Associative growth-stimulating strains of bacteria and their whole genome sequencingAbdurashytov S.F.¹, Melnichuk T.N.¹, Chirak E.R.², Egovtseva A.Y.¹, Abdurashytova E.R.¹, Andronov E.E.²¹FSBSI "Research Institute of Agriculture of Crimea", Simferopol; ²FSBSI "All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology", St. Petersburg, Russia

E-mail: asuleyman83@rambler.ru

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

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

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

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

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

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

This work is supported by the Russian Foundation of Basic Research (Grant No A_18-016-00197) and within the Framework of the State Assignment of Fundamental Research (No 0834-2015-0005).

Ассоциативные штаммы бактерий-ростстимуляторов и их полногеномное секвенированиеАбдурашитов С.Ф.¹, Мельничук Т.Н.¹, Чирак Е.Р.², Еговцева А.Ю.¹, Абдурашитова Э.Р.¹, Андронов Е.Е.²¹ ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», Симферополь; ² ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург, Россия

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

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

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

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

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

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

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ A_18-016-00197 и государственного задания фундаментальных исследований № 0834-2015-0005.

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