНК хозяина. Были собраны только последовательности, принадлежащие к видам *Rhizobium leguminosarum*, что доказывает, что большая часть бактериальной ДНК действительно произошла от бактериоидов. Сравнение сформировавшихся сообществ клубеньков показало, что, как и ожидалось, сообщества больше зависели от почвенного инокулянта, чем от генотипа растения. Мы также обнаружили, что почва черневая тайга содержит разнообразный массив *Rhizobium leguminosarum*, способный образовывать высокоэффективные клубеньки, согласно данным азотфиксации. В этой работе впервые была получена полная информация о «симбиогеноме», который является результатом комплементации генома растения набором геномов клубеньковых бактерий. Результаты экспериментов подтверждают гипотезу о том, что успех симбиотической системы в целом зависит от конкурентоспособности штаммов в большей степени, чем от селективности растения. Следовательно, представляется перспективным непосредственное создание конкурентоспособных и эффективных штаммов клубеньковых бактерий, которые первыми проникнут в растение и определяют состав «симбиогенома» растительно-микробной системы.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-920 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».



## Структура микробного сообщества чернозема южного ризосферы пшеницы озимой в условиях применения ассоциативных штаммов.

Еговцева А.Ю., Мельничук Т.Н., Абдурашитов С.Ф.

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства  
Крыма», г. Симферополь, Россия

E-mail: [cau82@mail.ru](mailto:cau82@mail.ru)

Растительно-микробные ассоциации требуют фундаментального изучения, в том числе с помощью современных методов молекулярно-генетического анализа, позволяющие в полной мере оценить структурно-функциональные особенности микробиома.

Цель работы – изучить влияние интродукции ассоциативных штаммов бактерий в ризосферное сообщество пшеницы озимой трех сортов на изменения таксономической структуры микробиома чернозема южного.

Исследования ризосферы *Triticum aestivum* L. проводили в условиях 2020 г. на трех сортах: Багира, Ермак, Лидия. Штаммы для инокуляции *Pseudomonas fluorescens* P4, *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* L1, *P. nitroguajacolicus* M3, *Bacillus sp.* B5 и *Agrobacterium tumefaciens* R1. Используются современные подходы изучения структуры ризосферного микробиома с использованием высокопроизводительного секвенирования библиотек гена 16S рРНК.

Проведенный метагеномный анализ таксономической структуры микробиома ризосферы пшеницы озимой показал, что значительную часть составили неклассифицируемые микроорганизмы на уровне фил. В состав доминирующих (доля выше 1%), вошли девять: *Thaumarchaeota*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*. На уровне семейств в прокариотном биоме чернозема южного ризосферы пшеницы трех сортов определено от 126 до 133 семейств с долей, не превышающей 1 %. Показано положительное влияние интродуцируемых бактерий на относительную численность метаболически значимых доминирующих 26 семейств бактерий. Анализ главных компонент позволил выявить существенные различия между большинством вариантов с инокуляцией ассоциативными штаммами и контролем и показал, что обработка штаммами семян значительно влияет на изменение таксономической структуры микробиома ризосферы *Triticum aestivum* L.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о способности изучаемых ассоциативных штаммов оказывать воздействие на изменения таксономической структуры микробиома ризосферы пшеницы озимой в условиях чернозема южного Степи Крыма.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ А18-016-00197 и проводилась с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ».

## Симбиотический мутант люцерны хмелевидный и его фенотипические особенности

Калинина Т.В., Деева В.К., Железняков С.В., Якоби Л.М.

ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, РФ

E-mail: [sotvk@yandex.ru](mailto:sotvk@yandex.ru)

Арбускулярная микориза (АМ) обеспечивает выживание многих видов травянистых растений в дикой природе за счет снабжения питательными минеральными элементами (особенно фосфором) и водой. Для сельскохозяйственных растений эффективный микоризный симбиоз также может играть положительную роль в условиях дефицита доступных источников фосфорного питания и воды. Связи с чем исследования механизмов, задействованных в регуляции «работы» АМ являются актуальными.

Для проведения исследований в данном направлении на люцерне хмелевидной с помощью химического мутагенеза был получен мутант, который в отличие от дикого типа образует неэффективный симбиоз с грибом *Rhizophagus irregularis* шт. 8 на почве с низким содержанием доступного для питания растений фосфора; так при образовании АМ у мутанта не наблюдается усиления роста и увеличения содержания общего фосфора в тканях по сравнению с немикоризованным растением. Несмотря на блокировку симбиотрофного фосфорного питания, автотрофное фосфорное питание у мутанта продолжает функционировать; он положительно отзывается на внесение фосфорного удобрения. Таким образом мутант может служить для исследования механизмов, регулирующих эффективность микоризного симбиоза.

Известно, что между макро и микросимбиотом в АМ осуществляется взаимообмен минеральными и органическими соединениями. Проверялась гипотеза о зависимости симбиотрофного фосфорного питания растения от транспорта жирных кислот, который осуществляется от растения к грибу. С этой целью исследовали способность микосимбионта накапливать липиды в везикулах в АМ мутанта, как это наблюдается в АМ люцерны дикого типа. Микоризованные корни мутанта были обработаны Суданом III (окрашивает нейтральные жиры в оранжевый цвет). Исследование АМ мутанта показало способность микосимбионта накапливать жиры в везикулах. На основании проведенного исследования сделано предварительное заключение о том, что транспорт фосфора в АМ от гриба в растение происходит независимо от снабжения гриба жирными кислотами. Работа выполнена на средства грантов РФФИ №№ 08-04-13744-офи-ц, 19-016- 00197-а.

**Характеристика штамма *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* NaPi, супрессирующего фенотипические проявления мутаций в гене гороха (*Pisum sativum* L.) *PsSym40***

Киричек Е.А., Кусакин П.Г., Афонин А.М., Цыганов В.Е.  
Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Россия, Санкт-Петербург, 196608, ш. Подбельского, 3  
E-mail: [jenykir@rambler.ru](mailto:jenykir@rambler.ru)

Бобовые способны фиксировать атмосферный азот с помощью ризобий, участвующих в формировании нового органа на корнях растения — симбиотического клубенька. Установление успешного симбиоза требует, чтобы оба партнера были совместимы друг с другом на протяжении всего процесса развития. Мутации в симбиотических генах как бактерий, так и растений могут приводить к неспособности образовывать клубеньки или неспособности запускать в них азотфиксацию.

Ранее было показано, что некоторые штаммы ризобий способны супрессировать проявления мутаций в симбиотических генах Бобовых и формировать эффективные клубеньки. В частности, штамм *R. leguminosarum* NaPi способен частично супрессировать проявления мутаций в гене *PsSym40* у гороха.

В ходе работы геномы штаммов NaPi и материнского штамма RLV 3841 были просеквенированы с использованием методов высокопроизводительного секвенирования Illumina HiSeq и MinION. На основании полученных данных было проведено сравнение геномов штаммов RLV 3841, NaPi и референсного генома штамма RLV 3841 из GenBank (код доступа ASM926v1). Всего было обнаружено 5 однонуклеотидных замен (SNPs) и 3 инсерций/делеций в различных генах, среди которых проаннотированы гены Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>- антипортера, фосфатазы, транспортера микроцина B17, регуляторной некодирующей РНК (ctRNA\_p42d), а также транскрипционного регулятора из семейства LacI. Помимо этого, в геноме штамма RLV 3841 обнаружена вставка (IS-элемент), содержащая два гена: транспозазу и интегразу, отсутствующая у NaPi и в референсном геноме.

Анализ нитрогеназной активности в клубеньках мутантной линии SGEFix<sup>-</sup>-1 (*sym40-1*), образованных после инокуляции штаммом NaPi, не показал признаков фиксации азота.

При сравнении сухого веса и содержания общего азота в побегах растений линии SGEFix<sup>-</sup>-6 (*sym40-2*), инокуляция штаммом NaPi, обнаружены статистически значимые различия (P>0,95) по сравнению с контролем (инокуляция штаммом RLV 3841).

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2020-920 от 16.11.2020 о предоставлении гранта в виде субсидии из Федерального бюджета Российской Федерации. Грант предоставлен в рамках государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

**Сравнение эффективности выделения РНК из растительных тканей при подготовке к транскриптному анализу с использованием реагентов Purezol, RNazol, Trizol**

Кудряшова Т.Р.<sup>1</sup>, Калинина А.А.<sup>1</sup>, Крюков А.А.<sup>2</sup>, Иванченко О.Б.<sup>1</sup>,  
Юрков А.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт  
сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: [tahacorfu@yandex.ru](mailto:tahacorfu@yandex.ru)

Большинство наземных растений образуют симбиоз с грибами арбускулярной микоризы (АМ). Грибы помогают растениям усваивать минеральные вещества, особенно фосфор, в то время как получают от растений продукты фотосинтеза – углеводы. Выявление генов задействованных в работе растительно-микробных систем является приоритетной задачей в исследовании АМ-симбиоза. Одним из методов поиска генов работающих в определенных условиях является анализ транскриптома (набора РНК транскриптов) растения. Целью данного исследования является сравнение методов работы с растительным материалом *Medicago lupulina* при подготовке РНК к анализу транскриптома. *M. lupulina* инокулированная *Rhizophagus irregularis* является модельной системой “растение-хозяин – АМ-гриб”, включающая высокоотзывчивую на инокуляцию АМ-грибами облигатно микотрофную линию MIS-1 люцерны хмелевидной и высокоэффективный штамм АМ-гриба RCAM00320 *R. irregularis*.

Выделение РНК из тканей растений, развивавшихся как в симбиозе с грибами АМ, так и в отсутствие проводили по трем протоколам: с применением реагентов Purezol, RNazol, Trizol. Эффективность выделения РНК оценивалась на приборе TapeStation Systems и на гель-электрофорезе. Приемлимые показатели были получены только в вариантах опыта с реагентом Purezol. В тоже время Purezol и Trizol являются аналогами и протоколы методики схожи, хотя и не идентичны. Требуется проверка качества используемого реагента Trizol.

После анализа полученных данных по транскриптому (совместно с лабораторией №9 ФГБНУ ВНИИСХМ) планируется оценка экспрессии выявленных симбиотических генов в различных условиях на различных штаммах грибов АМ, в том числе и с целью поиска новых эффективных штаммов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2020-920 от 16.11.2020 о предоставлении гранта в виде субсидии из Федерального бюджета Российской Федерации. Грант предоставлен в рамках государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

## **Протеомные маркеры штаммов *Bacillus thuringiensis* обнаруживают связь с функциональными и эволюционными характеристиками штаммов, но не с их серологической классификацией**

Маловичко Ю. В.<sup>1,2</sup>, Шиков А. Е.<sup>1,2</sup>, Лобов А. А.<sup>2,3</sup>, Белоусова М. Е.<sup>1</sup>, Нижников А. А.<sup>1,2</sup>,  
Антонец К.С.<sup>1,2</sup>

1 Лаборатория протеомики надорганизменных систем, ВНИИСХМ РАН, Санкт-Петербург,  
Россия

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

3 Лаборатория регенеративной биомедицины, ЦИН РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: yu.malovichko@arriam.ru*

*Bacillus thuringiensis* (сокращенно *Bt*) – грамположительная спорообразующая бактерия, обладающая высокоспецифичными энтомоцидными свойствами и использующая в сельском хозяйстве в качестве экологичной альтернативы традиционным химическим пестицидам.

Внутривидовая систематика данного вида, используемая в прикладных исследованиях и сельскохозяйственной практике, основывается на процедуре серотипирования штаммов на основании структуры флагеллин-подобных белковых компонентов жгутика. Релевантность данной системы и ее соответствие естественной эволюционной истории комплекса штаммов *Bt* все чаще ставится под сомнение в свете новых работ в области филогенетики и сравнительной геномики. В связи с этим особый интерес представляет вопрос о существовании генетических и протеомных детерминант, ассоциированных с устоявшимися серотипами и подтверждающими их таксономическую целостность. В настоящей работе мажорная фракция протеома четырех штаммов *Bt* из микробиологической коллекции ВНИИСХМ РАН, относящихся к трем коммерчески востребованным серотипам, была проанализирована на предмет наличия специфических детерминант, однозначно маркирующих данные серотипы. Тотальный протеом вегетативных и спорующих культур выбранных штаммов был проанализирован при помощи двумерного флуоресцентного гель-электрофореза в полиакриламидном геле (2D-DIGE) с дальнейшим анализом состава дифференциальных точек при помощи жидкостной хроматографии- времяпролетной масс-спектрометрии. Суммарно в протеомных пробах был идентифицирован 21 белок без четкой ассоциации с исследуемыми серотипами. Дальнейший анализ геномов *Bt* с заявленной серотипической принадлежностью из базы NCBI Assembly выявил, что из обнаруженных белков 15 кодируются общими для вида генами, в то время как гены шести оставшихся распределены между геномами вне зависимости от серотипа. Филогенетический анализ исследуемых генов показал схожесть между реконструкциями индивидуальной эволюционной истории генов факторов вирулентности и корового компонента видового пангенома, но также не выявил ассоциации с серотипическими категориями. Полученные данные свидетельствуют о том, что принятая серотипическая классификация штаммов *Bt* не отражает не только эволюционной истории вида, но и функциональных свойств штаммов, подчеркивая важность привлечения современных геномных методов для более адекватной классификации и характеристики новых штаммов.

Работа была выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-316-70020).

**Изменение внутри- и внеклеточной концентрации ионов  $H^+$  в листьях ячменя, индуцированное салицилатом и грибным заражением**

Пашкевич Л.В., Довбнюк Ю.Н., Кабашникова Л.Ф.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

E-mail: [Ljubi.k87@gmail.com](mailto:Ljubi.k87@gmail.com)

Информативность быстрой реакции растений на мембранном уровне, отражающей сигнальную роль стрессора при формировании механизмов защиты, не вызывает сомнений. Изучено действие экзогенного салицилата и грибного патогена на концентрацию ионов  $H^+$  в апопласте и цитозоле мезофилла ячменя, что имеет важное значение для понимания механизмов прайминга защитных реакций при патогенезе.

Объектом исследования служили первые листья проростков ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Магутны. Проростки обрабатывали салициловой кислотой (СК,  $10^{-4}$  М) в 4-дневном возрасте, а через 24 ч взвесью спор ( $10^6$  спор/мл) гриба *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. Анализ флуоресцентных параметров проводили в течение 3 суток после воздействия патогена на спектрофлуориметре СОЛАР СМ-2203 (Беларусь), используя рН-зависимые флуоресцентные зонды FITC-декстран и пиранин, позволяющие определить изменение рН вне и внутри клетки, соответственно. Анализ рН апопласта в листьях ячменя, проведенный с учетом рН-зависимого отношения двух пиков флуоресценции зонда FITC-декстрана (I520/I555) при  $\lambda_{\text{возб}} 465$  нм, показал, что экзогенный салицилат вызывал обратимое защелачивание апопласта в среднем на 0,5 единиц рН относительно контроля (рН=5,08-5,13) в здоровых и инфицированных листьях. Эффект регистрировали в течение первых 48 ч после инфицирования, тогда как без СК повышение рН апопласта на 0,4 единиц отмечено через 72 ч с момента инокуляции. Более раннее защелачивание апопласта способствует экспорту эндогенной СК в апопласт в местах проникновения патогена.

Изменение рН-зависимого параметра флуоресценции пиранина, отражающего величину отношения интенсивностей флуоресценции в максимуме испускания (520 нм), возбуждаемой при двух длинах волн 404 и 456 нм, после применения экзогенного салицилата отражало высокий темп закисления цитозольной среды уже через 24 ч после грибного заражения в сравнении с контролем. Такое закисление цитоплазмы под действием экзогенного салицилата является проявлением неспецифического иммунного ответа, связанного с ингибированием протонной помпы на плазмалемме.

Таким образом, сдвиги вне- и внутриклеточной рН под влиянием экзогенного салицилата могут играть ключевую роль в развитии иммунного ответа с участием эндогенной СК при инфицировании *Bipolaris sorokiniana* в растениях ячменя.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ, грант №Б20М-091.

## Гены *CLE*, регулирующие развитие симбиотических клубеньков у гороха посевного

Садикова Д.С., Лебедева М.А., Лутова Л.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург,  
Россия

E-mail: [darinasadikova@yandex.ru](mailto:darinasadikova@yandex.ru)

Бобовые растения способны вступать в симбиоз с азотфиксирующими бактериями ризобиями, в результате чего происходит формирование новых органов на корнях бобовых растений – симбиотических клубеньков. В симбиотических клубеньках с участием ризобий происходит фиксация молекулярного азота и его включение в состав органических соединений. Количество образующихся симбиотических клубеньков регулируется растением на системном уровне с помощью механизма обратной связи, известного как авторегуляция клубенькообразования (АРК). Ключевыми участниками АРК являются пептиды *CLE*, мобильные сигнальные молекулы, которые продуцируются в корне в ответ на инокуляцию ризобиями и перемещаются в побег. В побеге, в клетках флоэмы листа, пептиды *CLE* узнаются рецепторным комплексом, включающим CLV1- подобную киназу, в результате чего, запускается сигнальный каскад, приводящий к дальнейшему подавлению развития клубеньков. Кроме того, у ряда бобовых растений были выявлены гены *CLE*, активируемые при обработке нитратом, сверхэкспрессия которых подавляла развитие клубеньков, то есть кодируемые этими генами пептиды *CLE* опосредуют нитрат-зависимое подавление клубенькообразование. У гороха гены *CLE*, задействованные в АРК, оставались не охарактеризованными. В нашей работе мы проанализировали четыре гена *CLE* у *Pisum sativum*, которые являются близкими гомологами подавляющими развитие клубеньков генов *CLE* у других бобовых. Было оценено влияние нитрата на экспрессию этих генов. Анализ экспрессии этих четырех генов *CLE* на разных стадиях развития клубеньков у *P. sativum* показал, что эти гены активируются при развитии клубеньков. Мы разработали конструкции для сверхэкспрессии генов *PsCLE12* и *PsCLE13* и получили растения с трансгенными корнями, с повышенным уровнем экспрессии этих генов. Согласно нашим данным, сверхэкспрессия специфичного для клубеньков гена *PsCLE12* не подавляет образование клубеньков на трансгенных корнях, тогда как сверхэкспрессия *PsCLE13* снижает количество клубеньков. Таким образом, функции этих двух генов различаются, и в дальнейшем будет проведена работа по изучению механизма их действия на развитие клубеньков гороха.

Данная работа выполняется при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения №075-15-2020-922 от 16.11.2020 на создание и развитие Научного центра мирового уровня “Агротехнологии будущего”.



**Особенности ионного баланса** корневого клубенька  
***Medicago truncatula*** в условиях длительного солевого стресса

Трифонова Н.А., Королева М.И., Федорова Е.Э.

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

E-mail: [natali.flow@yandex.ru](mailto:natali.flow@yandex.ru)

Корневые клубеньки чувствительны к солевому стрессу, который отрицательно влияет на образование клубеньков и азотфиксирующую активность (Tsyganov et al., 2007, Rubio et al., 2020). Мы предполагаем, что низкая устойчивость клубеньков может быть связана с изменениями гомеостаза ионов  $Na^+$  /  $H^+$  в инфицированной зоне клубенька, что приводит к дефектам в поддержании ионного баланса.

Клетки инфицированной зоны клубенька отличаются от неинфицированных клеток корня коротким сроком жизни, и другими биологическими особенностями, такими как изменение эндомембранной системы, гипоксическая среда и сверхэкспрессия некоторых белков (Ivanov et al., 2012).

В связи со сложностью системы транспорта ионов в клетках клубенька, которая определяется как растением-хозяином, так и микросимбионтом, комплексная модель транспорта и гомеостаза  $Na^+$  и  $K^+$  в инфицированных клетках корневых клубеньков пока не разработана.

Целью данной работы являлось исследование распределения ионов в клубеньке в условиях солевого стресса и анализ экспрессии генов ионных переносчиков и транскрипционных факторов в условиях 14-дневного солевого стресса.

На начальных этапах работы был проведен предварительный анализ экспрессии  $Na^+$  /  $H^+$  переносчиков и транскрипционных факторов растения-хозяина и микросимбионта в ткани корневого клубенька *Medicago truncatula* в доступных базах данных и выделены гены инфицированной зоны, которые могут быть задействованы в процессе защиты от солевого стресса. В дальнейшем уровень экспрессии выбранных генов измерен методом *qPCR* в контрольных клубеньках и в клубеньках растений после солевого стресса.

Отмечена динамика экспрессии  $Na^+$  /  $H^+$  антипортеров и транскрипционных факторов в корневых клубеньках при длительном солевом стрессе.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-04-00570А).

1. Ivanov, S., Fedorova, E. E., Limpens, E., De Mita, S., Genre, A., Bonfante, P., Bisseling, T. (2012). Rhizobium–legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(21), 8316-8321.
2. Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Horie, T., Shabala, S. (2020). Doing ‘business as usual’ comes with a cost: evaluating energy cost of maintaining plant intracellular  $K^+$  homeostasis under saline conditions. *New Phytologist*, 225(3), 1097-1104.
3. Tsyganov, V. E., Belimov, A. A., Borisov, A. Y., Safronova, V. I., Georgi, M., Dietz, K. J., Tikhonovich, I. A. (2007). A chemically induced new pea (*Pisum sativum*) mutant *SGECD<sup>t</sup>* with increased tolerance to, and accumulation of, cadmium. *Annals of Botany*, 99(2), 227-237.



**Оценка влияния развития арбускулярной микоризы на экспрессию генов аквапоринов у *Medicago lupulina***

Филатов П.В.<sup>1</sup>, Калинина А.А.<sup>1</sup>, Крюков А.А.<sup>2</sup>, Аронова Е.Б.<sup>1</sup>,  
Юрков А.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт  
сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: [filat200022@gmail.com](mailto:filat200022@gmail.com)*

В результате исследований последних лет показано, что грибы арбускулярной микоризы (АМ) имеют значимую роль в устойчивости растений к засухе и засолению за счет снабжения растения водой. Грибы АМ могут выполнять функцию дополнительной корневой системы растения. Одновременно, контроль использования воды растениями имеет решающее значение для выживания и продуктивности. Это достигается не в последнюю очередь за счет эффективного поглощения и ограничения потерь влаги с помощью работы аквапоринов. Подавление экспрессии генов аквапоринов в растениях приводит к снижению гидравлической проводимости и снижению интенсивности фотосинтеза в листьях. Снижение фотосинтеза ограничивает возможности растения по поддержанию симбиотических отношений с грибами АМ в плане снабжения грибов сахарами и жирными кислотами. В настоящее время связь между вспомогательной функцией грибов АМ и работой аквапоринов растения не ясна. Исследования на эту тему проводятся. Поиск генов в пяти семействах аквапоринов (NIP, XIP, SIP, TIP, PIP) активных в АМ-симбиозе, оценка динамики их экспрессии в процессе онтогенеза растения-хозяина при формировании и развитии эффективного АМ-симбиоза могут в перспективе (такие исследования планируются авторами) пролить свет на ключевые механизмы развития эффективной АМ в условиях засухи или засоления.

В рамках настоящей работы проводится оригинальное исследование, включающее оценку изменений в уровне экспрессии генов аквапоринов при развитии и отсутствии симбиоза *M. lupulina* с *R. irregularis* в различные фазы развития растения-хозяина.

Научные исследования проводятся при поддержке РФФИ №19-29-05275-МК, а также РФФИ №20-016-00245.

**Генотипы гороха по-разному реагирующие на комбинированную инокуляцию ризобиями и арбускулярными микоризными грибами в контексте развития семян и связанных с этим метаболических сдвигов.**

Черевацкая Мария Александровна<sup>1</sup>, Штарк Оксана Юрьевна<sup>2</sup>, Билова Татьяна Евгеньевна<sup>1</sup>, Кисель Элана Вадимовна<sup>4</sup>, Фролова Надежда Владимировна<sup>1</sup>, Романюк Дарья Андреевна<sup>2</sup>, Кулаева Ольга Алексеевна<sup>2</sup>, Вашурина Наталья Сергеевна<sup>3</sup>, Ринчинова Цыренцо Бадмаевна<sup>3</sup>, Сулима Антон Сергеевич<sup>2</sup>, Ахтемова Гульнара Асановна<sup>2</sup>, Фролов Андрей Александрович<sup>4</sup>, Жуков Владимир Александрович<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский Государственный Университет, кафедра физиологии и биохимии растений, Санкт-Петербург, Россия,

<sup>2</sup> Лаборатория генетики растительно-микробных взаимодействий, ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, г. Пушкин, Россия,

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский Государственный Университет, кафедра биохимии, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>4</sup> Лейбниц-Институт Биохимии Растений, департамент биоорганической химии, Галле/Заале, Германия;

*E-mail:* [maria.cherevatskaya@gmail.com](mailto:maria.cherevatskaya@gmail.com)

Горох (*Pisum sativum* L.) образует взаимовыгодные симбиозы с почвенными микроорганизмами, эффективность взаимодействия которых с полезными почвенными микроорганизмами (BSM, т.е. накопление биомассы семян и растений при инокуляции) зависит от генотипа растения. Проведенный ранее анализ связанных с генотипом различий в ответах протеома семян позволил выдвинуть гипотезу о том, что двойная инокуляция клубеньковыми бактериями и арбускулярными микоризными грибами (AMF) приводит к увеличению периода созревания семян у эффективного генотипа k-8274 по сравнению с низкоэффективным генотипом k-3358. Однако для понимания механизмов, лежащих в основе этого процесса, необходимо знание метаболического фона. Поэтому в данном исследовании мы рассматриваем различия в метаболическом ответе этих двух генотипов на комбинированную инокуляцию BSM. Таким образом, наша экспериментальная схема основывалась на инокуляции экспериментальных растений клубеньковыми бактериями или AMF по отдельности или в комбинации, а неинокулированные растения использовались в качестве контроля. Семена собирали на 15, 20, 25 и 30 день после опыления. Инокуляция AMF привела к задержке начала цветения и увеличению периода цветения гороха генотипа k-8274, в то время как у генотипа k-3358 наблюдалось ускорение начала цветения и сокращение периода созревания семян. Таким образом, первичные и вторичные семи-полярные метаболиты были проанализированы с помощью газовой хромато-масс-спектрометрией и высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрией, соответственно. Анализ выявил связанные с инокуляцией метаболические сдвиги, которые были более выражены у k-8274 по сравнению с генотипом k-3358. Направление метаболических изменений, связанных с инокуляцией, было различным для генотипов k-8274 и k-3358. Этот эффект был более выражен для вторичного метаболома. Таким образом, эти два генотипа гороха по-разному реагировали на инокуляцию BSM как в отношении периода развития семян (в частности, формирования и созревания семян), так и метаболических изменений в семенах. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-16-00107.

## Предсказание амилоидогенных свойств С-терминальных участков трёхдоменных токсинов Cry

Шиков А.Е.<sup>1,2</sup>, Маловичко Ю.В.<sup>1,2</sup>, Нижников А.А.<sup>1,2</sup>, Антоненц К.С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория протеомики надорганизменных систем, ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Россия, Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, Санкт-Петербург

E-mail: [a.shikov@arriam.ru](mailto:a.shikov@arriam.ru)

Трёхдоменные токсины Cry (3D Cry) представляют собой наиболее изученную группу инсектицидных токсинов, синтезируемых бактерией *Bacillus thuringiensis* (Bt) в составе кристаллических включений. Токсины Cry довольно консервативны в структурном отношении, обладая тремя функциональными доменами и фланкирующими их С- и N-терминальными участками. Оба эти региона протеолитически вырезаются, когда токсины попадают в кишечник поражаемых хозяев, однако показано, что они играют роль в обеспечении кристаллизации токсинов. Тем не менее, в настоящее время не охарактеризован механизм, с помощью терминальные участки способствуют кристаллизации, кроме того, структурное разнообразие этих регионов также остаётся практически не изученным. С этой целью нами были выявлены консервативные блоки в составе терминальных участков, а также был проведён биоинформатический скрининг этих блоков на предмет амилоидогенных свойств, которые потенциально могут регулировать процесс кристаллизации. Для анализа были получены последовательности токсинов Cry из доступных баз данных Genbank, NCBI assembly и международного реестра токсинов Bt номенклатуры. С помощью разработанного нами инструмента CryProcessor были получены координаты доменов, которые были использованы для вырезания С- и N-терминальных участков. Для выявления консервативных блоков в составе последовательностей нами был разработан новый подход, основанный на выявлении спектра к-меров, которые иерархически кластеризовали и реконструировали цепочки кластеров. Выявленные цепочки к-меров дедулицировали с помощью программы CD-НПТ. В результате было получено 204 блока в составе С-терминальных участков и 101 блок в N-терминальном регионе. Примечательно, что все С-терминальные последовательности разбивались на две группы на основании их длины. Кроме того, выявлена корреляция между количеством блоков и длиной С-терминального региона: длинные последовательности содержали от 3 до 5 блоков, тогда как короткие имели в составе 1-2 блока. В N-терминальных участках подобной закономерности выявлено не было. Для каждого уникального блока была рассчитана частота встречаемости, а также число амилоидогенных участков с применением алгоритмов SARP и Waltz. N- терминальные участки содержали небольшое количество амилоидогенных сайтов, предсказанных только алгоритмом Waltz, тогда как более половины последовательностей С-терминального региона имели два консервативных блока с многочисленными амилоидогенными сайтами, выявленными обоими алгоритмами. Согласно полученным результатам С-терминальный участок характеризуется большим структурным разнообразием с точки зрения общей длины участка и количества субдоменов. Кроме того, выявленные амилоидогенные сайты в составе консервативных блоков позволяют предположить, что С-терминальный регион осуществляет кристаллизацию токсинов посредством формирования локальных агрегатов.

Работа выполнена при поддержке РФФ 20-76-10044.

**Изменение протеома бактерий *Rhizobium leguminosarum* под влиянием экзогенных конечных продуктов глубокого гликирования.**

Шумилина Ю.С.<sup>1</sup>, Династия Е.М.<sup>1,2,3</sup>, Иллинг К.<sup>4</sup>, Царев А.А.<sup>1</sup>, Кузнецова А.В.<sup>1</sup>,  
Соболева А.В.<sup>1,2</sup>, Леонова Л.Е.<sup>1</sup>, Гришина Т.В.<sup>2</sup>, Васко Видал А.<sup>2</sup>, Зинц А.<sup>4</sup>,  
Вестерманн Б.<sup>2</sup>, Фролов А.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Кафедра Биохимии, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Институт биохимии растений им. Лейбница, Кафедра Биоорганической Химии, Халле, Германия

<sup>3</sup> Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

<sup>4</sup> Университет Мартина Лютера Галле-Виттенберг, Халле, Германия

E-mail: [schumilina.u@yandex.ru](mailto:schumilina.u@yandex.ru)

Бобовые растения – один из главных источников белка в рационе человека. Их урожайность зависит от многих факторов, однако ключевую роль играет успешность образования бобово-ризобияльного симбиоза. Также известно, что под действием абиотического стресса происходит накопление конечных продуктов глубокого гликирования (КПГГ) в растительных тканях. Не смотря на то, что влияние КПГГ на млекопитающих хорошо изучено, их эффекты на бактериальную и растительную клетку остаются неизвестными. Поэтому, с целью выявления механизмов, лежащих в основе этого, в данной работе были изучены эффекты экзогенных КПГГ на изменение протеома бактерий *Rhizobium leguminosarum*.

На первом этапе исследования были проведены тесты на цитотоксичность КПГГ для ризобий в концентрациях от 1 до 500 мкмоль/л. Полученные результаты показали, что все выбранные КПГГ оказались нетоксичными для ризобияльных бактерий. Также было обнаружено, что добавление 25 мкмоль/л КПГГ усиливало интенсивность роста бактериальной культуры в течение первых 5 часов. Параллельно, было установлено, что этот эффект связан с входжением продуктов гликирования в клетки, поскольку меченые флуоресцентной меткой КПГГ способны эффективно проникать в бактериальные клетки.

Для выявления сопутствующих изменений в протеоме бактерий, ризобии были проинкубированы с 25 мкмоль/л КПГГ в течение 0, 5 и 18 часов. Затем при помощи метода фенольной экстракции была выделена фракция тотального белка, измерена его концентрация и проведен его ограниченный протеолиз трипсином. Полученные триптические гидролизаты были исследованы при помощи нано-ESI-LIT-Orbitrap-MS (DDA). Результаты были проанализированы с помощью программного обеспечения ProteomeDiscoverer 2.1, Progenesis Q1, STRING. Сравнение протеомов ризобий, инкубированных в присутствии и отсутствии КПГГ, выявило снижение относительного содержания белков, участвующих в транскрипции, трансляции и энергетическом метаболизме в экспериментальных образцах. Кроме того, было установлено, что добавление КПГГ приводило к ускорению перехода ризобияльной культуры к линейной фазе роста, что свидетельствует о том, что КПГГ могут являться сигнальными молекулами для ризобий.

Работа выполнена при поддержке РФФ № 20-16-00086.

## ТЕЗИСЫ ЗАОЧНЫХ УЧАСТНИКОВ И СЛУШАТЕЛЕЙ

### Рекомбинация – механизм адаптивной эволюции токсинов Cry бактерий *Bacillus thuringiensis*

Антонец К.С.<sup>1,2</sup>, Шиков А.Е.<sup>1,2</sup>, Маловичко Ю.В.<sup>1,2</sup>, Нижников А.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория протеомики надорганизменных систем, ФГБНУ ВНИИСХМ,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: [k.antonets@arriam.ru](mailto:k.antonets@arriam.ru)

Спорообразующие энтомопатогенные бактерии *Bacillus thuringiensis* продуцируют ряд факторов, которые позволяют им поражать насекомых, при этом каждый штамм продуцирует свой набор таких молекул, эффективных в отношении строго определенного круга видов. Одними из ключевых компонентов арсенала этих бактерий являются белковые токсины Cry, и в особенности подкласс – трехдоменные токсины, или 3D Cry. Эти белки во многом обеспечивают специфичность действия штаммов *B. thuringiensis* в отношении различных групп членистоногих. С помощью ранее разработанной нами программы CryProcessor [1], размещенной в открытом доступе по адресу [https://lab7.arriam.ru/tools/cry\\_processor/](https://lab7.arriam.ru/tools/cry_processor/), мы выявили последовательности трехдоменных токсинов Cry среди всех белковых последовательностей, депонированных в публичных базах данных. Эти последовательности были использованы для выявления сайтов рекомбинации между генами, кодирующими разные токсины. Нами было выявлено что примерно каждый пятый токсин среди известных в настоящий момент последовательностей претерпел событие рекомбинации. При этом участки обмена затрагивали все три домена. Кроме того, некоторые события приводили к расширению спектра специфичности в отношении вида хозяина, а также были подвержены давлению эволюционного отбора. В результате проведенного исследования нами впервые были получены данные, свидетельствующие, что рекомбинация может являться одним из важных механизмов формирования разнообразия токсинов Cry и способствовать их адаптации к новым группам насекомых.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ 20-76-10044.

1. Shikov, A.E.; Malovichko, Y.V.; Skitchenko, R.K.; Nizhnikov, A.A.; Antonets, K.S. No More Tears: Mining Sequencing Data for Novel Bt Cry Toxins with CryProcessor. *Toxins* 2020, 12, 204. <https://doi.org/10.3390/toxins12030204>

## Развитие арбускулярной микоризы у 3 видов трав в ходе восстановительной сукцессии

Горбунова А.О.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,

Санкт-Петербург, Россия

E-mail: [gorbunova.anastasia93@mail.ru](mailto:gorbunova.anastasia93@mail.ru)

Более 90% семейств сосудистых растений формируют арбускулярную микоризу (АМ) с грибами отдела Glomeromycota. АМ может влиять как на рост и конкурентоспособность отдельных особей растений, так и на биоразнообразие и продуктивность всего растительного сообщества. В данном исследовании проанализировано развитие микоризации корней 3 видов травянистых растений (*Agrostis capillaris*, *Chamaenerion angustifolium*, *Deschampsia cespitosa*) в растительных сообществах, формирующихся на 2 зарастающих песчаных карьерах Ленинградской области. Цель – анализ соотношения симбиотических, запасающих и проводящих структур арбускулярно-микоризных грибов у данных видов в ряду сообществ восстановительной сукцессии. При подготовке микропрепаратов микоризованных корней пользовались методикой мацерации и окрашивания корней растений в трипановом синем (Phillips, Hayman, 1970). Для расчета показателей микоризации использовали общепринятый метод световой микроскопии, предложенный А. Травло с соавт. (Trouvelot et al., 1986). После расчета обилия арбускул (%) и обилия везикул (%) были оценены индексы развития арбускул и везикул, то есть отношения обилия этих структур в микоризованной части корня к обилию мицелия. В большинстве сообществ ранней стадии зарастания у исследованных видов растений развивается симбиотически активная арбускулярная микориза. Понижение индексов развития арбускул у растений наблюдалось в большинстве сообществ поздних сукцессионных стадий. В большинстве сообществ промежуточной злаковой стадии выявлены промежуточные значения индексов. *Agrostis capillaris* и *Deschampsia cespitosa* характеризовались более стабильным обилием арбускул в сукцессионном ряду сообществ, у *Agrostis capillaris* наблюдалось наименьшее обилие везикул. *Chamaenerion angustifolium* показал наибольший разброс обилия арбускул в сукцессионном ряду сообществ и наибольшее обилие везикул среди исследованных видов. Полученные данные дают основания полагать, что в ходе восстановительной сукцессии на песчаных карьерах происходит все более сбалансированное развитие симбиотических структур АМ (арбускул, везикул и внутрикорневого мицелия) у анализируемых растений, однако оно не обязательно приводит к более взаимовыгодному симбиозу на последних стадиях развития экосистем.

### Список литературы:

Phillips J.M., Hayman D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection // Transact. British Mycor. Soc. 1970. V. 55. P. 158–161.

Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes ayant une signification fonctionnelle. / In: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae. Eds. Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. Paris: INRA-Press. 1986. P. 217-221.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15- 2020-920 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

УДК 579.8: 577.29.

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ-АГЕНТОВ БИОПРЕПАРАТОВ

Грицевич К.С., Абдурашитов С.Ф.

ФГБУН НИИСХ Крыма

*kirill-gricevich@mail.ru*

Биоагенты микробных препаратов *Agrobacterium radiobacter* 204, *Paenibacillus polymyxa* П, *Lellilottia nimipressuralis* 32-3 из Крымской коллекции микроорганизмов (УНУ № 507484) применяются в экологически устойчивом земледелии в качестве предпосевной обработки семян. Методы молекулярной идентификации по гену 16S рРНК позволяют точно определить видовую принадлежность изучаемых штаммов, а по нуклеотидной последовательности межгенного региона рибосомального оперона (IGS) – штаммовое различие. Цель исследований: подтвердить таксономическую принадлежность штаммов *A. radiobacter* 204, *P. polymyxa* П, *L. nimipressuralis* 32-3 для дальнейших молекулярно-биологических исследований.

Для проведения исследований ДНК выделяли из чистых культур изучаемых штаммов микроорганизмов. Полученную ДНК-матрицу использовали в ПЦР с универсальными праймерами FD1 и RD1 для гена 16S рРНК и FGP<sub>s</sub>\_1490-72 и FGPI\_132 – IGS-региона. Выделенные ПЦР-продукты секвенировали и сравнивали с базой данных GenBank NCBI.

В результате нуклеотидные последовательности 16S рРНК штаммов *A. radiobacter* 204 (MW785883) и *P. polymyxa* П (MW785885) гомологичны *A. tumefaciens* (MT124567.1) и *P. polymyxa* (MT378521.1) из GenBank NCBI в соответствии с уровнем гомологии 99,3–100,0 %, что подтверждает ранее присвоенную номенклатуру по биохимическим признакам. Идентификация штамма *L. Nimipressuralis* 32-3 (MW785884) показала, что ближайшим гомологом из GenBank является *L. amnigena* (LT899947.1) с идентичностью 99,3 %. Это не соответствует ранее полученным данным в связи с постоянным пополнением базы данных.

В свою очередь, анализ сиквенсов IGS-участка штаммов 204 и 32-3 показал высокую штаммоспецифичность по гомологии (85,7–97,7 % при покрытии 89–97 %) с максимально близкими 10 последовательностями из GenBank. Секвенирование того же региона штамма *P. polymyxa* П выявило наличие несколько рибосомальных оперонов, отличающихся между собой по первичной структуре, что подтверждается доступными в базе данных полными геномами этого вида бактерий. Следовательно, идентификация по участку 16S – 23S рибосомального оперона не представляется возможной.

Таким образом, проведена генетическая идентификация *A. radiobacter* 204, *P. polymyxa* П, *Lellilottia sp.* 32-3, выявлена особенность IGS участка *P. polymyxa* П и невозможность его прямого секвенирования.

Работа выполнена в рамках государственного задания 0562-2019-0001



**Rhizobial microsymbionts of the narrowly endemic *Oxytropis* species growing in Kamchatka possess a set of genes that are associated with T3SS and T6SS secretion systems and can affect the development of symbiosis**

Guro P.<sup>1</sup>, Safronova V.<sup>1</sup>, Sazanova A.<sup>1</sup>, Kuznetsova I.<sup>1</sup>, Belimov A.<sup>1</sup>, Yakubov V.<sup>2</sup>, Chirak E.<sup>1</sup>, Afonin A.<sup>1</sup>, Andronov E.<sup>1</sup>, Tikhonovich I.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology (ARRIAM), St.- Petersburg

<sup>2</sup> Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of the RAS, Vladivostok

<sup>3</sup> Saint Petersburg State University, Department of Genetics and Biotechnology, St.-Petersburg

*Email: polinaguro@gmail.com*

From the root nodules of the narrowly endemic legume species *Oxytropis erecta*, *O. anadyrensis*, *O. kamtschatica* and *O. pumilio* growing on the Kamchatka Peninsula (Russian Federation) was obtained a collection of rhizobial strains. Analysis of the 16S rRNA gene sequence showed a significant diversity of isolates belonging to the families *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*), *Phyllobacteriaceae* (*Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*) and *Bradyrhizobiaceae* (*Bosea*, *Tardiphaga*). Pairs of taxonomically different strains in various combinations were isolated from some nodules of *Oxytropis* plants. Plant nodulation assays showed that only strains belonging to the genus *Mesorhizobium* (*M. jarvisii*, *M. loti* and *M. huakuii*) could form nitrogen-fixing nodules. The nitrogen-fixing activity of the strains was more associated with the host plant than with the species of strains. The whole genome sequences analysis showed that the strains *M. loti* 582 and *M. huakuii* 583 possessed symbiotic genes necessary for the formation of effective symbiosis and grouped into Sym-clusters. In contrast, the strain *T. robiniae* 581 had only a reduced number of *fix* genes, while the strains *Phyllobacterium* sp. 628 and *R. lusitanum* 629 possessed only individual symbiotic genes, which obviously did not participate in the formation of nodules. It was also stated that the strains *M. loti* 582 and *M. huakuii* 583 had a significant set of genes related to the secretion systems T3SS and T6SS that can affect the host specificity of strains. These two strains formed nodules of several types (typical elongated and atypical rounded) on *Oxytropis* plants. We suggest that a possible cause of the observed phenomenon is the availability of different nodulation strategies in these strains (dependent and independent of Nod-factors). Thus, as a result of studying the collection of strains isolated from the narrow endemic species of Kamchatka *Oxytropis*, interesting objects were selected to study the functions of the T3SS and T6SS genes, and their role in the development of rhizobia-legume symbiosis.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant 16-16-00080 for microbiology, molecular work and pot experiments, and grant 17-14-01363 for bioinformatics work).

**Анализ роли механочувствительности ризобактерий рода *Azospirillum* при адаптации к существованию в динамичной почвенной среде и в ассоциации с растениями**

Евстигнеева С.С., Телешева Е.М., Мокеев Д.И., Борисов И.В., Волохина И.В., Петрова Л.П., Шелудько А.В.

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

*E-mail:* [Stels20295@yandex.ru](mailto:Stels20295@yandex.ru)

Почвенные бактерии рода *Azospirillum*, используемые в качестве биоудобрений, оказывают положительное влияние на рост растений и их устойчивость к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам. Типовые штаммы *A. brasilense* Sp7 и *A. baldaniorum* Sp245 являются модельными в исследованиях приспособления азоспирилл к существованию в ассоциации с растениями. Данные бактерии отвечают на смену плотности среды изменениями характера жгутикования (синтез полярного [Fla] или латеральных [Laf] жгутиков) и образа жизни (образование колоний и биопленок). Fla ответственен за передвижение клеток в жидких средах, тогда как многочисленные Laf необходимы для роения, т.е. зависящего от жгутиков коллективного распространения бактерий по влажным поверхностям. При повышении плотности среды или при переходе микробной популяции к биопленочному существованию клетки азоспирилл также могут удлиняться и изменять ультраструктуру. На сегодняшний день механизмы восприятия механических сигналов у азоспирилл исследованы фрагментарно. В частности, не изучена роль систем механотрансдукции при адаптации этих бактерий к существованию в динамичной почвенной среде и в ассоциации с растениями. Целью данной работы являлось исследование роли предполагаемой мультисенсорной гибридной гистидинкиназы–регулятора ответа (HSHK–RR) и компонента FlhB системы сборки Fla, кодируемых у Sp7 и Sp245 смежными хромосомными генами, в механосенсинге и механотрансдукции. Ранее были отобраны спонтанные производные штамма Sp7 с изменениями в структуре генома и получены производные штамма Sp245 и его Fla<sup>–</sup>Laf<sup>–</sup> мутанта Sp245.1063 (*flhB1::Omega-Km*) с увеличенной дозой HSHK–RR. Оказалось, что вариации в структуре генома, мутация в гене, кодирующем белок FlhB, или увеличение числа копий гена, кодирующего HSHK–RR, влияют на подвижность, ультраструктуру клеток, динамику изменения размера бактерий при смене механических свойств среды. Были получены флуоресцентно-меченные производные исследованных штаммов азоспирилл, разработаны методические подходы для изучения процесса формирования и архитектуры биопленок в условиях, различающихся по доступности воды, в том числе *in planta* и в почве.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 20-04-00006\_a).

## **Does plant diversity determine the diversity of the rhizosphere microbial community?**

Zverev A. O.<sup>1</sup>, Shapkin V.M.<sup>1</sup>, Kichko A. A.<sup>1</sup>, Andronov E.E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ARRIAM Podbelsky chausse 3, Saint-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia

*E-mail: [azver.bio@gmail.com](mailto:azver.bio@gmail.com)*

The rhizosphere community represents an “ecological interface” between plant and soil, providing the plant with a number of advantages. Close connection and mutual influence in this communication allow to talk about the self-adjusting “plant-rhizosphere community” system, which should be studied in connection. Diversity estimation is one of the ways of describing both bacterial and plant communities. Based on the literature, there are two assumptions of how the diversity of plant communities related to the diversity of bacterial communities: 1) an increase in the species richness of plants leads to an increase in the number of available micro-niches, and increase microbial diversity, 2) an increase in the species richness of plants is accompanied by the predominant development of bacteria from highly productive specific taxa, and decrease the diversity of microorganisms. Experimental studies show controversial results.

We analyzed field sites (rye crop field and two fallow sites), using DNA isolation of both the plant root mass (followed by sequencing of the ITS1 region) and rhizosphere microorganisms (followed by sequencing of the 16s rDNA V4 region). This allowed us to 1) accurately determine the abundance and taxonomic position of plant communities; 2) extract information about both plant and microbial communities from the same sample; 3) analyze plant diversity using the same NGS approaches as used for the rhizosphere community of microorganisms.

There was no correlation between alpha-diversity indices of plants and rhizosphere communities. Alpha-diversity connection should be explored in similar plant communities, such as synusia. Significant differences in plant abundances lead to significant changes in exudation profiles, different microbial responses, and the loss of diversity connection. The beta-diversity between rhizosphere communities and plant communities is highly correlated, in particular in terms of the abundance of taxa. This can be explained by a potential correlation (as reported in the literature) or by the presence of statistical artifacts. In future studies, the diversity connection should be analyzed by searching for functionally related genetic regions of plants and soil microorganisms.

This research is supported by the world-class scientific center "Agrotechnologies of the Future" with funding from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, agreement No. 075-15-2020-920.

**Генетические особенности бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* – симбионтов реликтового бобового *Vavilovia formosa***

Кимеклис А.К.<sup>1,2,\*</sup>, Сафронова В.И.<sup>1</sup>, Белимов А.А.<sup>1</sup>, Онищук О.П.<sup>1</sup>, Курчак О.Н.<sup>1</sup>, Аксёнова Т.С.<sup>1</sup>, Пинаев А.Г.<sup>1</sup>, Андронов Е.Е.<sup>1,2,3</sup>, Проворов Н.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ ВНИИСХМ, Пушкин, Россия

<sup>2</sup>СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Почвенный институт имени В. В. Докучаева РАН, Москва, Россия

*E-mail:* [kimeklis@gmail.com](mailto:kimeklis@gmail.com)

Объектом исследования являются штаммы ризобий, выделенные из клубеньков реликтового бобового растения *Vavilovia formosa*. Это бобовое растение является эндемиком Кавказских гор и ближнего востока, в данный момент находится под угрозой исчезновения, но самое главное, что его считают наиболее близким родственным видом к общему предку трибы *Fabeae* [1]. Ранее мы показали, что большая часть штаммов наиболее близка к виду *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, но при этом, на основании анализа нуклеотидных последовательностей симбиотических генов, она выделяется в отдельную группу внутри этого биовара. Второй особенностью этих штаммов является строение симбиотического региона, в частности, наличие гена *nodX*. Показано, что симбиозы с бобовыми растениями, а именно горохами «афганской» группы, образуемые при участии этого гена, являются температурочувствительными. В данной работе мы более подробно исследуем фенотипические признаки опытных штаммов, а также проверяем их симбиотическую активность при разных температурных режимах на разных растениях-хозяевах, чтобы узнать, насколько схожи симбиотические системы вавилонии прекрасной и афганского гороха. Полученные результаты позволят более подробно изучить эволюционную историю бобово-ризобияльного симбиоза в группе *Fabeae* – *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

[1] Mikić A., Smýkal P., Kenicer G. et. al. The bicentenary of the research on ‘beautiful’ vavilovia (*Vavilovia formosa*), a legume crop wild relative with taxonomic and agronomic potential. // 2013, Bot J Linn Soc, V.172, P.524-531.

Данная работа была выполнена при поддержке грантом РФФИ №19-16-00081.

### Microiome structure of the buried soil shifts to the structure of mineral horizons

A.A. Kichko<sup>1,2\*</sup>, E.A. Ivanova<sup>1,3</sup>, T.I. Chernov<sup>3</sup>, A.K. Kimeklis<sup>1,2</sup>, E.S. Karasev<sup>2</sup>, O.V. Orlova<sup>2</sup>,  
M.D. Kalmenov<sup>4</sup>, N.A. Provorov<sup>1</sup>, E.E. Andronov<sup>1,2,3</sup>, N.K. Sergaliev<sup>4</sup>

<sup>1</sup> All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg Russia

<sup>2</sup> Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Dokuchaev Soil Science Institute, Moscow, Russia

<sup>4</sup> West Kazakhstan Innovation and Technology University, Uralsk, Kazakhstan

*E-mail: [2014arki@gmail.com](mailto:2014arki@gmail.com)*

Burial mounds represent a challenge for microbiologists. Could the ancient buried soils keep microbiome like archaeological artefacts? To address this question we studied the soil microbiome under a burial mound dating from 2500 years ago in West Kazakhstan. Two soil profile cuts were established: one under the burial mound and another adjacent to the mound surface steppe soil. Both of the soils represent the same dark chestnut soil type and horizontal stratification (A, B, C horizons) with slight alterations. DNA samples isolated from all horizons were studied with molecular techniques including qPCR and high throughput sequencing of amplicon libraries of the 16S rRNA gene fragment. Taxonomic structure of surface and buried horizons demonstrates deep divergence of the buried microbiome from the surface, comparable with the difference between different soil types (representatives of the soil types were included in the survey). The main feature of this divergence can be attributed to diagenetic processes characterised by the reduction of organic matter content and changes in its structure. Corresponding trends in microbiome structure are obvious from the beta-diversity picture: the A and B horizons of the buried soils form one cluster with the C horizons of both buried and surface soil, and this trend could generally be designated as ‘mineralisation’. Statistically significant changes were detected in the number of phylogenetic clusters, the biology of which is in the line of diagenesis. The trend of ‘mineralization’ is also supported by PICRUST2 functional prediction, demonstrating the higher abundance of the processes of degradation in the burial metagenome. The main conclusion of the study is that there is little hope for the conservation of the ancient microbiomes under burial mounds; rather, the buried microbiomes live their own very specific lives in new circumstances, slowly exhausting organic matter and turning into inhabitants of mineral horizons.

**Keywords:** kurgan, burial mound, dark-chestnut soil, microbiome, high throughput sequencing, diagenesis, 16s rRNA

This research is supported by the world-class scientific center "Agrotechnologies of the Future" with funding from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, agreement No. 075-15-2020-920.

## Поиск и анализ последовательностей, сходных с *Rhizobium phage 16-3* в геномах *Sinorhizobium meliloti*

Козлова А.П.<sup>1</sup>, Мунтян В.С.<sup>1</sup>, Владимирова М.Е.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: alexsandrak95@mail.ru

Бактериофаги могут оказывать значительное влияние на популяции клубеньковых бактерий, например, снижая их титр в почве в результате лизиса. Однако бактериофаги могут встраиваться в геном бактерии-хозяина в виде профага, что способствует повышению устойчивости хозяина к гомоиммунным инфекциям или приводит к лизису бактерий в случае воздействия стрессовых факторов. Инфицирование клубеньковых бактерий наиболее часто происходит фагами, относящимися к семействам *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Myoviridae*. Умеренный *Rhizobium phage 16-3* штамма *S. meliloti* Rm41 - модельный бактериофаг *Sinorhizobium*, представитель *Siphoviridae*. Размер генома составляет 60,2 тпн и в нем выявлено 110 ОРС.

Цель данной работы заключалась в оценке распространенности фаговых последовательностей, родственных *Rhizobium phage 16-3*, в геномах штаммов *S. meliloti* из географически различных регионов. Анализ 48 геномов, представленных в базе данных NCBI, позволил выявить профаговые последовательности у 8 штаммов из Кавказского, Приаральского, Сибирского регионов, Марокко и Испании. Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что 6 из 8-ми профагов являлись интактными, а также выявлены неполный и дефектный профаги. Размер интактных последовательностей достигал 63 тпн. Размеры дефектного и неполного профагов составили 33,1 и 21,7 тпн. Количество ОРС, кодирующих белковые последовательности, в интактных профагах достигало 144, в дефектном и неполном 29 и 27 соответственно. В одном из интактных профагов некоторые гены представлены в виде нескольких копий. Анализ ОРС показал, что в профаговых последовательностях закодированы различные структурные элементы вириона, а ОРС, кодирующие белки хвоста, представлены во всех профагах. Вместе с тем, не выявлено ОРС, кодирующих бактериальные белки.

Таким образом, 17% проанализированных геномов содержали последовательности, сходные с *Rhizobium phage 16-3*. Полученные данные показывают, что данный фаг имеет широкое географическое распространение и участвует во внутривидовых рекомбинационных процессах.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ 20-16-00105.

## **Повышение эффективности технологий получения и хранения препаратов медленнорастущих видов клубеньковых бактерий**

Косульников Ю.В.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт  
сельскохозяйственной микробиологии»

196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского д.3

e-mail: [Kullavayn@gmail.com](mailto:Kullavayn@gmail.com)

**Ключевые слова:** ризобии, режим культивирования, бактериальная суспензия, тара, режим хранения

По данным Организации экономического сотрудничества и развития к 2030 г. с использованием биотехнологий будет выпускаться более 50% сельскохозяйственной продукции. К данному направлению относится широкий спектр продуктов, таких как биоконсерванты растительного сырья (силосные закваски), пищевые добавки для скота и птицы на основе микроорганизмов (пробиотики), биологические средства защиты растений (биопестициды) и микробные удобрения на основе ассоциативной и симбиотической микрофлоры (инокулянты). В Российской Федерации особое внимание уделяется разработке и производству инокулянтов для сои и люпина, так как во многих хозяйствах данные агрокультуры высеваются впервые и в почвах отсутствуют соответствующие виды микробных симбионтов.

Клубеньковые бактерии сои и люпина относятся к медленнорастущим видам ризобий (время от посева ферментера до выхода культуры на стационарную фазу роста составляет от 4 до 7 сут.), в связи с чем процесс их периодического культивирования характеризуется длительностью, трудоемкостью, повышенным риском контаминации и, соответственно, высокой себестоимостью получаемого биопрепарата. Высокая цена на препараты медленнорастущих видов ризобий ограничивает распространение данной группы инокулянтов среди сельхозтоваропроизводителей, что не позволяет в полной мере реализовать потенциал продуктивности сои и люпина. Нами было показано, что при промышленном культивировании медленнорастущих видов ризобий более эффективно использование отъемно-доливного (полупериодического) режима, который подразумевает периодический частичный (в объеме 50-75% от рабочего объема ферментера) отбор бактериальной суспензии в стационарной фазе роста клеток с последующим его возмещением соответствующим объемом свежей питательной среды и повторением производственного цикла. При прочих равных параметрах процесса отъемно-доливной режим культивирования ризобий сои и люпина является примерно в 3 раза более производительным, чем периодический режим. Кроме того, отъемно-доливной режим культивирования позволяет сделать нагрузку на разливочную линию более равномерной, так как при периодическом режиме необходимо полностью разливать содержимое ферментера при достижении клетками стационарной фазы роста, а при отъемно-доливном режиме культивирования объем ежедневного розлива является регулируемым параметром.

Так как производство препаратов ризобий является сезонным (основной объем потребления инокулянтов приходится на весеннюю посевную кампанию), препараты ризобий нарабатывают заблаговременно и закладывают на хранение на производственный склад, на котором препараты могут находиться до полугода перед их отправкой потребителю. Ризобии не способны образовывать защитную форму (спору, цисту и тд.) и, как следствие, их клетки характеризуются повышенной чувствительностью к многочисленным стрессам, которыми подвергаются бактерии в процессе хранения инокулянтов в складских условиях (недостаток кислорода в таре, перепад температур при хранении препаратов на неотопливаемых складах, накопление в среде токсичных продуктов бактериальной жизнедеятельности и тд.). Нами было показано, одним из главных факторов, определяющих жизнеспособность бактерий в процессе хранения препаратов, является



кислородный режим. При хранении инокулянтов в герметичной таре (пластиковые канистры с крышкой без клапана) титр бактерий сокращается с течением времени. Скорость падения титра зависит от объема оставленной в таре воздушной подушки – чем он больше, тем больше клеток остается жизнеспособными на конец срока годности препарата. Увеличение объема воздуха в герметичной таре с целью повысить жизнеспособность клеток является нерациональным, так как это увеличивает логистические издержки хранения и транспортировки препарата. Нами было показано, что эффективным способом обеспечения бактерий кислородом в процессе хранения препаратов является использование в качестве тары для инокулянта простерилизованного гамма-излучением двойного поливинилхлоридного пакета, поддерживающего герметичность, но, при этом – обеспечивающего непрерывный газообмен содержимого с окружающей средой. Спустя 6 мес. хранения инокулянтов в поливинилхлоридных пакетах титр ризобий сои был в 3 раза большим, а титр ризобий люпина в 6 раз большим, чем при хранении данных препаратов в герметичных пластиковых канистрах при прочих равных условиях.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-920 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

## **Иммунолокализация фитогормонов в симбиотических клубеньках гороха (*Pisum sativum* L.), подвергнутых действию теплового стресса**

Николаец Е.И.<sup>1</sup>; Китаева А.Б.<sup>2</sup>, Серова Т.А.<sup>2</sup>, Цыганов В.Е.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: The\_nikolaets@mail.ru*

Высокая температура является стрессовым фактором, оказывающим негативное воздействие на функционирование симбиотических клубеньков, активируя процесс их старения. Тем не менее механизмы, лежащие в основе негативного влияния, изучены недостаточно. В данном исследовании изучалась локализация некоторых фитогормонов в клубеньках гороха посевного (*Pisum sativum* L.), подвергнутых тепловому стрессу.

Трехнедельные растения гороха линии дикого типа SGE, инокулированные штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, были подвергнуты действию высокой температуры – 28 °С в течение 1, 5 и 9 суток. Иммунолокализация абсцизовой кислоты, 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоты (АЦК) и гибберелловой кислоты (ГАЗ) проводилась с использованием специфических антител и применением методов лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

Иммунолокализация выявила постепенное снижение уровня сигнала АБК с 1-х по 9-е сутки в клубеньках экспериментальной группы, подвергнутых действию высокой температуры, в то время как в контрольной группе уровень сигнала оставался неизменным.

Уровень сигнала, ассоциированный с АЦК, в клубеньках экспериментальной группы был выше по сравнению с контрольными через 1 сутки действия высокой температуры. Через 5 суток в клубеньках экспериментальной группы наблюдалось понижение уровня сигнала по сравнению с контрольной группой этого же срока. При этом уровень сигнала АЦК в клубеньках контрольной группы через 5 суток действия высокой температуры был ниже, чем через 1 сутки. Через 9 суток фиксировался максимальный уровень сигнала АЦК в клубеньках контрольной группы и минимальный – в клубеньках экспериментальной группы за все время эксперимента.

В клубеньках уровень сигнала, ассоциированный с ГАЗ, через 1 сутки в условиях высокой температуры повышался, по сравнению с контролем. Через 5 суток уровень сигнала в клубеньках в контрольной группе был выше, чем в экспериментальной группе. Через 9 суток уровень сигнала в клубеньках контрольной группы оставался неизменным, и был выше, чем в экспериментальной группе.

Таким образом, выявлена динамика локализации трех фитогормонов, которая показала необычный характер старения симбиотических клубеньков, индуцированного тепловым стрессом.

Работа поддержана грантом Российским научным фондом (21-16-00117).

**Симбиотрофные показатели растительно-микробных систем на основе хозяйственно-ценных видов люцерн и штаммов *Sinorhizobium meliloti*, содержащих разные аллели генов вирулентности**

Саксаганская А.С.<sup>1</sup>, Владимирова М.Е.<sup>1</sup>, Мунтян В.С.<sup>1</sup>, Румянцева М.Л.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

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

Эффективность симбиотического взаимодействия бобовых растений и клубеньковых бактерий (ризобий) находится под генетическим контролем макро- и микросимбионта. Целью исследования являлась оценка взаимосвязи аллельного полиморфизма симбиотически значимых генов ризобий с проявляемой ими хозяйской специфичностью и продуктивностью формируемых растительно-микробных систем. Объектами исследования являлись природные штаммы *Sinorhizobium meliloti*, контрастно различавшиеся по аллелям генов *nodABC/nodH*, детерминирующих синтез сигнальной молекулы Nod-фактора. Одна группа штаммов имела референс-аллели *nod* генов (генотип «А»), вторая группа – дивергентные аллели каждого из четырёх *nod* генов (генотип «D»). Штаммы из указанных групп испытывали в симбиозе с двумя видами растений-хозяев: диплоидный вид (*Medicago lupulina*) и тетраплоидный вид (*M. varia*) люцерны. Штаммы с генотипом «А» формировали клубеньки на корнях *M. lupulina* и *M. varia* на 13-й и 10-й дни после инокуляции, соответственно. Штаммы генотипа «D» образовывали клубеньки на корнях обоих видов растений достоверно раньше, на 8-й день после инокуляции. В симбиозе с растениями *M. lupulina* выявлены достоверные различия по общему количеству сформированных клубеньков на 20-ый день после инокуляции ( $P < 0.05$ ) между штаммами генотипов «D» и «А»; тенденция увеличения количества клубеньков штаммами обоих изучаемых генотипов сохранялась вплоть до 38 дня вегетации. В случае растений *M. varia* количество клубеньков, сформированных штаммами генотипа «D», было ниже таковых, образованных штаммами первой группы, на 25-й день, тогда как к 38 дню после инокуляции количество клубеньков было в 2 раза больше числа клубеньков, образованных штаммами генотипа «А». Симбиотические системы, сформированные штаммами из обеих групп с растениями *M. lupulina* и *M. varia*, были высокоэффективными; однако величина продуктивности растительно-микробных систем на основе растений *M. varia* и штаммов генотипа «D» была в 1.5 раза выше, что указывает на перспективность направленного отбора штаммов с определенными аллелями генов вирулентности.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2020-920 от 16.11.2020 о предоставлении гранта в виде субсидии из Федерального бюджета Российской Федерации. Грант предоставлен в рамках государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

## Взаимодействия между растением-хозяином и грибным патогеном, опосредованные абсцизовой кислотой

Сырова Д.С.<sup>1</sup>, Шапошников А.И.<sup>1</sup>, Белимов А.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: [syr\\_daria@ro.ru](mailto:syr_daria@ro.ru)

Абсцизовая кислота (АБК) – классический фитогормон, который задействован во многих физиологических процессах и в реакциях растений на биотический и абиотический стрессы. Фитопатогенные грибы тоже синтезируют АБК, но значение этого признака для взаимодействий с растениями-хозяевами малоизучена. Данная работа была направлена на изучение вирулентности АБК-продуцирующих штаммов фитопатогенных грибов по отношению к сельскохозяйственным культурам и включала подбор патосистемы с использованием стандартного биотеста, а также идентификацию используемых в работе грибных штаммов. На предыдущих этапах работы в ходе скрининга среди фитопатогенов на способность к продукции АБК были отобраны три грибных штамма, которые впоследствии были идентифицированы как *Botrytis cinerea* ВА3, *B. cinerea* 20-001 и *Fusarium oxysporum* MF-G58284. Наибольшее количество АБК в периодической культуре продуцировал штамм *B. cinerea* ВА3 – 4,1 мкг/мл, *B. cinerea* 20-001 синтезировал 0,1 мкг/мл АБК, штамм *F. oxysporum* MF-G58284 синтезировал наименьшее количество данного фитогормона – 0,004 мкг/мл. В качестве растений-хозяев были использованы пшеница, горох, подсолнечник, томат и ячмень. После стерилизации и проращивания семена выкладывали на чашки Петри со стерильными бумажными фильтрами и заражали суспензией спор грибов в конечной концентрации  $1 \times 10^5$  спор/мл. Известно, что *B. cinerea* – это некротрофный гриб с широким спектром растений-хозяев, который является продуцентом абсцизовой кислоты, по-видимому вовлеченной в растительно-микробные взаимодействия (2). *F. oxysporum* является широко распространенным почвенным гемибитрофным патогеном (1). По отношению к пшенице и гороху наибольшая вирулентность наблюдалась у штаммов *B. cinerea* 20-001 и *F. oxysporum* MF-G58284, а на томаты наибольший фитотоксический эффект оказывал штамм *F. oxysporum* MF-G58284. На ячмень наиболее ярко выраженный эффект оказывали штаммы *F. oxysporum* MF-G58284 и *B. cinerea* ВА3. Однако, при использовании подсолнечника в качестве растения-хозяина эффект оказывали все три штамма. Наиболее значимый фитотоксичный эффект оказывал штамм *B. cinerea* 20-001, по сравнению с *B. cinerea* ВА3. Оба штамма *B. cinerea* уступали штамму *F. oxysporum* MF-G58284 по фитопатогенности для пшеницы и томатов. Специфичность фитотоксичности по отношению к растениям-хозяевам не различалась между изучаемыми штаммами грибов. Кроме того, фитотоксичность патогенов по отношению к растениям-хозяевам не коррелировала с их способностью синтезировать АБК, что свидетельствует о сложности данного явления.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 17-14-01363).

1. Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2005. – Т. 43. – С. 205-227.
2. Siewers V., Smedsgaard J., Tudzynski P. The P450 monooxygenase BcABA1 is essential for abscisic acid biosynthesis in *Botrytis cinerea* // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2004. – Т. 70. – №. 7. – С. 3868-3876.

## Поиск симбиотических микроорганизмов гуара (*Cyamopsis tetragonoloba*) в почвах разного географического происхождения

Ульянич П.С.<sup>1</sup>, Сафронова В.И.<sup>1</sup>, Белимов А.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail:* p.ulianich@gmail.com

Гуар (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) – однолетнее травянистое растение семейства бобовых, преимущественно возделываемое в Индии и Пакистане. Растение является источником гуаровой камеди – полимерного соединения, содержащего остатки галактозы. Вещество хорошо растворимо в воде с образованием гелеобразной массы и является весьма эффективным эмульгатором и стабилизатором. Гуаровая камедь активно применяется в пищевой, текстильной, косметической и других промышленности. Однако наиболее важная область применения — это использование гуаровой камеди в нефте- и газодобывающей промышленности.

В основном гуаровая камедь являлась импортируемым продуктом, в то время как за последние несколько лет необходимость возделывания гуара на территории РФ резко выросла. Для успешной интродукции гуара необходимо создать условия для продуктивного роста культуры. Одним из таких условий является правильное использование микросимбионтов этой культуры. Необходимо изучить фундаментальные аспекты, такие как: географическое распространение микросимбионтов; биоразнообразие; гены, участвующие в образовании и функционировании симбиоза.

Ранее, в рамках проекта ФЦП на тему «Создание новых сортов гуара с использованием методов маркер-опосредованной селекции для импортозамещения в нефтяной, газовой и пищевой отрасли», была создана первая в России коллекция микросимбионтов гуара. В конце 2019 года было решено исследовать наличие симбиотических бактерий гуара в почвах разного географического происхождения. Был поставлен опыт с использованием почв, полученных из юго-восточных территорий РФ, а также из Непала, Монголии и Израиля. В ходе опыта не было замечено внешних различий между контрольными растениями и растениями, которым внесли вытяжки из почв. По завершении опыта во всех типах почв, было обнаружено незначительное количество клубеньков (1-16 шт.). В контрольных образцах образования не были обнаружены. Выделенные из клубеньков бактерии прошли первичную идентификацию с помощью метода секвенирования гена 16S рРНК. Всего секвенирован 51 штамм, среди которых были найдены бактерии рода *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Rhizobium*. В дальнейшем планируется более подробно исследовать полученные штаммы на возможность продуктивного образования растительно-микробных взаимодействий с гуаром и другими бобовыми растениями, такими как соя культурная (*Glycine max*) и коровий горох (*Vigna unguiculata*).

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-16-00084).

## УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ

Rawlowski К.	24	Маловичко Ю.В.	57
Timmers Т.	25	Мальгин Д.М.	42
Антонец К.С.	65	Матвеева Т.В.	19
Афанасенко О.С.	12	Мещеров А.Р.	43
Афонин А.М.	26	Минибаева Ф.В.	20
Ахтямова З.А.	27	Николаец Е.И.	76
Белоусова М.Е.	28	Олексенко А.В.	44
Бемова В.Д.	50	Парфирова О.И.	45
Бовин А.Д.	51	Пашкевич Л.В.	58
Владимирова М.Е.	29	Проворов Н.А.	21
Ганнибал Ф.Б.	14	Рогожин Е.А.	22
Гоголев Ю.В.	15	Рязанов Е.А.	46
Горбунова А.О.	66	Садикова Д.С.	59
Горшков А.П.	30	Саксаганская А.С.	77
Грибченко Э.С.	52	Серова Т.А.	47
Грицевич К.С.	67	Сырова Д.С.	78
Гуро П.В.	68	Тендюк Н.В.	48
Демченко К.Н.	16	Тихонович И.А.	13
Денисова А.Ю.	31	Трифоновна Н.А.	60
Додуева И.Е.	18	Ульянич П.С.	79
Евстигнеева С.С.	69	Федорова Е.Э.	23
Еговцева А.Ю.	53	Филатов П.В.	61
Жаркова Е.К.	32	Хосид С.Л.	36
Жидкин Р.Р.	33	Черевацкая М.А.	62
Жуков В.А.	26	Шиков А.Е.	63
Зверев А.О.	70	Шулико Н.Н.	49
Иванова К.А.	34	Шумилина Ю.С.	64
Калинина А.А.	35	Цыганов В.Е.	30
Калинина Т.В.	54	Цыганова А.В.	30
Карасев Е.С.	36		
Карлов Д.С.	38		
Кимеклис А.К.	71		
Китаева А.Б.	39		
Кичко А.А.	72		
Королева М.И.	60		
Козлова А.П.	73		
Косолапова А.О.	40		
Косульников Ю.В.	74		
Кудоярова Г.Р.	17		
Кудряшова Т.Р.	56		
Кусакин П.Г.	41		
Лутова Л.А.	18		



**ПРОГРАММА и СБОРНИК ТЕЗИСОВ  
V Всероссийской школы-конференции  
с международным участием для молодых ученых  
«Молекулярно-генетические и клеточные аспекты  
растительно-микробных взаимодействий»**

Издательство «Перо»  
109052, Москва, Нижегородская ул., д. 29-33, стр. 27, ком. 105  
Тел.: (495) 973-72-28, 665-34-36  
Подписано к использованию 08.11.2021. Объем 5,9 Мбайт.  
Электрон. текстовые данные. Заказ 986.