

DOI 10.25637/TVAN2018.04.17.

УДК 579.841.3; 579.64

Хапчаева С. А.<sup>1</sup>, Зотов В. С.<sup>1</sup>, Дидович С. В.<sup>2</sup>, Топунов А. Ф.<sup>1</sup>

**МАРКИРОВАНИЕ МИКРОСИМБИОНТОВ *PHASEOLUS VULGARIS* L. И СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА**

<sup>1</sup>ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН»;

<sup>2</sup>ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»

**Реферат.** Цель исследований – определение специфичности во взаимодействиях различных генотипов клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* с различными сортами фасоли и создание экспериментальных формул микробных биопрепаратов для растениеводства. Проведен анализ специфики симбиотических взаимодействий между *Phaseolus vulgaris* L. (фасоль обыкновенная) и бактериями порядка *Rhizobiales* с помощью полевых и лабораторных испытаний. Особое внимание уделено генотипированию ризобияльной составляющей для выявления молекулярных маркеров наиболее эффективных пар макро- и микросимбионтов. Проведена ПЦР-амплификация хромосомных маркеров (ген *groB* и межгенный регион – *hpn*-регион) с последующим секвенированием. В результате была систематизирована крымская коллекция микросимбионтов фасоли – ССМ (*Crimean collection of microorganisms*) отдела микробиологии ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма» (г. Симферополь). Выявлены перспективные штаммы (генотипы), имеющие потенциал стать основой бактериальных биопрепаратов. Разработаны и экспериментально испытаны различные формулы биопрепаратов, стабилизированных фототрофными микроорганизмами и применяемых в предпосевной обработке семян сельскохозяйственных бобовых культур. Данные формы препаратов прошли успешную апробацию в полевых испытаниях на производственных сортах фасоли. В результате проведенных исследований были не только выявлены генетические маркеры специфичности бобово-ризобияльного симбиоза, но и предложены «персонализированные формулы» комплексных микробных биопрепаратов на основе наиболее эффективных штаммов полезных почвенных микроорганизмов.

**Ключевые слова:** клубеньковые бактерии, фасоль обыкновенная *Phaseolus vulgaris* L., *groB*, *hpn*-регион ПЦР, симбиоз, специфичность, биопрепарат, микроводоросли.

**Введение**

В настоящее время растительно-микробные взаимодействия, в частности бобово-ризобияльный симбиоз, достаточно широко изучены мировым научным сообществом. Выявлены и охарактеризованы генетические основы и молекулярные механизмы, определена значимость подобных систем для изучения ряда фундаментальных и прикладных вопросов биологии. Тем не менее, до конца непонятно влияние внешних и внутренних биотических факторов, определяющих симбиоз между определенным растением семейства Бобовые (*Fabaceae*) и конкретными штаммами различных родов семейства *Rhizobiaceae* из общего пула почвенных микроорганизмов.

Изучение специфичности бобово-ризобияльного симбиоза привело к более глубокому и детальному исследованию генетики этого процесса. Со стороны макросимбионта происходит генетический контроль способности к образованию клубеньков, их числа, внутриклеточной организации, активности азотфиксации (которая определяется по активности фермента нитрогеназы, продолжительности периода активной азотфиксации, способности формировать устойчивый симбиоз),

количества корневой биомассы, в том числе бактериальной. Большинство растений проявляет специфичность в выборе микросимбионта, основанную на лектин-углеводном узнавании партнеров [1]. Молекулярные механизмы микросимбионтов, регулирующие клубенькообразование и синтез сигнальных молекул, детально изучены. Данные гены объединены в единый оперон и регулируются общим промотором – нод-боксом (Nod-box) [2]. Однако в выявлении специфичности растительно-микробных взаимодействий на молекулярно-генетическом уровне остается много вопросов [3]. Фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris* L.) представляет интерес в исследовании специфичности симбиотических взаимодействий, т. к. способна к перекрестному заражению большим числом микросимбионтов неродственных видов бобовых растений.

**Цель исследований** – определение специфичности во взаимодействиях различных генотипов клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* с сортами *P. vulgaris* и создание на основе наиболее эффективных пар макро- и микросимбионтов экспериментальных формул микробных биопрепаратов для растениеводства.

#### **Материалы и методы исследований**

**Симбиотические бактерии.** В работе использованы штаммы клубеньковых бактерий, микросимбионтов фасоли обыкновенной, рода *Rhizobium* из различных коллекций (таблица 1).

**Культуры цианобактерий.** В работе также использовали пять штаммов гетероцистных цианобактерий из различных типов почв. Цианобактерии представлены штаммами авторской коллекции отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «НИИ сельского хозяйства Крыма» – ССМ (Crimean collection of microorganisms) (таблица 1).

Морфологическая идентификация штаммов была основана на следующих диакритических признаках: организация таллома, наличие и тип слизистого чехла, присутствие ветвления, тип деления и размеры клеток и трихом, полярность и форма терминальных клеток, присутствие/отсутствие меристематических зон и некротических клеток, наличие и расположение дифференцированных клеток (акинет, гетероцист) и др. [10].

**Сельскохозяйственные бобовые культуры.** Объекты исследований – различные сорта *Ph. vulgaris* – Гелиада, Рубин, Стрела, Пинто, внесенные в «Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию на территории РФ». Семена предоставлены ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур (ВНИИЗБК) из собственных коллекций.

**Выделение ДНК.** Для выделения препаратов суммарной клеточной ДНК исследуемые штаммы симбиотических бактерий культивировали на агаризованной среде ТУ: дрожжевой экстракт – 1 г/л; пептон – 10 г/л; CaCl<sub>2</sub> – 0,4 г/л; агар – 20 г/л [11]. Выделение бактериальной ДНК проводили посредством фенол-хлороформной экстракции и последующим осаждением изопропанолом [12]. Концентрация выделенной ДНК определена при помощи флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, Life technologies, США) с использованием набора реагентов Qubit Assays (Molecular probes, Life technologies, США). Также использованы наборы для выделения ДНК: Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Invitrogen PureLink Genomic DNA Kit.

Выделение ДНК из почвенных образцов и цианобактериальных ассоциаций проводили в соответствии с протоколом набора PowerSoil DNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories, Inc.

**Таблица 1 – Бактериальные штаммы: почвенные цианобактерии и клубеньковые бактерии – симбионты фасоли**

Штамм	Род/вид	Географическое происхождение	Коллекция*
ФА-2	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
ФА-4	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
ФА-11	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
ФА-20	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
ФА-22	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
ФА-23	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
ФА-30	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
ФК-1	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
ФК-3	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
ФК-6	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
ФН	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
ФН-6	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
ФН-12	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
Ф-16	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
В-6923 Т	<i>R. phaseoli</i>	–	VKPM
Pv22e	<i>R. giardinii</i>	Россия (Московская обл.)	CHWM
УП-8	<i>R. giardinii</i>	Россия (Московская обл.)	CHWM
105	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Армения	CIAM
657	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	–	–
2625	<i>R. phaseoli</i>	Мексика	CIAM
2631	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Белоруссия (Минская обл.)	CIAM
11541 Т	<i>R. etli</i>	Мексика (Гуанахуато)	DSMZ
28449 Т	<i>R. mesoamericanum</i>	Мексика (Веракруз)	DSMZ
11418 Т	<i>R. tropici</i> type B	Южная Америка	DSMZ
22705 Т	<i>R. lusitanum</i>	Португалия (Аркуш-ди-Валдевш)	BCCM/LMG
9517 Т	<i>R. leucaenae</i>	Бразилия	BCCM/LMG
24453 Т	<i>R. tibeticum</i>	Китай (Тибет)	BCCM/LMG
5851 Т	<i>Ensifer fredii</i>	–	DSMZ
1	<i>Desmodosmus</i> sp.	Россия (Республика Крым)	ССМ
2	<i>Nostoc linckia</i>	Украина (Запорожская обл.)	ССМ
3	<i>Nostoc linckia</i> f. <i>muscorum</i>	Германия (Бавария)	ССМ
4	<i>Nostoc sphaeroides</i>	Западная Сахара	ССМ
144	<i>Nostoc linckia</i>	Украина (Запорожская обл.)	ССМ

**Примечание.** \* ККМ (Крымская коллекция микроорганизмов, ССМ, Crimean collection of microorganisms [4]) – авторская коллекция отдела микробиологии ФГБУН «НИИСХ Крыма», Симферополь.

ВКСМ [5] – коллекция ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», г. Санкт-Петербург.

CHWM (Collection of Hin World Microorganisms, [6]) – авторская коллекция уникальных микроорганизмов мира.

ВКПМ [7] – Национальный биоресурсный центр – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (НБЦ ВКПМ).

В качестве референсных культур использовали типовые штаммы ведущих российских и зарубежных коллекций:

DSMZ (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, [8]) – коллекция микроорганизмов и культур клеток Института Лейбница, г. Брауншвейг, Германия.

BCCM/LMG (Belgian co-ordinated collections of microorganisms, [9]) – коллекция микроорганизмов Лаборатории микробиологии, Отдел биохимии и микробиологии Гентского Университета, г. Гент, Бельгия.

**Генотипирование бактерий.** Генотипирование и определение внутривидового разнообразия бактериальных штаммов проведено с использованием ПЦР-амплификация гена  $\beta$ -субъединицы бактериальной РНК-полимеразы (*rpoB*) и межгенного региона *hin*-регион [13].

**ПЦР-амплификация.** ПЦР анализ и последующее секвенирование [14] нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *rhoB* провели с использованием праймеров *rhoB\_F* [15] и *rhoB\_R* [16]; *hin*-регион – с использованием праймеров, специфических для рода *Rhizobium*, Pr.RhizF и Pr.RhizR [13].

**Next-Generation Sequencing (NGS), метагеномное секвенирование.** Препараты ДНК (10–15 нг) использованы в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции для создания и последующего секвенирования ампликонных библиотек. В ПЦР-реакции использованы праймеры к межгенному региону 18S-28S рРНК – ITS: ITS2f: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3' и ITS2r: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' [17]. Пиросеквенирование проводили по протоколу фирмы «Roche» (Швейцария). Подготовку проб и секвенирование проводили на приборе GS Junior («Roche») согласно рекомендациям производителя.

**Анализ нуклеотидных последовательностей.** Первичный сравнительный анализ полученных последовательностей с последовательностями базы данных ГенБанка проведён с помощью программы NCBI Blast [18]. Выравнивание последовательностей и построение матриц нуклеотидного сходства проводили с помощью программы BioEdit 7.0.5.2 [19]. Филогенетические деревья построены в программе Mega 5.1 [20] с помощью алгоритма Neighbor-Joining NJ [21]. Попарные генетические расстояния между последовательностями определены по двухпараметрической модели Кимуры [22].

**Конструирование экспериментальных формул биопрепаратов.** Конечная микробная формула представляет собой консорциум отобранных штаммов бактерий, исходя из требуемой функциональной направленности биопрепарата: стимуляция роста и развития растения; симбиотическая азотфиксация; увеличение коэффициента использования фосфорных удобрений и почвенных фосфатов; усиление иммунитета растения, тем самым повышение его устойчивости к воздействию фитопатогенов. Штаммы предлагаются на основании проведенного генотипирования на внутривидовом уровне и по результатам лабораторных опытов на сортоспецифичность («персонализированный подход»). Экспериментально определяют соотношения объемов и необходимый титр каждой бактериальной суспензии. Микробные формулы биопрепаратов, применяемых в лабораторных и полевых опытах, описаны ниже.

**Лабораторные опыты.** Лабораторные опыты проводили в климатических камерах при светодиодном освещении (белый свет, 6000 Лк). Субстрат – стерильный вермикулит. Инокуляцию проводили в соответствии со схемой опыта (таблица 2) в объеме – 50 мкл бактериальной суспензии с титром  $10^8$ – $10^9$  КОЕ/мл на семя (предпосевная обработка). Семена фасоли сортов Гелиада, Рубин, Стрела и Пинто выращивали в сосудах с перфорированным дном объемом 500 мл.

**Таблица 2 – Схема проведения лабораторного опыта**

Штамм	Генотип
К-	–
К+	Совместная инокуляция – все генотипы
ФА-4	<i>R. leguminosarum</i> IA
ФК-6	<i>R. leguminosarum</i> IB
105	<i>R. leguminosarum</i> IC
ФН-6	<i>R. leguminosarum</i> IID
УП-8	<i>R. giardinii</i> IVE
В-9623Т	<i>R. phaseoli</i> VF

**Полевые опыты.** Полевые испытания микробных препаратов проводили в Орловской и Московской областях в 2016 и 2017 гг. согласно методике [23, 24] по следующей схеме (таблица 3).

**Таблица 3 – Схема опыта на фасоли**

Год	Название препарата/микробная формула
2016	сорт Стрела
	«ЦБК» – <i>Nostoc linckia</i> 144 + <i>R. etli</i> DSM 11541T + <i>R. tropici</i> type B DSM 11418T + <i>R. mesoamericanum</i> DSM 28449T + <i>R. lusitanum</i> LMG 22705T + <i>R. leucaenae</i> LMG 9517T + <i>R. tibeticum</i> LMG 24453T
	Контроль (без обработки)
	сорт Рубин
	Контроль
	<i>R. etli</i> DSM 11541 T
	<i>R. tropici</i> type B DSM 11418 T
	<i>R. mesoamericanum</i> DSM 28449 T
	<i>R. lusitanum</i> LMG 22705 T
	<i>R. leucaenae</i> LMG 9517 T
<i>E. fredii</i> DSM 5851 T	
2017	сорт Стрела
	«ЦБК 1» – <i>Nostoc linckia</i> 144 + <i>R. leguminosarum</i> ФА-22 (II/C)
	«ЦБК 2» – <i>Nostoc linckia</i> 144 + <i>R. etli</i> DSM-11541 T
	Контроль

Среднесуточная температура и количество осадков в период вегетации представлены в таблице 4.

**Таблица 4 – Метеорологические условия в период вегетации**

Область	Месяц	2016 г.		2017 г.	
		количество осадков за месяц, мм	среднесуточная температура, °С	количество осадков за месяц, мм	среднесуточная температура, °С
Московская (д. Молжаниновка)	май	48,0	14,5	–	–
	июнь	63,9	17,5	–	–
	июль	58,4	20,5	–	–
	август	101,6	19,0	–	–
	сентябрь	50,9	10,9	–	–
	всего	322,8	16,5	–	–
Орловская (п. Стрелцкий)	май	124,0	14,4	106,7	12,6
	июнь	135,2	18,1	122,1	15,8
	июль	256,3	20,9	287,8	18,2
	август	211,5	19,8	175,5	19,8
	сентябрь	42,6	11,9	32,2	13,6
	всего	769,6	17,0	724,3	16,0

В Орловской области испытания проводили на темно-серой лесной почве средне суглинистой с пахотным слоем 28–30 см. Климатические условия по температурному режиму можно охарактеризовать как теплые. Учетная площадь делянки – 10 м<sup>2</sup>. В Московской области испытания проводили на дерново-подзолистых почвах с пахотным слоем 20 см.

**Анализ общего содержания белка.** В данной работе использован метод Кьельдаля, определение проводили в аппарате фирмы Bushi на приборе К-424 (Германия) согласно ГОСТ 10846-91 «Зерно и продукты его переработки» [33].

#### Результаты и их обсуждение

Исследуемая коллекция микроорганизмов представляла собой выборку штаммов клубеньковых бактерий, выделенных с корней бобовой культуры.

Первоначальная морфологическая идентификация проведена с помощью микробиологических методов (метод светового поля) и справочника Берджи по бактериологической систематике [25]. Генетическая идентификация и определение таксономического положения штаммов базировались на данных сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. В настоящей работе нами использованы генетические маркеры с различной разрешающей способностью на внутривидовом уровне: *rhoB* и *hin*-регион. Проведенное генотипирование клубеньковых бактерий привело к выявлению в исследуемой выборке наименьшей таксономической единицы – группа штаммов.

Ранее показано [26], что при исследовании выборки из 13-ти изолятов клубеньков с корней фасоли выявлено пять групп штаммов различных генотипов. В данной работе выборка изолятов расширена и также генотипирована. По результатам секвенирования для всей исследуемой выборки штаммов построено филогенетическое дерево по гену *rhoB* (рисунок 1).

Таксономическая кластеризация исследуемых штаммов коллекции ССМ выявила три вида рода *Rhizobium* – *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* и *R. giardinii* и соответствовала разделению на генотипы по *hin*-региону.

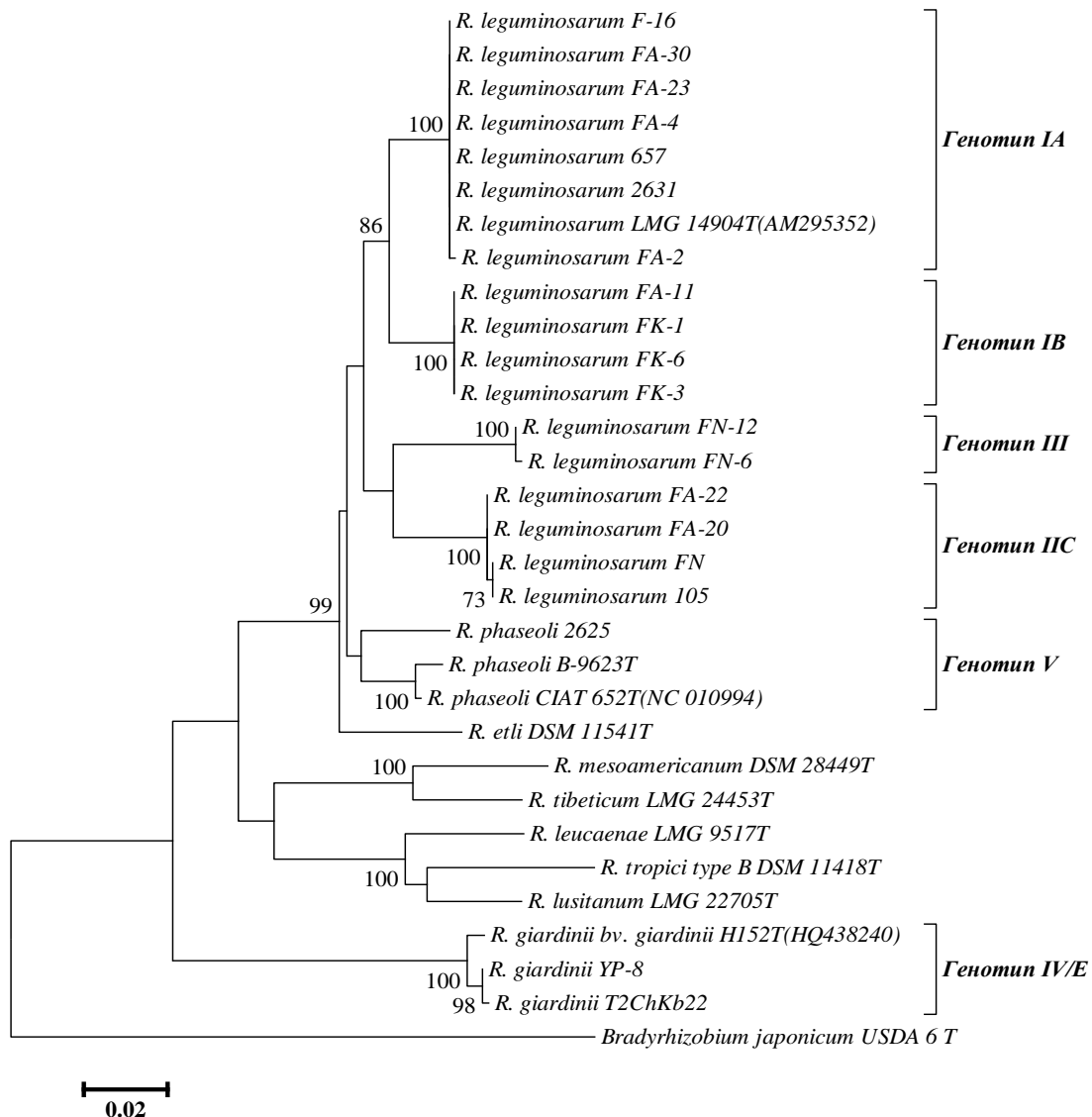
Выявление наиболее эффективных генотипов клубеньковых бактерий в вегетационных испытаниях – один из этапов при конструировании экспериментальных формул биопрепаратов полифункциональных цианобактериальных консорциумов. В лабораторных условиях определена специфичность взаимодействий генотипов ризобий с различными сортами *P. vulgaris*, а также влияние цианобактериальной компоненты на рост и развитие растений. Наиболее эффективные и перспективные штаммы клубеньковых бактерий и цианобактериальные ассоциации использовали для создания биопрепаратов, которые прошли вегетационные и полевые испытания в различных агроклиматических условиях.

**Лабораторные испытания.** Оценку специфичности растительно-микробных взаимодействий проводили в рамках лабораторного опыта с моноинокуляцией ризобияльными штаммами различных генотипов семян фасоли сортов Гелиада, Рубин, Стрела и Пинто.

В результате проведенной обработки полученных данных нодулирующую способность проявили штаммы *R. leguminosarum* 105; *R. giardinii* УП-8; *R. phaseoli* В-9623Т. Штаммы *R. leguminosarum* ФА-4; *R. leguminosarum* ФК-6; *Rhizobium* sp. ФН-6 не образовали клубеньков на корнях растений данных сортов (Nod-). Количество клубеньков отражено в диаграмме (рисунок 2).

Определение генотипа штамма, образовавшего клубенек, проводили с помощью родоспецифичной *hin*-регион ПЦР. В варианте опыта с инокуляцией штаммом *R. leguminosarum* 105 генотипы клубенькообразующих единиц (КЛОЕ) были идентичны генотипу инокулята (520 и 655 п.о.) на сортах Гелиада и Стрела. На сортах Пинто и Рубин наблюдали изменение *hin*-генотипа в результате симбиотических взаимодействий, а именно – отсутствие тяжелого продукта амплификации (655 п.о.).

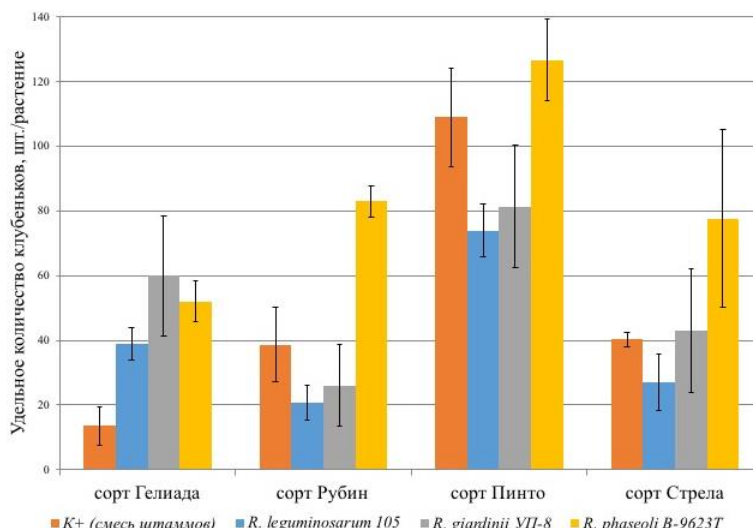
В опыте при инокуляции штаммом *R. giardinii* УП-8 на всех сортах генотипы КЛОЕ совпадают с генотипом внесенного штамма – 260 п.о. При инокуляции штаммом *R. phaseoli* В-9623Т на сортах Гелиада, Пинто и Стрела генотипы КЛОЕ совпадают с генотипом внесенного штамма – 370 и 520 п.о. На сорте Рубин в *hin*-генотипах большинства КЛОЕ отсутствовал тяжелый фрагмент. На сорте Стрела один КЛОЕ был представлен одним продуктом длиной 280 п.о., появление которого может быть вызвано контаминацией из другого опыта.



**Рисунок 1 – Филогенетическое дерево, построенное на основе данных сравнительного анализа последовательностей гена *rpoB* *Rhizobium* sp. с использованием алгоритма NJ**

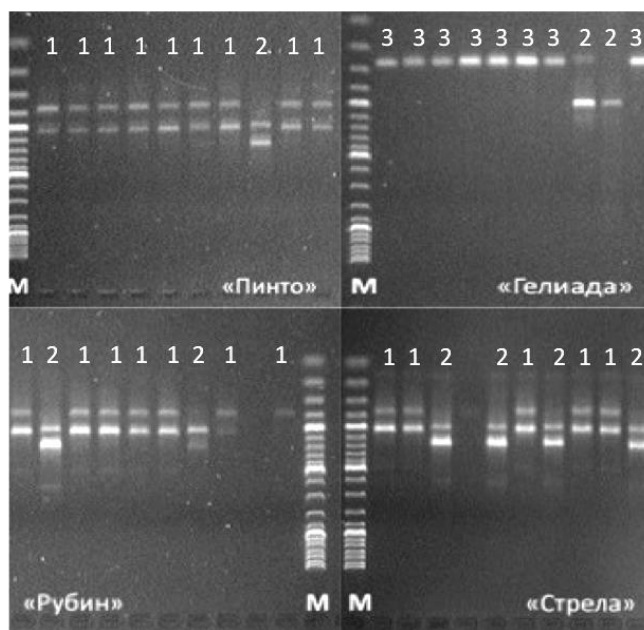
**Примечание.** Масштаб соответствует двум заменам на 100 пар оснований. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap»-анализа (1000 реплик). Значения «bootstrap» ниже 70 % не показаны.

В варианте опыта с положительным контролем – смесью генотипов клубеньки на корнях растений были образованы штаммами бактерий в различном соотношении генотипов. На сортах Стрела, Рубин и Пинто преобладал генотип, характерный для штамма *R. phaseoli* B-9623T (60–90 %), в миноре проявлялся генотип штамма *R. leguminosarum* 105 (10–40 %). Сортоспецифичным оказался штамм *R. giardinii* УП-8, образовавший большинство клубеньков на сорте Гелиада (80 %), другие КлОЕ приходились на генотип штамма *R. leguminosarum* 105 (20 %) (рисунок 3). На сорте Пинто сортоспецифичность проявил штамм *R. phaseoli* B-9623T (90 %).



**Рисунок 2 – Диаграмма распределения количества клубеньков в лабораторных опытах с моноинкуляцией различных сортов фасоли**

*Примечание.* Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap»-анализа (1000 реплик). Значения «bootstrap» ниже 70 % не показаны.



**Рисунок 3 – Электрофоретическое разделение продуктов *hin*-регион ПЦР КлОЕ в опыте с положительным контролем**

*Примечание.* Дорожки: 1. *R. phaseoli* B-9623T 2. *R. leguminosarum* 105 3. *R. giardinii* VII-8.

В ранее проведенных работах штаммы, отнесённые к виду *R. giardinii*, характеризовались слабой эффективностью в азотфиксирующем симбиозе с *P. vulgaris* [27]. Сортоспецифичность в отношении сорта Гелиада проявлялась в количестве образованных штаммом данного генотипа клубеньков. Качественные показатели азотфиксирующего симбиоза (нитрогеназная активность, урожайность, содержание белка и пр.) не оценивали. Однако можно сделать предположение, что сорт Гелиада, скорее всего, был секционирован на минеральных фонах и в целом в эффективном симбиозе с почвенными клубеньковыми бактериями не нуждается. В то



время как штамм вида *R. phaseoli* наоборот, первоначально был выделен из эффективных клубеньков с корней фасоли [28] и потенциально может быть использован при конструировании персонализированной формулы биопрепарата для фасоли сорта Пинто.

В ранее проведенных работах [29] показано положительное влияние цианобактерий на стабильность функциональной направленности микробного препарата. В данной работе изучены пять штаммов цианобактериальных ассоциаций (ЦБА) на предмет перспективного использования в составе формулы биопрепарата для предпосевной обработки семян фасоли. По предварительной оценке влияния на всхожесть семян, штаммы ССМ3 и ССМ4 не показали значимых результатов в отличие от опыта без обработки. В то время как штаммы ССМ1, ССМ2 и ССМ144 проявили положительное влияние и были проанализированы с помощью метагеномного секвенирования межгенного региона ITS (18S-28S рРНК).

По результатам NGS (next generation sequencing) во всех цианобактериальных ассоциациях выявлена грибная составляющая, богатая по своему разнообразию и относящаяся к классу эндофитных грибов «dark septate endophytes (DSEs)», главным образом, обеспечивающих баланс почвенных биохимических процессов, в том числе в ризосфере растений. Каждая ЦБА имеет свой набор уникальных грибных таксонов. В образце штамма ССМ2 обнаружено следовое количество ДНК фитопатогенных грибов видов *Septoriella leuchtmanii* и *Septoria arundinacea*, таким образом данная ассоциация может представлять потенциальную опасность для растений. В штаммах ССМ144 и ССМ2 обнаружено значительное количество ДНК инфузорий *Colpoda steinii*. Известно, что обработка микробными биопрепаратами, содержащими инфузории *C. steinii*, увеличивает всхожесть семян, стимулирует рост и развитие растений [30]. Также в цианобактериальном штамме ССМ144 на уровне ДНК показано отсутствие патогенных микроорганизмов (рисунок 4), опасных для человека, теплокровных животных, полезных насекомых, рыб и почвенных микроорганизмов.

Таким образом, по результатам комплексного анализа ЦБА для практического испытания в полевых опытах выбран штамм *Nostoc linckia* ССМ144, так как он представлен сбалансированным и богатым разнообразием почвенных микробных таксонов, обеспечивающих ключевые физиолого-биохимические функции, необходимые при создании высокоэффективных растительно-микробных симбиозов: азотфиксацию, фосфатмобилизацию, стимуляцию роста, антагонизм к фитопатогенам, положительное влияние на почвенное плодородие.

В результате проведенных лабораторных опытов выявлены генотипы штаммов клубеньковых бактерий и ЦБА, которые обладают природным потенциалом для образования эффективного симбиоза, и проявляют специфичность по отношению к различным сортам фасоли. На их основе сконструированы экспериментальные формулы биопрепаратов.

**Полевые испытания.** С целью оценки действия и влияния экспериментальных формул биопрепарата на растения фасоли сорта Стрела в 2016 и 2017 гг. проведены полевые испытания в Орловской области на темно-серой лесной почве. В 2016 г. также проведены испытания на фасоли сорта Рубин в Московской области на дерново-подзолистой почве. По итогам испытаний оценено влияние вносимых биопрепаратов на всхожесть семян, общее состояние растения в процессе вегетации, качество и количество урожая семян по сравнению с контролем без предпосевной обработки. В качестве инокулята на фасоли сорта Стрела использован

цианобактериальный биопрепарат – цианобактериальный консорциум («ЦБК»). Результаты качества и количества урожая семян в полевых испытаниях представлены в таблице 5.

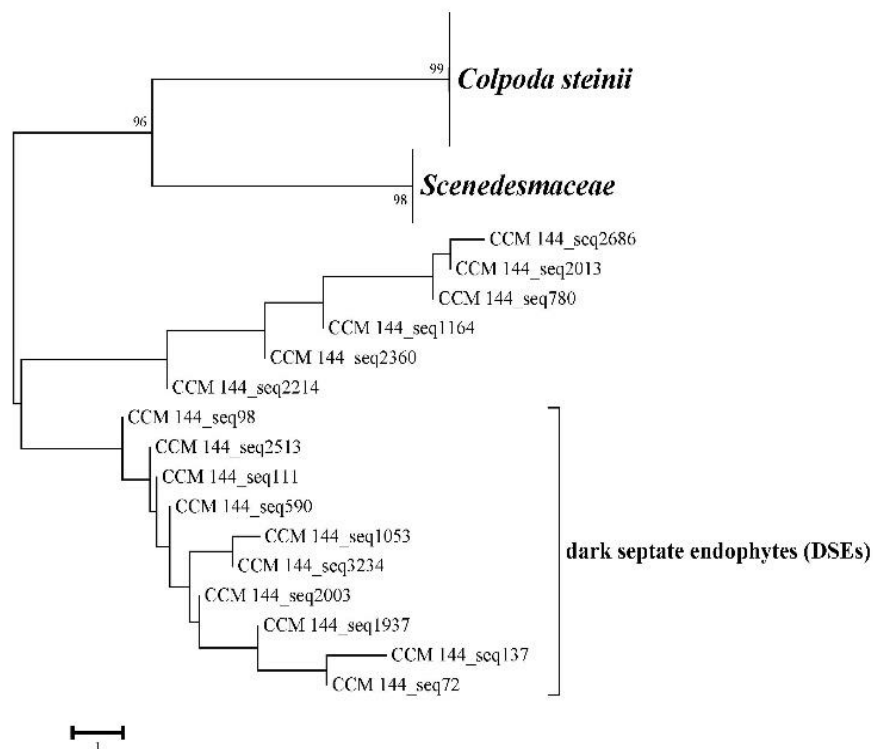


Рисунок 4 – Биоразнообразие эукариотической компоненты ЦБА штамма *Nostoc linckia* CCM144. Филогенетическое дерево, построенное на основе данных сравнительного анализа последовательностей с использованием алгоритма NJ

Таблица 5 – Влияние применения микробных препаратов на урожайность семян фасоли сорта Стрела в полевых испытаниях

Вариант	Урожайность семян, ц/га	Прибавка к контролю		Содержание белка, %
		ц/га	%	
2016 г.				
Контроль	13,9	–	–	26,5
«ЦБК»	15,0	1,1	+7,1	26,7
НСР <sub>05</sub>	1,05	–	–	–
2017 г.				
Контроль	28,6	–	–	20,4
«ЦБК-1»	30,4	1,8	+6,3	22,8
«ЦБК-2»	30,3	1,7	+6,0	24
НСР <sub>05</sub>	1,5	–	–	–

В 2017 г. в качестве ризобияльной компоненты «ЦБК» использованы монокультуры клубеньковых бактерий двух вариантов: типовой штамм *R. etli* и перспективный *R. leguminosarum* ФА-22 из исследуемой выборки фасолевых штаммов. Штамм ФА-22 предложен для внесения в состав препарата ввиду того, что имеет сходный по *hin*-региону генотип со штаммом *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* 105 из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии, где последний заявлен в качестве

эффективной бактерии на *P. vulgaris*. Типовой штамм *R. etli* DSM-11541Т использован в качестве референсного штамма вида, обладающего высокой степенью фиксации азота [31, 32].

Полевые испытания 2016 и 2017 гг. на сорте Стрела показали положительное влияние разрабатываемых биопрепаратов на урожайность семян зернобобовых культур с прибавкой более 6 % в сравнении с опытом без обработки. Статистически значимого увеличения содержания белка в семенах в 2016 г. не наблюдали, а в 2017 г. в обоих вариантах опыта выявлены прибавки.

На фасоли сорта Рубин в Московской области проведены мелкоделяночные полевые испытания для оценки влияния моноинокуляции типовыми штаммами ризобий различных видов для оценки эффективности предпосевной моноинокуляции клубеньковыми бактериями различных генотипов в сравнении с контролем без микробной обработки, а также выявление генотипа, который будет обладать большей конкурентоспособностью по сравнению со штаммами местной популяции ризобий (*R. leguminosarum* IA-генотипа). В результате испытаний определена урожайность семян и содержание в них белка (таблица 6).

**Таблица 6 – Показатели урожайности и содержания белка в мелкоделяночном опыте на фасоли сорта Рубин (2016 г.)**

Вариант опыта	Всхожесть, %	Масса семян, г/растение	Урожайность семян, ц/га	Прибавка к контролю		Содержание белка в зерне, %
				ц/га	%	
Контроль	72	25,8	18,60	–	–	25,9
<i>R. etli</i> DSM 11541 Т	80	33,0	26,36	7,76	42	25,4
<i>R. tropici</i> type В DSM 11418 Т	96	23,7	22,78	4,18	22	24,9
<i>R. mesoamericanum</i> DSM 28449Т	54	21,3	20,00	1,40	8	25,4
<i>R. lusitanum</i> LMG 22705 Т	76	17,0	12,90	–5,70	–32	26,2
<i>R. leucaenae</i> LMG 9517 Т	84	22,4	18,78	0,18	1	26,2
<i>Ensifer fredii</i> DSM 5851 Т	84	15,0	12,62	–5,98	–31	24,6
НСП <sub>05</sub>	3,63	2,83	2,15	–	–	–

Предпосевная микробная инокуляция во всех вариантах приводила к увеличению всхожести растений фасоли относительно контроля без обработки. Обработка штаммами ризобий видов *E. fredii* и *R. lusitanum* приводила к значительному снижению урожайности семян. В варианте со штаммом *R. leucaenae* LMG 9517 Т достоверных отличий в урожайности данного сорта фасоли не выявлено, в то время как обработка штаммами видов *R. etli* и *R. tropici* type В привела к существенным прибавкам урожайности семян – 42 и 22 % соответственно, несколько меньше в случае со штаммом *R. mesoamericanum* DSM 28449 Т – 8 %. Штамм *R. etli* DSM 11541Т показал лучшие результаты и по урожайности семян фасоли сорта Рубин. Данная схема опыта требует повторного испытания в полевых условиях для масштабирования и подтверждения результатов. Предположительно, что штаммы вида *R. etli* перспективны для использования в основе микробного биопрепарата для предпосевной обработки семян фасоли в составе «персонализированной» формулы биопрепарата для сорта Рубин.

#### Выводы

В результате проведенного генотипирования на внутривидовом уровне 28 штаммов почвенных симбиотических микроорганизмов, микросимбионтов *P. vulgaris*, выявлена принадлежность выборки к трем видам рода *Rhizobium* –

*R. leguminosarum*, *R. phaseoli* и *R. giardinii*, что соответствовало разделению на генотипы по *hin*-региону.

В лабораторных опытах определена сортоспецифичность во взаимодействии штаммов ризобий различных генотипов и сортов фасоли – Гелиада, Рубин, Стрела и Пинто. В рамках полевых испытаний при предпосевной обработке семян фасоли сорта Рубин различными генотипами ризобий также выявлена сортоспецифичность, а именно: инокуляция штаммами вида *R. etli* приводила к увеличению урожайности семян на 42 %. На основе данных результатов предложен подход конструирования «персонализированных» формул биопрепаратов под конкретные сорта бобовых растений для достижения максимального симбиотического потенциала и раскрытия природного потенциала сорта.

Сконструированы экспериментальные формы микробных полифункциональных препаратов (цианобактериальных консорциумов) для фасоли на основе фототрофных микроорганизмов – цианобактериальных ассоциаций и клубеньковых бактерий. Показана эффективность использования ЦБК (увеличение урожайности семян более, чем на 6 % в сравнении с опытом без обработки, прибавка содержания белка в зерне более 2 %) при предпосевной обработке семян фасоли сорта Стрела в полевых испытаниях в Орловской области на темно-серой лесной почве.

### Литература

1. Сидорова К. К., Шумный В. К., Власова Е. Ю., Гляненко М. Н., Мищенко Т. М., Майстренко Г. Г. Симбиогенетика и селекция макросимбионта на повышение азотфиксации на примере гороха (*Pisum sativum* L.) // Информационный вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 2. С. 357–374.
2. Жуков В. А., Рычагова Т. С., Штарк О. Ю., Борисов А. Ю., Тихонович И. А. Генетический контроль специфичности взаимодействия бобовых растений с клубеньковыми бактериями // Экологическая генетика. 2008. Том VI. № 4. С. 12–19.
3. Овцына А. О., Тихонович И. А. Структура, функции и возможность практического применения сигнальных молекул, инициирующих развитие бобово-ризобияльного симбиоза // Экологическая генетика. 2004. Т. 2. № 3. С. 14–24.
4. Крымская коллекция микроорганизмов. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.ckrp-rf.ru/usu/507484/> №507484, <http://hin-project.com/theory/bacteria-collection/> (дата обращения 01.10.2018).
5. Ведомственная коллекция полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ОСХН РАН (ВКСМ) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://62.152.67.70/cryobank/login.jsp> (дата обращения 01.10.2018).
6. Авторская коллекция микроорганизмов. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://hin-project.com/theory/bacteria-collection/> (дата обращения 01.10.2018).
7. Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов. Национальный биоресурсный центр. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.genetika.ru/vkpm/> (дата обращения 01.10.2018).
8. Коллекция микроорганизмов и культур клеток Института Лейбница. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.dsmz.de/catalogues.html> (дата обращения 01.10.2018).
9. Коллекция микроорганизмов Лаборатории микробиологии, Отдел биохимии и микробиологии Гентского Университета. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://bccm.belspo.be/catalogues> (дата обращения 01.10.2018).
10. Дидович С. В., Москаленко С. В., Темралеева А. Д., Хапчаева С. А. Биотехнологический потенциал почвенных цианобактерий (обзор) // Вопросы современной альгологии. 2017. № 2 (14). [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://algology.ru/1170> (дата обращения 01.10.2018).
11. Beringer J. E., R1 transfer in *Rhizobium leguminosarum* // Journal of General microbiology. 1974. Vol. 84. P. 188–198.
12. Laguerre G., Mazurier S. I., Amarger N. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations // FEMS Microbiology Ecology. 1992. Vol. 10. No.1. P. 17–26.

13. Зотов В. С., Пунина Н. В., Хапчаева С. А., Дидович С. В., Мельничук Т. Н., Топунов А. Ф. Новый таксономический маркер клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* и его эволюция // Экологическая генетика. 2012. Т. 10. № 2. С. 49–62.
14. Sanger F., Air G. M., Barrell B. G., Brown N. L., Coulson A. R., Fiddes J. C., Hutchison C. A. III, Slocombe P. M., Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA // Nature. 1977. Vol. 265 (5596). P. 687–695.
15. Пунина Н. В., Зотов В. С., Пархоменко А. Л., Пархоменко Т. Ю., Топунов А. Ф. Изучение генетического разнообразия *Bacillus thuringiensis*, выделенных в различных эколого-географических зонах Украины, при помощи анализа генов 16S рРНК, *gypB* и методов АР-ПЦР и saAFLP // Acta naturae. 2013. Т. 5. № 1(16). С. 93–103.
16. Martens M., Dawyndt P., Coopman R., Gillis M., de Vos P., Willems A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*) // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2008. Vol. 58 (1). P. 200–214.
17. Минчева Е. В., Перетолчина Т. Е., Ижболдина Л. А., Кравцова Л. С., Щербаков Д. Ю. Эволюционные связи эндемичной зеленой водоросли озера Байкал *Draparnaldioides simplex* с небайкальскими таксонами семейства Chaetophoraceae (Chlorophyta) // Молекулярная биология. 2013. Т. 47. № 1. С. 181–184.
18. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool // Journal of Molecular Biology. 1990. Vol. 215(3). P. 403–410.
19. Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acids Symposium Series. 1999. Vol. 41(41). P. 95–98.
20. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Briefings in Bioinformatics. 2004. Vol. 5(2). P. 150–163.
21. Nei M., Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics. New York: Oxford University Press, 2000. P. 336.
22. Kimura M. A. A simple method for estimating evolutionary rate at base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // Journal of Molecular Evolution. 1980. Vol. 16 (2). P. 111–120.
23. Экспериментальна ґрунтова мікробіологія // За ред. Волкогона В. В. К.: Аграрна наука, 2010. С. 464.
24. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
25. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. Two: The Proteobacteria (Part C) // Ed. by Garrity G., Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T. US: Springer, 2005. 1256 p.
26. Зотов В. С., Пунина Н. В., Хапчаева С. А., Дидович С. В., Топунов А. Ф. Использование методов saAFLP и *hin*-регион ПЦР для генотипирования штаммов ризобий – симбионтов *Phaseolus vulgaris* // Таврический вестник аграрной науки. Симферополь. 2013. Т. 1. С. 15–23.
27. Amarger N., Macheret V., Laguerre G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules // International Journal of Systematic Bacteriology. 1997. Vol. 47 (4). P. 996–1006.
28. Ramírez-Bahena M.H., García-Fraile P., Peix A., Valverde A., Rivas R., Igual J. M., Mateos P. F., Martínez-Molina E., Velazquez E. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2008. Vol. 58 (11). P. 2484–2490.
29. Трефилова Л. В. Использование цианобактерий в агробιοтехнологии. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Саратов: ФГОУ ВПО «Вятская государственная сельскохозяйственная академия», 2008. 12 с.
30. Чеботарева В. В., Бега З. Т., Курдиш И. К. Физиолого-биохимическая активность бактерий при прорастании семян огурцов и влияние инфузорий *Colpoda steinii* на этот процесс // Мікробіологічний журнал. 2015. Т. 77. No 2. С. 15–21.
31. Graham P. H., Rosas J. C., Estevez de Jensen C. Addressing edaphic constraints to bean production: the bean/cowpea CRSP project in perspective // Field Crops Research. 2003. Vol. 82. P. 179–192.
32. Kellman A. W. *Rhizobium* inoculation, cultivar and management effects on the growth, development and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Thesis diss. ... Dr. Sc. (Agr.). New Zealand, Linkoln: Linkoln University, 2008. 257 p.
33. ГОСТ 10846-91. Зерно и продукты его переработки. Метод определения белка. М.: изд-во стандартов, 1993. 9 с.

## References

1. Sidorova K. K., Shumny V. K., Vlasova E. Yu., Glyanenko M. N., Mishchenko T. M., Maystrenko G. G. Genetics of symbiosis and breeding of a macrosymbiont for intense nitrogen fixation by the

example of pea // Informative bulletin of Vavilovsky society of geneticists and breeders (Vavilov Journal of Genetics and Breeding). 2010. Vol. 14. No. 2. P. 357–374.

2. Zhukov V. A., Rychagova T. S., Shtark O. Y., Borisov A. Y., Tikhonovich I. A. The genetic control of specificity of interactions between legume plants and nodule bacteria // Ecological genetics. 2008. Vol. VI. No. 4. P. 12–19.

3. Ovtsyna A. O., Tikhonovich I. A. Structure, functions and perspectives of practical application of the signal molecules inducing development of rhizobia-legume symbiosis // Ecological genetics. 2004. Vol. 2. No. 3. P. 14–24.

4. Crimean collection of microorganisms. [Electronic resource]. Access point: <http://www.ckp-rf.ru №507484>, <http://hin-project.com/theory/bacteria-collection/> (reference's date 01.10.2018).

5. Russian collection of agricultural microorganisms (RCAM). [Electronic resource]. Access point: <http://62.152.67.70/cryobank/login.jsp> (reference's date 01.10.2018).

6. Authors' collection of microorganisms. [Electronic resource]. Access point: <http://hin-project.com/theory/bacteria-collection/> (reference's date 01.10.2018).

7. Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM). National bioresource center. [Electronic resource]. Access point: <http://www.genetika.ru/vkpm/> (reference's date 01.10.2018).

8. Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. [Electronic resource]. Access point: <https://www.dsmz.de/catalogues.html> (reference's date 01.10.2018).

9. Belgian coordinated collections of microorganisms. [Electronic resource]. Access point: <http://bccm.belspo.be/catalogues> (reference's date 01.10.2018).

10. Didovich S. V., Moskalenko S. V., Temraleeva A. D., Khapchaeva S. A. Biotechnological potential of soil cyanobacteria (review) // Issues of modern algology. 2017. No. 22 (14). [Electronic resource]. Access point: <http://algology.ru/1170> (reference's date 01.10.2018).

11. Beringer J. E., R1 transfer in *Rhizobium leguminosarum* // Journal of General microbiology. 1974. Vol. 84. P. 188–198.

12. Laguerre G., Mazurier S. I., Amarger N. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations // FEMS Microbiology Ecology. 1992. Vol. 10. No. 1. P. 17–26.

13. Zotov V. S., Punina N. V., Khapchaeva S. A., Didovich S. V., Melnichuk T. N., Topunov A. F. new taxonomic marker of nodule bacteria of the rhizobium genus and its evolution // Ecological genetics. 2013. Vol. 3. No. 2. P. 102–113.

14. Sanger F., Air G. M., Barrell B. G. Brown N. L., Coulson A. R., Fiddes J. C., Hutchison C. A. III, Slocombe P. M., Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA // Nature. 1977. Vol. 265 (5596). P. 687–695.

15. Punina N. V., Zotov V. S., Parkhomenko A. L., Parkhomenko T. U., Topunov A. F. Genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* from different geo-ecological regions of Ukraine by analyzing the 16S rRNA and *gyrB* genes and by AP-PCR and saAFLP // Acta Naturae. 2013. Vol. 5. No. 1(16). P. 90–100.

16. Martens M., Dawyndt P., Coopman R., Gillis M., de Vos P., Willems A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*) // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2008. Vol. 58 (1). P. 200–214.

17. Mincheva E. V., Peretolchina T. E., Izhboldina L. A., Kravtsova L. S., Sherbakov D. Y. Evolutional relationships of endemic green algae *Draparnaldioides simplex* from lake Baikal with nonbaicalian taxa of family Chaetoforaceae (Chlorophyta) // Molecular Biology. 2013. Vol. 47. No. 1. P. 181–184.

18. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool // Journal of Molecular Biology. 1990. Vol. 215 (3). P. 403–410.

19. Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acids Symposium Series. 1999. Vol. 41 (41). P. 95–98.

20. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Briefings in Bioinformatics. 2004. Vol. 5 (2). P. 150–163.

21. Nei M., Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics // New York: Oxford University Press. 2000. P. 336.

22. Kimura M. A. A simple method for estimating evolutionary rate at base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // Journal of Molecular Evolution. 1980. Vol. 16 (2). P. 111–120.

23. Experimental soil microbiology // Ed. by Volkogon V. V. Kiev: Agrarna nauka, 2010. P. 464.

24. Dospekhov B. A. Methods of field research. Moscow: Agropromizdat, 1985. 351 p.

25. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. Two: The Proteobacteria (Part C) // Ed. by Garrity G. US: Springer, 2005. 1256 p.

26. Zotov V. S., Punina N. V., Khapchaeva S. A., Didovich S. V., Topunov A. F. Using of saAFLP and *hin*-region PCR for genotyping analysis of nodulating rhizobial symbionts of *Phaseolus vulgaris* // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2013. No. 1. P. 15–23.

27. Amarger N., Macheret V., Laguerre G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules // International Journal of Systematic Bacteriology. 1997. Vol. 47 (4). P. 996–1006.

28. Ramírez-Bahena M. H., García-Fraile P., Peix A., Valverde A., Rivas R., Igual J. M., Mateos P. F., Martínez-Molina E., Velazquez E. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2008. Vol. 58 (11). P. 2484–2490.
29. Trefilova L. V. Usage of cyanobacteria in agrobiotechnology. Autors' abstract ... Cand. Sc. (Agr.). Saratov: Vyatka State Agricultural Academy, 2008.
30. Chebotareva V. V., Bega Z. T., Kurdish I. K. Physiological and biochemical activity of bacteria during germination of cucumber seeds and impact ciliates *Colpoda steinii* this process // Microbiological journal. 2015. Vol. 77. No. 2. P. 15–21.
31. Graham P. H., Rosas J. C., Estevez de Jensen C. Addressing edaphic constraints to bean production: The bean/cowpea CRSP project in perspective // Field Crops Research. 2003. Vol. 82. P. 179–192.
32. Kellman A. W. *Rhizobium* inoculation, cultivar and management effects on the growth, development and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Thesis diss. ... Dr. Sc. (Agr.). New Zealand, Linkoln: Linkoln University, 2008. 257 p.
33. GOST 10846-91. Grain and products of his processing. Method of definition of protein. Moscow: Publishing house of standards, 1993. 9 p.

UDC 579.841.3; 579.64

Khapchaeva S. A., Zotov V. S., Didovich S. V., Topunov A. F.

### MARKING OF NODULE BACTERIA AND EFFECTIVIZATION APPROACHES OF LEGUME-RHIZOBIUM SYMBIOSIS

**Summary.** *The purpose of the research was to determine the specificity in the interactions between various genotypes of nodule bacteria Rhizobium sp. and various breeds of kidney bean and to design the experimental formulas of microbial biopreparations for crop production. The analysis of the specificity of symbiotic interactions between Phaseolus vulgaris and bacteria from Rhizobiales order by means of field and laboratory tests had been carried out. Special attention was paid to genotyping of a microbial component for identification of the molecular markers of the most effective pairs of macro- and micro-symbionts. The PCR-amplification of chromosomal markers (rpoB gene and the intergenic region – the hin-region) and the subsequent sequencing were carried out. The Crimean collection of kidney bean's micro-symbionts – CCM (Crimean collection of microorganisms) of the department of microbiology of FSBSI "Research Institute of Agriculture of Crimea" (Simferopol) had been systematized. The most effective strains (genotypes) having the potential to become a basis of bacterial biological products were revealed. Various formulas of biological products stabilized by phototrophic microorganisms and applied as a seed dressing for agricultural legume crops had been developed and experimentally tested. These forms of biopreparations had been successfully approbated in field tests on industrial breeds of kidney bean. As a result of the conducted research, not only genetic markers of specificity of legume-rhizobia symbiosis were identified, but also "personalized formulas" of complex microbial biological products based on the most effective strains of useful soil microorganisms were offered.*

**Keywords:** *nodule bacteria, Phaseolus vulgaris L., rpoB, hin-region PCR, symbiosis, specificity, biopreparation, microalgae.*

Хапчаева Софья Арсеновна, младший научный сотрудник, группа альгобиотехнологии, «Институт биохимии имени А. Н. Баха ФГУ Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН»; 119071, Россия, г. Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2; e-mail: sakhapchaeva.1990@gmail.com.

Зотов Василий Сергеевич, старший научный сотрудник, руководитель группы альгобиотехнологии, «Институт биохимии имени А. Н. Баха ФГУ Федеральный исследовательский

центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН»; 119071, Россия, г. Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2; e-mail: adni83@yandex.ru.

Дидович Светлана Витальевна, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник отдела сельскохозяйственной микробиологии, ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»; Россия, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150; e-mail: sv-alex.68@mail.ru.

Топунов Алексей Федорович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией, «Институт биохимии имени А. Н. Баха ФГУ Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН»; 119071, Россия, г. Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2; e-mail: aftopunov@yandex.ru.

Khapchaeva Sofya Arsenovna, junior researcher, algobiotechnology group, Bach Institute of Biochemistry, “Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences”; 33, Leninskiy prospect, build. 2, Moscow, 119071, Russia; e-mail: sakhapchaeva.1990@gmail.com.

Zotov Vasilij Sergeevich, Cand. Sc. (Biology), senior researcher, algobiotechnology group, Bach Institute of Biochemistry, “Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences”; 33, Leninskiy prospect, build. 2, Moscow, 119071, Russia; e-mail: algo.consortium@gmail.com.

Didovich Svetlana Vitaliivna, Cand. Sc. (Agr.), senior researcher of microbiology Department, FSBSI “Research Institute of Agriculture of Crimea”; 150, Kievskaya str., Simferopol, Republic of Crimea, 295493, Russia; e-mail: sv-alex.68@mail.ru.

Topunov Aleksey Fedorovich, Dr. Sc. (Agr.), head of Laboratory, Bach Institute of Biochemistry, “Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences”; 33, Leninskiy prospect, build. 2, Moscow, 119071, Russia; e-mail: aftopunov@yandex.ru.

*Дата поступления в редакцию – 21.06.2018.*

*Дата принятия к печати – 15.09.2018.*