

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук
(УФИЦ РАН)

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского
федерального исследовательского центра Российской академии наук
(ИБГ УФИЦ РАН)

На правах рукописи

Лавина Анна Михайловна

**ГЕНЫ-РЕГУЛЯТОРЫ СИНТЕЗА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ В
ФОРМИРОВАНИИ БИОПЛЕНОК *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM***

Специальность 03.02.03 – микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
Баймиев Алексей Ханифович

Уфа 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Характеристика и применение PGPR микроорганизмов.....	15
1.2. Ризобияльные экзополисахариды: регуляция биосинтеза и роль в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями	17
1.2.1. Структура ризобияльных экзополисахаридов	18
1.2.2. Гены-регуляторы синтеза экзополисахаридов у <i>R leguminosarum</i>	20
1.2.3. <i>Wzx/Wzy</i> -зависимый биосинтез экзополисахаридов у <i>R leguminosarum</i>	24
1.2.4. Геномные регионы, участвующие в биосинтезе ЭПС	26
1.2.5. Роль ЭПС в бобово-ризобияльном симбиозе	31
1.3. Структурно-функциональные особенности ризобияльных биопленок и их роль в бобово-ризобияльном симбиозе.....	36
1.3.1. Молекулярные механизмы, влияющие на формирование ризобияльных биопленок.....	39
1.3.2. Характеристика биопленок <i>R. leguminosarum</i>	50
1.3.3. Роль процессов биопленкообразования в бобово-ризобияльном симбиозе .	55
1.3.4. Применение ризобияльных штаммов в качестве биопленочных биодобрений	59
Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	63
2.1. Объекты исследования	63
2.2. Состав водных растворов и питательных сред	65
2.3. Реактивы и материалы	66
2.4. Олигонуклеотидные праймеры.....	67
2.5. Методы исследования.....	69
2.5.1. Выделение ДНК.....	69
2.5.2. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей и подбор специфичных праймеров к исследуемым генам.....	70
2.5.3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и <i>real-time</i> ПЦР	70
2.5.4. Аналитический гель-электрофорез ДНК.....	71
2.5.5. Определение ростостимулирующего эффекта ризосферных бактерий	72
2.5.6. Обработка ДНК щелочной фосфатазой и полинуклеотидкиназой фага T473	

2.5.7. Расщепление ДНК рестриктазами эндонуклеазами.....	74
2.5.8. Препаративный гель-электрофорез ДНК.....	75
2.5.9. Выделение и очистка плазмидной ДНК.....	75
2.5.10. Подготовка компетентных клеток <i>E. coli</i>	77
2.5.11. Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i> плазмидной ДНК.....	78
2.5.12. Автоматическое секвенирование ДНК ферментативным методом.....	78
2.5.13. Приготовление электрокомпетентных клеток ризобий.....	79
2.5.14. Электропорация компетентных клеток ризобактерий.....	79
2.5.15. Образование ризосферными бактериями биопленок на инертных поверхностях.....	80
2.5.16. Оценка зависимости биопленкообразования от логарифма числа живых клеток при росте культур на несменяемой среде.....	81
2.5.17. Подготовка корней томата к микроскопированию.....	81
2.5.18. Оценка количества адгезированных на корнях растений ризобактерий... ..	82
2.5.19. Статистический анализ.....	82
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	84
3.1. Идентификация генов <i>pssA</i> , <i>pssB</i> , <i>prsD</i> , <i>prsE</i> и <i>rosR</i> в геноме <i>R. leguminosarum</i> и <i>R. galegae</i>	84
3.1.1. Проведение сравнительного анализа последовательностей генов, участвующих в биосинтезе ЭПС.....	85
3.1.2. Скрининг генов <i>pssA</i> , <i>pssB</i> , <i>prsD</i> , <i>prsE</i> и <i>rosR</i> в геноме <i>R. leguminosarum</i> и <i>R. galegae</i>	85
3.2. Получение штаммов клубеньковых бактерий, трансформированных генами- регуляторами формирования биопленок.....	99
3.2.1. Создание векторных конструкций на основе плазмид широкого круга хозяев, содержащих гены, регулирующие биосинтез экзополисахаридов.....	100
3.2.2. Рекомбинантные по генам-регуляторам формирования биопленок ризобияльные штаммы.....	106
3.2.3. Оценка влияния индукции <i>P_t</i> промотора на штаммы, трансформированные конструкцией <i>pJB658GFPRosR</i>	108
3.3. Изучение процессов формирования биопленок ризосферными бактериями на инертных поверхностях и на поверхности корней растений.....	109

<i>3.3.1. Проведение детальных микроскопических исследований структур, образуемых ризосферными бактериями на инертных поверхностях.....</i>	110
<i>3.3.2. Оценка зависимости биопленкообразования диких и рекомбинантных ризобияльных штаммов от логарифма числа живых клеток при росте культур на несменяемой среде.....</i>	116
<i>3.3.3. Флуоресцентная микроскопия биопленок, образованных мечеными штаммами ризобактерий</i>	123
<i>3.3.4. Исследование возможности биопленкообразования рекомбинантными ризобияльными штаммами на поверхности корней</i>	126
3.4. Анализ влияния факторов окружающей среды на формирование биопленок ризобияльными штаммами.....	131
3.5. Определение ростостимулирующего эффекта ризосферных штаммов, синтезирующих модификаторы механизмов формирования биопленок на поверхности корней	139
<i>3.5.1. Стимуляция всхожести семян</i>	142
<i>3.5.2. Влияние ризобияльных штаммов на длину корней проростков салата латука, репы, козлятника восточного, огурца обыкновенного и клевера красного</i>	146
<i>3.5.3. Влияние ризобияльных штаммов на длину гипокотилей проростков семян козлятника восточного, огурца обыкновенного и клевера красного</i>	151
<i>3.5.4. Ростостимулирующий эффект ризобияльных штаммов на высоту стебля, а также ширину и длину большего листа на побеге, на примере растений огурца обыкновенного</i>	154
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	159
ВЫВОДЫ	165
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	167

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

В настоящее время в качестве альтернативы химическим удобрениям для повышения продуктивности важных сельскохозяйственных культур, а также их защиты от фитопатогенов, применяются биопленочные биоудобрения, которые представляют собой стимулирующие рост растений ризобактерии (PGPR), образующие микроколонии на поверхности корней растений (Вершинина и др., 2017а; Pathania et al., 2020). Важным представителем группы PGPR являются ризосферные бактерии рода *Rhizobium*, которые способны вступать в симбиоз с бобовыми растениями и фиксировать атмосферный азот, образуя клубеньки на их корнях (Клоерпер et al, 2003; Хакимова и др., 2017b; Asante et al., 2020; Palai et al., 2021; Purwaningsih et al., 2021).

Бобово-ризобиальный симбиоз является высокоспецифичным и каждый вид бобовых растений способен нодулироваться лишь ограниченным количеством видов ризобактерий. Тем не менее, было обнаружено, что некоторые штаммы ризобий обладают способностью формировать неспецифические ассоциативные взаимодействия с корнями небобовых растений, не образуя истинные клубеньки (Perrine-Walker et al., 2007; Palai et al., 2021). Однако такие системы не стабильны, потому что в естественных условиях ризобии, ввиду их недостаточной выживаемости и неспособности конкурировать с хорошо адаптированными местными штаммами микроорганизмов, вытесняются более агрессивными микроорганизмами, нередко оказывающими негативное воздействие на растения (Bottomley and Myrold, 2007; Ashraf, 2013). Решением данной проблемы является регулирование формирования биопленок ризобиями в ассоциативных симбиотических системах, так как существование ризобий в форме биопленок позволяет им поддерживать необходимую плотность клеток в течение достаточно длительного периода до момента взаимодействия с растением-хозяином (Vaigonussova et al., 2021). При этом они оказывают положительное влияние на растения через прямые или косвенные механизмы: ограничивают роль

фитопатогенных микроорганизмов, повышают доступность макро- и микронутриентов из окружающей среды и могут использоваться в качестве недорогой и экологически безопасной технологии устранения стресса растений (Вершинина и др., 2017a; Pathania et al., 2020; Sirghalage and Seneviratne, 2020). Показано, что такие экологические стрессы как засоление почв, засуха, избыток воды и воздействие патогенов, преодолеваются путем биопленкообразования (Rekadwad and Khobragade, 2017). При этом формирование биопленки ризобактериями также способствует и развитию симбиотических отношений, благодаря поддержанию необходимого уровня влажности ризосферы и pH почвы, которые, в свою очередь, приводят к усилению обмена питательных веществ и биоконтролю, обеспечивая развитие «здоровой» корневой системы растений (Wang et al., 2008; Williams et al., 2008; Perez-Gimenez et al., 2009).

Экзополисахариды (ЭПС), бактериальные поверхностные полисахариды, которые играют важную роль в биопленкообразовании ризобий, влияют на процессы адгезии ризобактерий к корням растений, а также образование клубеньков (Fujishige et al., 2006b; Russo et al., 2006; Wells et al., 2007; Rinaudi and Gonzalez, 2009; Rinaudi and Giordano, 2010). Более того, их синтез в симбиотических взаимодействиях также имеет большое значение, так как экзополисахариды вовлечены в инфицирование и образование клубеньков, в процесс бактериального освобождения от инфекционных нитей, развития бактериоидов, подавления реакции защиты растений и синтеза ими противомикробных соединений (Skorupska et al., 2006; Janczarek, 2011). Кроме того согласно результатам, полученным при исследовании влияния штаммов ризобий на всхожесть семян различных небобовых растений, инокуляция растений штаммами ризобий синтезирующими ЭПС, значительно увеличивает всхожесть семян и рост проростков небобовых растений (Лавина и др., 2014; 2016a; Хакимова и др., 2017b; Castellane et al., 2015).

Таким образом, зона почвы, непосредственно окружающая корень растения, где происходят сложные биологические и экологические процессы, называемая ризосферой, образует среду, которая отвечает всем требованиям для

формирования биопленок. Биоплекообразование позволяет неспорообразующим бактериям почвы колонизировать окружающую среду обитания и дает возможность выжить в условиях экологического стресса. Ключевую роль в процессах колонизации корней растений ризобиями и формирования биопленок играют ЭПС. Ввиду этого, получение искусственных симбиотических ассоциаций ризобий, синтезирующих ЭПС, в форме биопленочных биоудобрений является одним из наиболее перспективных направлений на пути создания экологически ориентированного сельского хозяйства.

Степень разработанности темы исследования

Ранее проведен ряд важных исследований, указывающий на то, что участвующие в процессах прикрепления к корням растений полисахариды бактериальной поверхности, в том числе и экзополисахариды, также могут иметь отношение и к развитию биопленок (Fujishige et al., 2006b; Williams et al., 2008; Rodriguez-Navarro et al., 2007; Ongena and Jacques, 2008; Rudrappa et al., 2008).

Несмотря на то, что существуют работы, посвященные роли ЭПС в бобово-ризобиальном симбиозе, механизмы, при которых данные метаболиты оказывают положительные эффекты на взаимодействия между хозяином и симбионтом, все еще остаются неизученными. Существующие на текущий момент знания о биосинтезе ЭПС были получены в результате всесторонних исследований сукциногликана, продуцируемого *S. meliloti*, а также биосинтеза ЭПС на примере *R. leguminosarum* (Janczarek et al., 2011; Ксензенко и др., 2007; Вершинина и др., 2020). Существенный вклад в изучение генов-регуляторов путей биосинтеза ЭПС у *R. leguminosarum*, а также их роли в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями внесли работы Skorupska и соавт. (2006), а также Janczarek и соавт. (2001, 2003, 2004, 2009).

Работы Fujishige и соавт (2005, 2006) в значительной мере способствовали исследованию биопленкообразования ризобиями. Авторы показали, что штаммы *R. leguminosarum* образуют биопленку на стерильных инертных поверхностях и ее формирование может быть усилено ограничением питательных веществ, например при использовании среды Хогланда-Арнона.

Большинство исследователей, изучающих ризосферные бактерии, не описывает формирование биопленок ризобиями на поверхности корней растений. Однако роль процессов биопленкообразования, как и в бобово-ризобияльном симбиозе, так и в ассоциативных симбиотических системах необходимо продолжать исследовать. Потому как механизмы формирования биопленок ризосферными бактериями и их адгезии на корнях растений еще не определены и пересматриваются. Выяснение процессов образования биопленок ризобактериями позволит регулировать их формирование в искусственных симбиотических системах, где большую роль играет колонизация корней растений.

Целью настоящего исследования являлось изучение молекулярных механизмов инициации и формирования биопленок ризосферными бактериями на поверхности корней растений в ассоциативных симбиозах путем использования в качестве модификаторов данных процессов генов-регуляторов путей синтеза экзополисахаридов ризобактерий. Для выполнения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Провести скрининг штаммов *R. leguminosarum*, изолированных из клубеньков бобовых растений, на предмет наличия в их геноме генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*, участвующих в биосинтезе экзополисахаридов.
2. Получить векторные конструкции, на основе плазмид широкого круга хозяев, содержащие гены, регулирующие биосинтез экзополисахаридов под управлением индуцибельных промоторов и трансформировать ризобии с полезными хозяйственными признаками полученными конструкциями.
3. Провести микроскопические исследования структуры биопленок, образуемых бактериями с измененной экспрессией генов, регулирующих биосинтез экзополисахаридов на абиотических и биотических поверхностях.
4. Оценить влияние факторов окружающей среды на формирование биопленок ризобияльными штаммами.
5. Определить ростостимулирующий эффект штаммов синтезирующих модификаторы механизмов формирования биопленок на поверхности корней.

Научная новизна работы

Обнаружено, что штаммы *R. leguminosarum*, в геноме которых отсутствуют гены *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE* характеризуются скудным ослизнением клеточных стенок по сравнению со штаммами с идентифицированными генами. Получены 12 рекомбинантных по генам *pssA* и *rosR* ризобияльных штаммов, меченных флуоресцентным белком GFP, а также 5 штаммов рекомбинантных по гену *pssB*. Выявлено, что наличие в геноме штаммов *R. leguminosarum* дополнительной копии гена *pssA* или *rosR* положительно влияет на эффективность образования биопленок, а дополнительной копии гена *pssB*, наоборот, уменьшает толщину биопленок. Проведена оценка зависимости биопленкообразования от числа живых клеток в отношении исследуемых диких и рекомбинантных штаммов. Выявлена корреляция между толщиной биопленок и концентрацией Ca^{2+} и питательных веществ в культуральной среде, а также температурным режимом. Проведены микроскопические исследования структур, образованных ризобияльными штаммами на инертных поверхностях и корнях растений. Собрана коллекция генетически охарактеризованных штаммов ризосферных бактерий, обладающих ростостимулирующей активностью на бобовые и небобовые растения.

Методология и методы исследования

Методологическая основа работы представлена системным подходом, позволяющим рассмотреть различные аспекты использования генов-регуляторов путей биосинтеза ЭПС ризобактерий в биопленкообразовании и их применение в биоинженерии искусственных симбиотических ассоциаций важных сельскохозяйственных растений с ризосферными микроорганизмами.

Для изучения генов-регуляторов биосинтеза ЭПС (*pssA*, *pssB*, *rosR*) ризобий использовались современные молекулярно-генетические методы: создание векторных конструкций на основе плазмид широкого круга хозяев под управлением бактериальных индуцибельных промоторов, клонирование и секвенирование последовательностей соответствующих генам ЭПС, для осуществления последующей трансформации ризобий путем электропорации.

При проведении исследования и изложения материала автором были применены общенаучные эмпирические методы – эксперимент, наблюдение и описание, теоритические и специальные методы, которые включали современные молекулярно-генетические методы и методы биоинформатического анализа.

Использованные методы и статистическая обработка экспериментального материала позволили обеспечить объективность полученных результатов.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные результаты расширяют представление о процессах биопленкообразования ризобиями. Исследованная коллекция штаммов ризобактерий, обладающих ростостимулирующей активностью, может быть рекомендована к созданию биопрепарата с ростостимулирующими свойствами. Применение подхода, основанного на модификации процессов инициации и формирования биопленок ризобиями, путем использования генов-регуляторов биосинтеза ЭПС ризобий – является перспективным направлением создания стабильных ассоциаций экономически ценных видов растений с ризобиями.

Положения, выносимые на защиту

1. Штаммы *R. leguminosarum*, в геноме которых отсутствуют гены *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*, характеризуются скудным ослизнением клеточных стенок по сравнению со штаммами с идентифицированными генами.
2. Наличие дополнительной копии гена *pssA* или *rosR* в ризобиальном геноме оказывает положительный, а в случае гена *pssB* отрицательный эффект на формирование биопленок.
3. Температурный режим, а также концентрация Ca^{2+} и питательных веществ в культуральной среде влияют на процессы биопленкообразования бактерий рода *Rhizobium*.
4. Инокуляция растений ризобиальными штаммами, в геноме которых присутствует дополнительная копия гена *rosR*, приводит к увеличению количества адгезированных клеток ризобий на корнях растений по сравнению с контрольными штаммами.

5. Штаммы *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12, *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4 и *R. galegae* 0702 могут быть использованы в основе препаратов биопленочных биоудобрений с целью повышения продуктивности полезных сельскохозяйственных культур.

Соответствие диссертации паспорту научной деятельности

Диссертационная работа «гены-регуляторы синтеза экзополисахаридов в формировании биопленок *Rhizobium leguminosarum*» соответствует формуле специальности 03.02.03 – «Микробиология», посвящена изучению и решению задач в области симбиозов микроорганизмов, а также применению микроорганизмов в народном хозяйстве. В диссертационной работе исследованы молекулярные механизмы инициации и формирования биопленок ризосферными бактериями на поверхности корней растений в ассоциативных симбиозах путем использования в качестве модификаторов данных процессов генов-регуляторов путей синтеза экзополисахаридов ризобактерий. Для этого были получены рекомбинантные ризобияльные штаммы, содержащие дополнительные копии генов *pssA*, *pssB* и *rosR* и изучены процессы формирования биопленок ризосферными бактериями на инертных поверхностях и на поверхности корней растений.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора.

Данная работа проводилась при финансовой поддержке следующих программ: РФФИ мол_а № 16-34-01076 «Формирование биопленок ризосферными бактериями на корнях несимбиотрофных растений»; РФФИ Инициативный № 16-04-00902 А «Бактериальные и растительные агглютинины в биоинженерии эффективных симбиотических систем».

Определение направления диссертационной работы, цели и задачи исследования проводились автором совместно с научным руководителем доктором биологических наук Баймиевым А. Х. Автором самостоятельно изучена отечественная и зарубежная литература по теме диссертации и лично написана рукопись данной работы. Автор непосредственно участвовал в подготовке материалов к публикации по диссертационной теме и их написании. Основная

часть экспериментальной работы: микроскопирование, выращивание бактериальных культур на различных средах, секвенирование, клонирование, конструирование вектора, трансформация, эксперименты с растениями выполнены автором самостоятельно. Суммарно личный вклад автора составляет более 80%.

Степень достоверности и апробация работы. Выявленные в работе результаты исследования согласуются с данными представленными в научной литературе. Их достоверность подтверждает проведенный статистический анализ, а также использование современных микробиологических, молекулярно-биологических и биохимических методов. Выводы полностью и в строгой логической последовательности соответствуют поставленным задачам и отражают полученные результаты.

Материалы диссертации были представлены на «II Всероссийской молодёжной научной школе-конференции с международным участием (Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах)» (Оренбург 2014 г.), международной конференции, посвященной фундаментальным вопросам агротехнологий «Эколого-генетические основы современных агротехнологий» (Санкт-Петербург, 2016 г.), VIII Всероссийской конференции молодых ученых "Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой" (Саратов, 2016 г.), «III Всероссийской молодёжной научной школе-конференции с международным участием (Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах)» (Оренбург 2017 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 35 печатных работ, в том числе 13 статей в журналах, входящих в Перечень ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 198 страницах, содержит 57 рисунков и 11 таблиц. Состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 257 работ.

Список сокращений и условных обозначений

ИУК – индолилуксусная кислота

ЭПС (EPS) – экзополисахариды

ЛПС (LPS) – липополисахариды

КПС (KPS) – капсульные полисахариды

NF – Nod-факторы

ИМР –инозитол монофосфатаза

АТЛ – N-ацетил-гомосеринлактон (AHL)

АИ – аутоиндуктор

КС (QS) – quorum sensing (система «чувства кворума»)

УМ-среда – маннитно-дрожжевая среда

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

GFP – зеленый флуоресцентный белок

RFP – красный флуоресцентный белок

FBB – грибково-бактериальные биопленки

FRB – грибково-ризобийальные биопленки

ББ – биопленочные биоудобрения

Сахариды:

Gal – D-галактоза

GalNAc – N-ацетил-D-галактозамин

GlcNAc – N-ацетил-D-глюкозамин

Glc – D-глюкоза

Man – D-манноза

Fuc – фукоза

Mal – мальтоза

GUS – β-глюкуронидаза

LB-среда – среда Лурия-Бертани

RAPD –произвольная амплификация полиморфной ДНК

ТАЕ – трис-ацетат-ЭДТА буфер

ТЕ – трис-ЭДТА буфер

БАВ – биологически активные вещества

ДДС натрия (SDS) – додецилсульфат натрия

П.н. – пара нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ (PEG) – полиэтиленгликоль

Т.п.н. - тысяча пар нуклеотидов

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ORF – открытая рамка считывания

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика и применение PGPR микроорганизмов

В 1978 г. Клоеппером и Шротом при описании свободноживущих почвенных бактерий, агрессивно колонизирующих корневую систему и способствующих росту и повышению продуктивности растений, был введен термин PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Kloepper et al., 2003; Hartmann et al., 2008; Dutta et al., 2010). Представители этой обширной группы микроорганизмов способны синтезировать и секретировать различные химические вещества, оказывающие положительный эффект на рост растений, а также формировать биопленки (Khoshru et al., 2020; Ahemad et al., 2014). Кроме того, являясь доминирующим микробным сообществом ризосферы, PGPR, влияют и на здоровье растений в целом, способствуя развитию устойчивости к различным абиотическим стрессам и усвоению питательных веществ растениями-хозяевами, а также их защите от фитопатогенных бактерий (Parray et al., 2016; Basu et al., 2021; Palai et al., 2021).

В группу стимулирующих рост растений ризобактерий включают представителей родов *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Arthrobacter*, *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Chromobacterium*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Frankia*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Mesorhizobium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces* и др. (Goswami et al., 2016; Ankati et al., 2018; Kalam et al., 2020; Swarnalakshmi et al., 2020).

PGPR, благодаря многогранности их способов действия, включая колонизацию корней растений, положительное влияние на физиологию растений, запуск индуцированной системной устойчивости, биоконтроль фитопатогенов и т. д., способствуют защите растений (Lucy et al., 2004; Vejan et al., 2016; Kalam et al., 2020; Swarnalakshmi et al., 2020). Существует ряд работ, посвященных анализу механизмов действия PGPR и их особого вклада в процессы ростостимуляции (Goswami et al., 2016; Backer et al., 2018; Dutta et al., 2010; Swarnalakshmi et al.,

2020). Более того, показано, что инокуляция семян или корней небобовых растений ризобактериальными штаммами, обладающими способностью синтезировать растительные гормоны, стимулирует их рост и повышение урожайности (Chandra et al. 2007; Pena and Reyes 2007; Хакимова и др., 2017b; Khoshru et al., 2020). В виду этого, одним из решений глобальной продовольственной проблемы, является использование PGPR в роли ростостимулирующего агента, так как это позволило бы существенно повысить урожайность важных сельскохозяйственных культур, а также снизить применение химических удобрений.

Механизмы действия PGPR традиционно подразделяются на прямые и косвенные. К прямым относится улучшение питания растений путем предоставления им фитонутриентов (например, азота) или растворенных минералов почвы (например, P, K, Zn, Fe и других важных минеральных веществ), а также стимулирование роста и развития растений через регулирование уровня фитогормонов (таких как ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая кислота и этилен) (Ashraf, 2013; Vejan et al., 2016; Gouda et al., 2018; Kalam et al., 2020; Swarnalakshmi et al., 2020). Косвенные эффекты PGPR включают в себя влияние на здоровье растений при подавлении действия фитопатогенов и других микроорганизмов, ведущих паразитический образ жизни, конкуренцию за питательные вещества и нишу в ризосфере, путем синтеза антагонистических веществ (например, цианида водорода (HCN), сидерофоров, антибиотиков и антимикробных метаболитов), а также литических ферментов (таких как хитиназы, глюканазы и протеазы), вызывающих системную устойчивость растений против широкого спектра патогенов корней и листьев (Islam et al., 2016; Berg et al., 2017; Sayyed et al., 2019; Swarnalakshmi et al., 2020). Однако, воздействия, оказываемые ризобактериями, отличаются в зависимости от вида растения, с которым происходит взаимодействие (García-Fraile et al., 2015), а также различных биотических и абиотических факторов, среди которых: генотип растения, стадия его развития, защитные механизмы растений и присутствие

других членов микробного сообщества, тип почвы, ее состав, а также условия окружающей среды (Vacheron et al., 2013; Gouda et al., 2018).

Важным представителем группы PGPR являются клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*, которые способны вступать в симбиоз с бобовыми растениями (Klopper et al, 2003; Хакимова и др., 2017b; Asante et al., 2020; Palai et al., 2021; Purwaningsih et al., 2021). Бобово-ризобиальный симбиоз высокоспецифичен – бобовые растения нодулируются ограниченным количеством видов ризобактерий. Тем не менее, было обнаружено, что некоторые штаммы ризобий обладают способностью формировать неспецифические ассоциативные взаимодействия с корнями других растений (небобовых), не образуя истинные клубеньки, однако такие системы не стабильны, и их получение сопряжено с определенными трудностями (Ashraf, 2013). Тем не менее, широкое применение ризобий при обработке бобовых и небобовых культур вызывает большой интерес, так как данные микроорганизмы являются идеальными кандидатами для разработки и коммерциализации биопрепаратов, которые увеличивают массу растений и повышают их урожайность (Matiru et al., 2005 a,b; Тихонович, Круглов, 2006; Pena and Reyes, 2007; Seneviratne, et al., 2009).

1.2. Ризобиальные экзополисахариды: регуляция биосинтеза и роль в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями

Развитие симбиотических отношений между ризобиями и растением-хозяином зависит не только от генов, необходимых для установления симбиоза и расположенных в основном на ρ Sum плаزمиде, но и от генов, ответственных за синтез различных типов полисахаридов клеточной поверхности (Downie et al., 2010; Gibson et al., 2008). Поверхность ризобиальных клеток содержит множество макромолекул: расположенные на внешней мембране липополисахариды (LPS), капсульные полисахариды (CPS), гелеобразующие полисахариды (GPS), экзополисахариды (ЭПС), полисахариды К-антигена (KPS), циклические β -(1,2) глюканы и высокомолекулярные нейтральные полисахариды (NP или глюкоманнан) (Laus et al., 2006; Castellane et al., 2015; Skorupska et al., 2006;

Janczarek, 2011). Несмотря на обширные исследования, молекулярные функции поверхностных полисахаридов в бобово-ризобиальном симбиозе остаются невыясненными.

Некоторые экзополисахариды особенно важны для инфицирования и приводят к образованию недетерминированных (с постоянной меристемой) клубеньков на бобовых растениях, таких как клевер, вика, горох или люцерна. Синтез ЭПС в симбиотических взаимодействиях *Rhizobium leguminosarum* с клевером имеет особо важное значение. Накопленные данные свидетельствуют о том, что экзополисахариды могут быть вовлечены в инфицирование и образование клубеньков, бактериального освобождения от инфекционных нитей, развития бактериоидов, подавления реакции защиты растений и синтеза ими противомикробных соединений (Janczarek et al., 2007; Вершинина и др., 2020). Согласно результатам, полученным при исследовании влияния ризобактерий на всхожесть семян различных растений, показано, что инокуляция растений штаммами ризобий синтезирующими экзополисахариды значительно увеличивает всхожесть семян и рост проростков растений (Лавина и др., 2016а, Хакимова и др., 2017b; Castellane et al., 2015).

1.2.1. Структура ризобиальных экзополисахаридов

Экзополисахариды, синтезируемые ризобиями, представляют собой различные видоспецифичные гетерополимеры, состоящие из линейных или разветвленных повторяющихся звеньев, содержащих моносахариды, такие как D-глюкоза, D-галактоза, D-манноза, L-рамноза, D-глюкуроновая кислота и D-галактуроновая кислота, обычно замещенная неуглеводными группами (например, ацетильная, пирувильная, сукцинильная и 3-гидроксипутаноильная группы) (Castellane et al., 2015; Laus et al., 2005) (рис. 1).

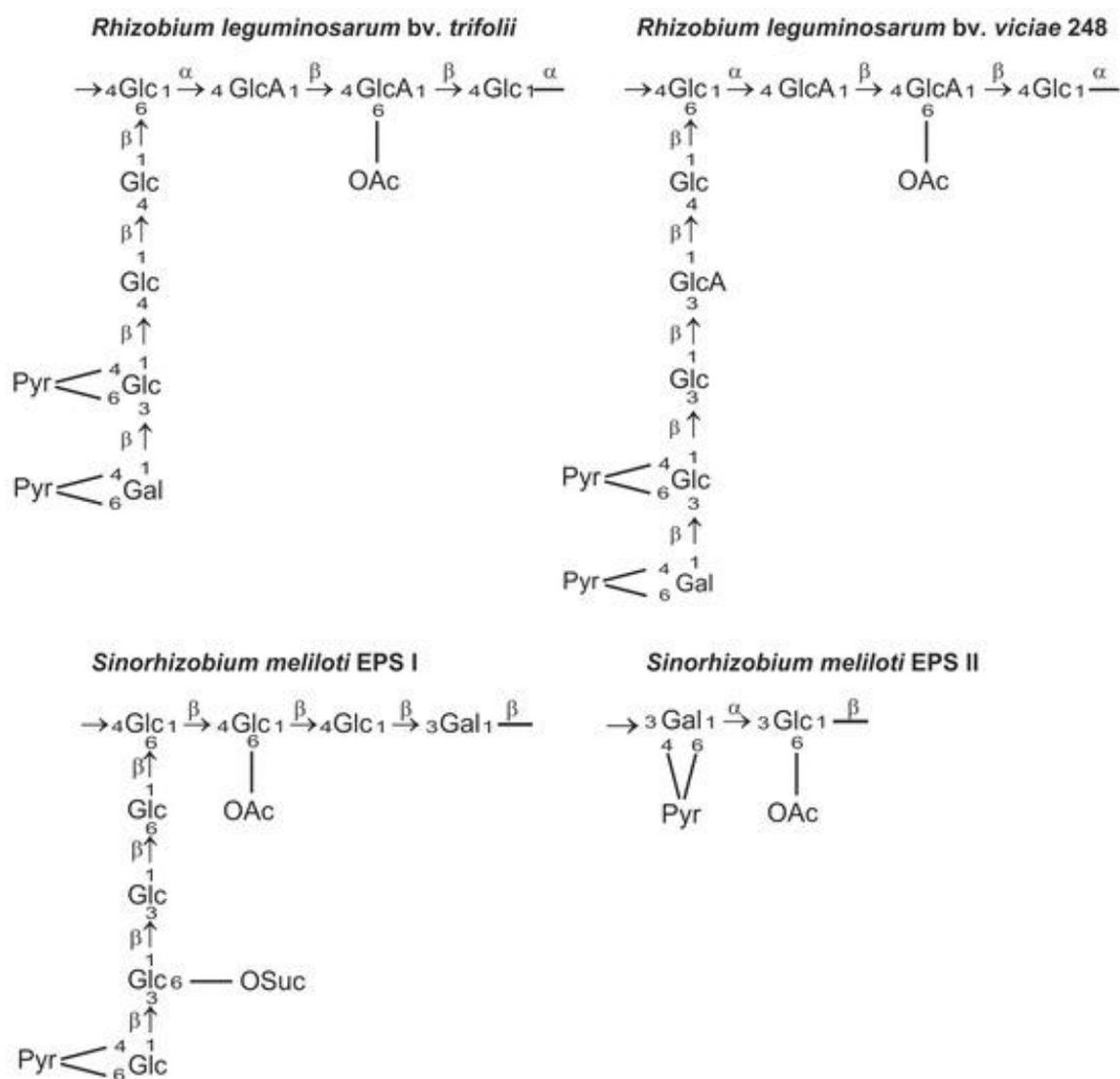


Рисунок 1. Структура ризобияльных экзополисахаридов: *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *S. meliloti* ЭПС I, *S. meliloti* ЭПС II. Glc, глюкоза; GlcA, глюкуроновая кислота; Gal, галактоза; OAc, ацетил; Pyr, кетальпируват; OSuc, сукцинильные группы (Skorupska et al., 2006).

Гетерогенность экзополисахаридных структур, а также разнообразие гликозидных связей и степень полимеризации повторяющейся единицы отражаются в сложном пути биосинтеза ЭПС (Castellane et al., 2015; Janczarek, 2011).

Экзополисахариды – это внеклеточные полимеры, которые слабо связаны с бактериальной поверхностью и, благодаря этому, обильно выделяются в окружающую среду. Многочисленные и разнообразные функции, выполняемые этим гетерополимером (включая защиту от различных стрессов, образование

био пленок и прикрепление к абиотическим поверхностям и корням растений-хозяев, а также получение питательных веществ), придают ризобактериям адаптивные экологические преимущества. Преобладание ЭПС в различных бактериях и их функции являются причиной того, что этому секретируемому полисахариду уделяется особое внимание исследователей (Downie et al., 2010; Skorupska et al., 2006).

1.2.2. Гены-регуляторы синтеза экзополисахаридов у *R leguminosarum*

Гены, регулирующие биосинтез экзополисахаридов, многочисленны и располагаются в больших кластерах либо на хромосоме, либо на мегаплазмидах (Finan et al., 2001; Gonzalez et al., 2006; Krol et al., 2007; Young et al., 2006). В мегаплазмиде pSymB *S. meliloti* был обнаружен большой (> 30 т.п.н.) кластер из 28 генов *exo/exs*. Гены кодируют ферменты, необходимые для синтеза предшественников сахаров и белков, участвующих в сборке и модификации, а также тех, которые необходимы для полимеризации повторяющихся единиц и транспорта ЭПС вне клетки (Skorupska et al., 2006). Показано, что существует несколько других генов, необходимых для биосинтеза ЭПС I и регуляции этого процесса, обнаруженных рассредоточенными по хромосоме *S. meliloti* (Skorupska et al., 2006). Многочисленные гены, участвующие в биосинтезе поверхностных полисахаридов, также были обнаружены рассредоточенными и в геноме *R. leguminosarum*. Так, например, ген *exoB*, участвующий в биосинтезе различных гетерополисахаридов (ЭПС, CPS, LPS, GPS, глюкоманнан) (Laus et al., 2006), был обнаружен в хромосоме, в то время как регуляторные гены *psi* и *psr*, расположены на симбиотической плазмиде (pSym), а гены *rosR*, *exoR* (Janczarek et al., 2007) и *pssB* (Janczarek et al., 1999) расположены в другом месте хромосомы.

Гены, участвующие в синтезе предшественников нуклеотидных сахаров, а также гены, участвующие в синтезе и экспорте ЭПС, расположены на хромосоме *R. leguminosarum*, и большинство из них сгруппированы в большой кластер, называемый Pss-I (Krol et al., 2007).

Известно два гена *exoB* и *exo5*, ответственные за синтез предшественников сахаров, которые были идентифицированы у *R. leguminosarum*. Ген *exoB* кодирует фермент UDP-глюкозо-4-эпимеразу, необходимую для синтеза UDP-галактозы, которая является донором этого сахара в процессе синтеза ЭПС и других полисахаридов, содержащих галактозу (Laus et al., 2004). Мутантные по гену *exoB* штаммы синтезируют ЭПС, лишенные галактозы в повторяющихся единицах и, практически, не способны проникать в корни растений-хозяев, вызывая образование клубеньков. Ген *exo5*, расположенный в кластере Pss-I, кодирует UDP-глюкозодегидрогеназу, которая отвечает за превращение UDP-глюкозы в UDP-глюкуроновую кислоту. Штаммы *R. leguminosarum* дефектные по гену *exo5* демонстрировали плеiotропные эффекты, включая изменения в оболочке бактериальных клеток и ухудшение симбиотических взаимодействий (Laus et al., 2004) и не синтезировали ни UDP-глюкуроновую, ни UDP-галактуроновую кислоту, и, следовательно, ЭПС (Muszynski et al., 2016).

Сборка повторяющихся звеньев ЭПС иницируются путем переноса глюкозо-1-фосфата с UDP-глюкозы на носитель C55-изопренилфосфата (IP), который расположен на внутренней мембране. Эта стадия синтеза ЭПС обеспечивается глюкозил-IP-трансферазой кодируемой геном *pssA*, который представлен открытой рамкой считывания и расположен на большом расстоянии от других генов *pss* (Janczarek et al., 2001). Ген *pssA* является очень консервативным геном, который присутствует не только у бактерий вида *R. leguminosarum* (Janczarek et al., 2003), но и у других близкородственных видов, таких как *Rhizobium etli* и *Rhizobium gallicum* (Janczarek et al., 2009). Мутации в гене *pssA* полностью подавляют синтез ЭПС и приводят к образованию клубеньков недетерминированного типа на корнях растений-хозяев (клевера, гороха и люцерны) (Janczarek et al., 2009). Экспрессия этого ключевого для биосинтеза ЭПС гена находится под строгим контролем (Janczarek et al., 2004). При этом внутри клубеньков экспрессия гена *pssA* находится на очень низком, почти неопределяемом уровне (Skorupska et al., 2006).

Расположенный перед геном *pssA*, ген *pssB* участвует в отрицательной регуляции синтеза ЭПС. Мутантные по гену *pssB* штаммы продуцируют большее количество ЭПС по сравнению со штаммами дикого типа, но при этом индуцируют образование неспособных фиксировать азот клубеньков на корнях клевера и люцерны (Kutkowska et al., 2007). Было показано, что наличие дополнительных копий этого гена в штаммах дикого типа приводит к снижению уровня синтезируемых ЭПС (Janczarek et al., 2001). Ген *pssB* кодирует белок, принадлежащий к семейству инозитолмонофосфатаз (IMP-ases). Данные ферменты представлены как в прокариотических, так и в эукариотических клетках (Kutkowska et al., 2007; Janczarek et al., 2001). У млекопитающих инозитолмонофосфатазы отвечают за регенерацию фосфолипидов, содержащих инозитол, так как участвуют в превращении инозитолмонофосфата в инозитол. Однако роль инозитолмонофосфатаз в метаболизме ризобий неясна. Этот фермент может генерировать пул инозита, который является соединением, обычно встречающимся внутри бактериоидов *R. leguminosarum* и *B. japonicum*, а также часто встречаются в клубеньках гороха и сои. С другой стороны, катаболизм инозита, по-видимому, важен для выживания и конкурентности ризобиальных штаммов, что имеет решающее значение для успешного проникновения ризобий в клетки корня растения-хозяина (Janczarek et al., 2001).

Помимо генов *pss*, есть и другие гены, необходимые для синтеза ЭПС, но не обязательно непосредственно вовлеченные в этот процесс. Они также присутствуют в кластере Pss-I. К ним относятся гены *plyA*, *prsD* и *prsE*, расположенные близко к оперону *pssCDE* (Król et al., 2007). Гены *prsD* и *prsE* кодируют компоненты системы секреции белка типа I, которая присутствует во всех биоварах *R. leguminosarum* (Long et al., 2001). Эта система секреции проявляет атипично широкую субстратную специфичность, экспортируя по меньшей мере 13 субстратов, среди которых гликаназы (PlyA, PlyB и PlyC), ризобиальные адгезионные белки (RapA2, RapB и RapC), а также белок NodO (Ausmees et al., 2001; Krehenbrink et al., 2008) Гликозилгидролазы PlyA и PlyB расщепляют ЭПС. (Zorreguieta et al., 2000; Krehenbrink et al., 2008). Мутантные по

гену *prsD* штаммы синтезируют ЭПС с более высокой степенью полимеризации по сравнению со штаммами дикого типа, и способствуют образованию большого количества клубеньков, неспособных к фиксации азота (Russo, 2006).

Важную роль в процессах экспрессии генов *pss* в ответ на сигналы окружающей среды играет ген *rosR*, который кодирует транскрипционный регулятор, участвующий в синтезе ЭПС. Транскрипция нескольких *pss*-генов, в том числе *pssA* и *pssB*, опосредована работой данного гена. Весьма консервативный ген *rosR* был идентифицирован на хромосоме *R. leguminosarum* (Janczarek et al., 2007). Данный ген был выявлен в геноме штаммов *R. leguminosarum*, а также у близкородственных видов *R. etli* и *R. gallicum*. Этот факт указывает на важную регуляторную роль гена *rosR* и у других ризобийных видов (Janczarek et al., 2009). Ген *rosR* также имеет значительную идентичность с геном *ros* у *Agrobacterium tumefaciens* (Chou et al., 1998), с геном *rosAR* у *A. radiobacter* (Hussain et al., 1997) и с геном *mucR* у *S. meliloti*. Все эти гены кодируют регуляторы транскрипции, принадлежащие к семейству белков Ros/MucR, которые имеют мотивы цинкового пальца C₂H₂-типа и участвуют в регуляции синтеза ЭПС. В результате проведенного генетического скрининга генома выявлено, что белок RosR у *R. etli* оказывает влияние на экспрессию многих функционально разнообразных генов, среди которых представлены ответственные за синтез и модификацию поверхностных полисахаридов (*pssK* и *plyA*, *exoB*, *prsD*,) (Bittinger et al., 2000). Мутантные по гену *rosR* штаммы *R. leguminosarum* демонстрируют низкий уровень синтеза ЭПС и не вступают в симбиотические отношения с клевером, а наличие дополнительных копий этого гена в 2 раза увеличивает количество синтезированных ЭПС (Janczarek et al., 2009; Janczarek et al., 2007). Что, в свою очередь, указывает на то, что ген *rosR* является положительным регулятором этого процесса. Более того, мутантные по гену *rosR* штаммы демонстрируют и другие эффекты: снижение отношения низкомолекулярной к высокомолекулярной фракциям ЭПС, повышенную чувствительность к поверхностно-активным детергентам и некоторым осмолитам, а также снижение подвижности и конкурентоспособности клубеньков,

количественные изменения в полисахаридной составляющей ЛПС, изменения в мембранах и секретлируемых профилях белка (Janczarek et al., 2010). Но самым ярким эффектом мутации гена *rosR* является значительное снижение колонизации и адгезии к корневым волоскам, что свидетельствует о том, что мутации в гене влияют на начальные этапы инфекционного процесса. При этом, наличие дополнительных копий гена *rosR* значительно повышает конкурентоспособность и образование клубеньков у *R. leguminosarum*, подтверждая существенную роль этого гена в симбиозе (Janczarek et al., 2007). На экспрессию *rosR* влияют такие факторы окружающей среды, как источники углерода, фосфатов и флавоноиды. Те же внешние факторы влияют и на уровень производства ЭПС в *R. leguminosarum* (Janczarek and Skorupska, 2011; Вершинина и др., 2021).

1.2.3. Wzx/Wzy-зависимый биосинтез экзополисахаридов у *R. leguminosarum*

Как правило, полисахариды могут быть полностью синтезированы в цитоплазме перед транспортировкой за пределы клетки или с помощью механизма, при котором повторяющиеся субъединицы сначала синтезируются в цитоплазме, а затем транспортируются в периплазму для полимеризации, а затем секреции (Islam and Lam, 2014; Schmid et al., 2015). Экзопалисахариды синтезируются по второй схеме, так называемый Wzx/Wzy-зависимый синтез с участием двух ключевых белков: Wzx (флиппаза) и Wzy (полимераза). Эти белки отсутствуют в системах биосинтеза полисахаридов, основанных на активности АТФ-связывающих кассет (ABC)-транспортеров (Greenfield et al., 2012) или синтазы (например, альгината, продуцируемого *Pseudomonas*) (Whitney and Howellet, 2013). Полисахариды, такие как декстран, продуцируются секретлируемым или ассоциированным с клеткой внеклеточным ферментом (Schmid et al., 2015).

В случае пути зависящего от переносчика ABC, полисахарид (в основном капсульный) синтезируется в цитоплазме и впоследствии транспортируется через периплазму белком семейства ABC. Если в области генов биосинтеза полисахаридов кодируется только одна гликозилтрансфераза, продуцируемый

полисахарид является гомополимером, а если имеется больше генов, кодирующих гликозилтрансферазы, образуется гетерополимер (Whitney and Howellet, 2013). Полисахариды, такие как курдлан, целлюлоза или альгинат синтезируются и транспортируются из цитоплазмы с помощью мембранной синтазы, которая представляет собой процессивную гликозилтрансферазу, способную образовывать полимер и способствовать прохождению полимера через мембрану. Полимер транспортируется за пределы клетки с участием периплазматического белка, действующего как каркас и предотвращающего деградацию полисахарида, и β -цилиндрического белка, расположенного во внешней мембране. Белки этой системы не связаны с компонентами Wzx/Wzy-зависимой и ABC-транспортной систем (Whitney and Howellet, 2013).

В Wzx/Wzy-зависимом пути субъединицы олигосахаридных повторов сначала синтезируются вместе с так называемым липидным якорем ундекаprenилфосфатом (undPP) из-за активности специфических гликозилтрансфераз. Биосинтетические предшественники, то есть активированные производные нуклеотидных сахаров (NDP-сахара), синтезируются в цитоплазме поверх und-PP. Полные олигосахаридные повторяющиеся единицы переносятся из цитоплазмы в периплазматические створки внутренней мембраны за счет активности флиппазы Wzx (Islam et al., 2016). Еще, будучи закрепленными на внутренней мембране, они соединяются в периплазме с помощью полимеразы Wzy. В процессе сборки последнего полисахарида участвует белок, лишенный полимеризационной активности, но незаменимый в процессе и участвующий в регуляции длины цепи, так называемая полисахаридная сополимераза (PCP) (Islam and Lam, 2014). Затем возникающая полисахаридная цепь экспортируется за пределы клетки (рис. 2).

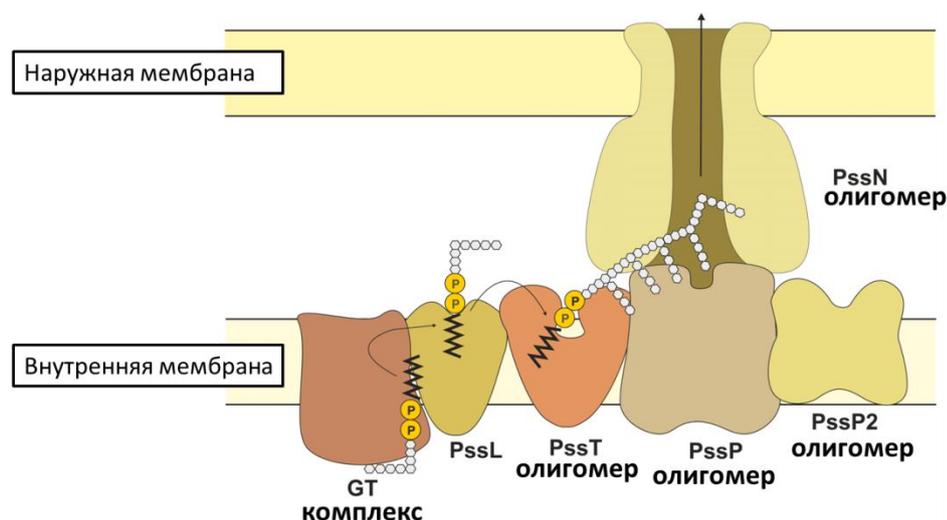


Рисунок 2. Предположительная модель топологии транспортной системы ЭПС *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

Модель является результатом компиляции имеющихся данных о ключевых белках, действующих в транспортной системе Wzx/Wzy, и экспериментальных данных по *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Экзополисахаридные октасахаридные субъединицы собираются на липидном носителе гликозилтрансферазами. Гликозилтрансферазы показаны как единый блок, что предполагает наличие комплекса (на данный момент не подтверждено экспериментальными данными). Экзополисахаридные октасахариды перемещаются к наружной створке внутренней мембраны и, предполагается, что PssL способствует выполнению этого процесса. Затем субъединицы полимеризуются за счет согласованного действия полимеразы PssT и олигомерной сополимеразы PssP. Синтезирующие и транспортные белки взаимодействуют в сложной сети, в которой наиболее заметны взаимодействия: PssT-PssP и PssP-PssN. Белок PssP2 кодируется в области Pss-II, но также было показано, что он влияет на длину полимеров ЭПС и взаимодействует с PssP и PssT (Islam et al., 2016).

1.2.4. Геномные регионы, участвующие в биосинтезе ЭПС

Основной набор генов биосинтеза ЭПС *R. leguminosarum* насчитывает более 20 генов и сгруппирован в хромосомной области, названной Pss-I (Gonzalez et al., 2006; Krol et al., 2007; Young et al., 2006) (рис. 3).

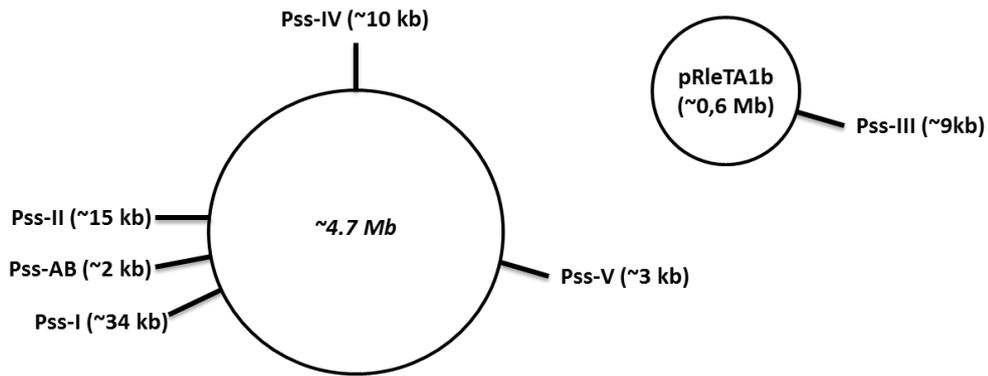


Рисунок 3. Геномная локализация и генетическая организация идентифицированных регионов Pss у *Rhizobium leguminosarum* TA1. Области Pss-I, Pss-II и гены *pssAB* связаны в области 200 т.п.н. в хромосоме. Другие области Pss расположены либо на хромосоме, либо на плазмиде pRleTA1b.

Область Pss-I содержит гены, кодирующие гликозилтрансферазы, ответственные за синтез субъединиц ЭПС (за исключением гена *pssA*, кодирующего белок, участвующий в первой стадии синтеза ЭПС, ответственный за добавление глюкозо-1-фосфата к полипренилфосфатному носителю) (Janczarek et al., 2013) и гены, продукты которых образуют систему сборки и экспорта ЭПС, т.е. предполагаемую флиппазу (Mazur et al., 2005), полисахаридную полимеразу (Mazur et al., 2003), белок сополимеразы (Mazur et al., 2002) и белок канала внешней мембраны (Marczak et al., 2006) (рис. 4).

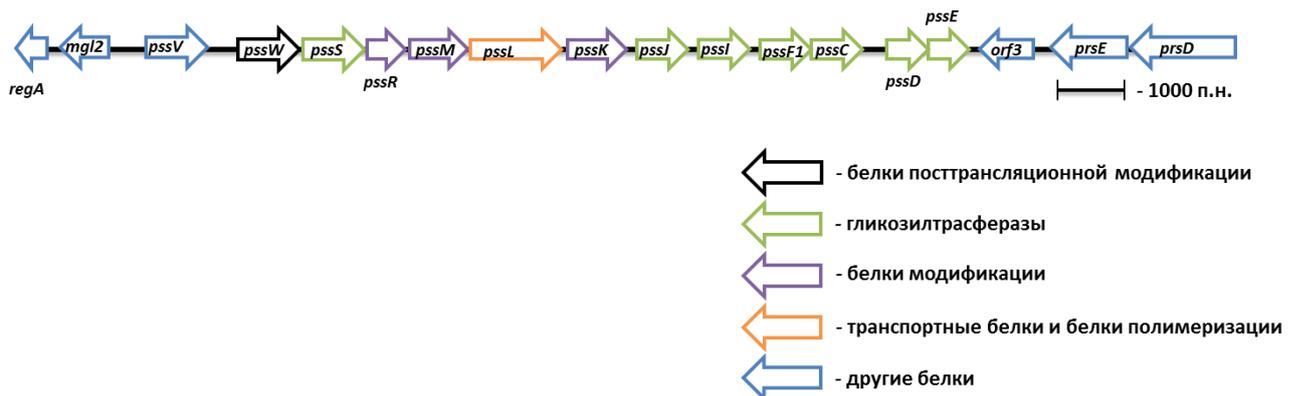


Рисунок 4. Генетическая организация кластеров генов Pss-I. Область Pss-I, группа экспериментально охарактеризованных генов, связанных с биосинтезом ЭПС. Гены/ORF (открытая рамка считывания) окрашены в соответствии с аннотированными или экспериментально подтвержденными функциями на последующих этапах биосинтеза экзополисахаридов.

Локус Pss-I высококонсервативен и схож между *R. leguminosarum* bvs. *trifolii* и *viciae*, а также имеет мало отличий с близкородственными *R. etli*. Сохранение консервативного порядка генов обычно не является случайным признаком, потому что соответствующее соседство генов дает клетке адаптивное преимущество (Guerrero et al., 2005). Таким образом, кластеризация основного набора генов ЭПС кажется не случайной и, вероятно, отражает их скоординированную экспрессию и точную, сложную регуляцию, осуществляемую как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях, на что дополнительно влияют многочисленные факторы окружающей среды, а также рост и стрессовые факторы (Vonomi et al., 2012; Ciesla et al., 2016).

На данный момент имеется относительно мало информации о гликозилтрансферазах – представителях белков, участвующих в биосинтезе экзополисахаридов у ризобий. В целом гликозилтрансферазы представляют собой разнообразное семейство белков, которые описаны в содержании растущей базы данных CAZy (углеводно-активные ферменты) (Lombard, et al., 2014). Связь между аминокислотной последовательностью предполагаемой гликозилтрансферазы и ее специфичностью не очевидна, что затрудняет прогнозирование ее функции на биоинформатическом уровне (Schmid et al., 2015; Becker et al., 2017). Функции ферментов, активных на различных стадиях синтеза субъединиц сукциногликана, и фенотипические эффекты мутаций были охарактеризованы на модели *S. meliloti* (Skorupska et al., 2006). Однако информации о взаимодействиях между гликозилтрансферазами и предполагаемыми взаимоотношениями между гипотетическим комплексом гликозилтрансфераз и белками, активными на более поздних стадиях синтеза, нет. В работах Janczarek и соавт. (2013), описываются функции нескольких гликозилтрансфераз, кодируемых внутри и вне области Pss-I у *R. leguminosarum*. Среди них наиболее изучена праймирующая глюкозилизопренилфосфат (IP)-трансфераза PssA, инициализирующая синтез октасахаридов путем переноса глюкозы в липид-связанный undPP (Janczarek et al., 2013; Janczarek et al., 2003). Глюкуронозил- β -1,4-глюкозилтрансфераза PssDE переносит глюкуроновую

кислоту на глюкозу (Janczarek et al., 2017), а другой остаток глюкуроновой кислоты переносится глюкуронозил- β -1,4-глюкуронозилтрансферазой PssC (Pollock et al., 1998). Мутации в генах, кодирующих гликозилтрансферазы, могут приводить к полному ингибированию синтеза ЭПС (*pssA*, *pssE*, *pssD*) (Janczarek et al., 2017; Janczarek et al., 2003) или к снижению уровня синтеза, как в случае мутанта *pssC* (Guerreiro et al., 2000). Последний результат интересен, поскольку мутация не блокирует полимеризацию субъединиц, указывая на то, что специфичную клеточную функцию берет на себя другой белок. Ферменты, участвующие в более поздних стадиях синтеза субъединиц, подробно не исследованы. Известно, что *pssS* кодирует гипотетический белок, похожий на гликозилтрансферазу с GT-B-складкой (класс инвертирующих гликозилтрансфераз с характерной топологией, состоящей из двух $\beta/\alpha/\beta$ доменов Россмана, которые обращены друг к другу и гибко связаны), наиболее вероятно участвует в четвертом этапе сборки единицы, т.е. присоединении последнего остатка глюкозы к основной цепи (Janczarek et al., 2015). Биоинформатический анализ показал, что не охарактеризованные гипотетические гены гликозилтрансфераз, участвующие в биосинтезе ЭПС, могут присутствовать среди белков, кодируемых в области Pss-I. Стоит отметить, что во всех случаях данные, касающиеся гликозилтрансфераз у ризобий, ограничиваются подтверждением участия в биосинтезе ЭПС или функции, определенной на основе сходства аминокислотных последовательностей. Механизмы действия, субстратная специфичность, доменная структура или взаимодействия между гликозилтрансферазами и взаимодействия с другими белками еще предстоит расшифровать.

Pss-I – не единственный кластер генов, участвующих в синтезе полисахаридов у *R. leguminosarum*. Всего существует еще четыре области (обозначенные как Pss-II-Pss-V) с генами-кандидатами идентифицированные как на хромосоме, так и на плазмиде pRleTA1b (Krol et al., 2007) (рис. 3).

Кластер Pss-II, расположенный примерно в 200 т.п.н. от области Pss-I, был почти идентичен с точки зрения последовательности и порядка генов

соответствующей части хромосомы *R. leguminosarum* bv. *viciae* с лишь незначительными изменениями по сравнению с *R. etli*. Было высказано предположение о том, что Pss-II может участвовать в биосинтезе LPS, ЭПС или CPS, поскольку он группирует гены, организация и сходство последовательностей которых указывают на гипотетические функции гликозилтрансфераз, полимераз Wzy-типа, флиппазы Wzx-типа, транслоказы Wza-типа и PCP сополимераза, т. е. ключевых компонентов Wzx/Wzy-зависимой системы (Krol et al., 2007; Marczak et al., 2014) (рис. 5).

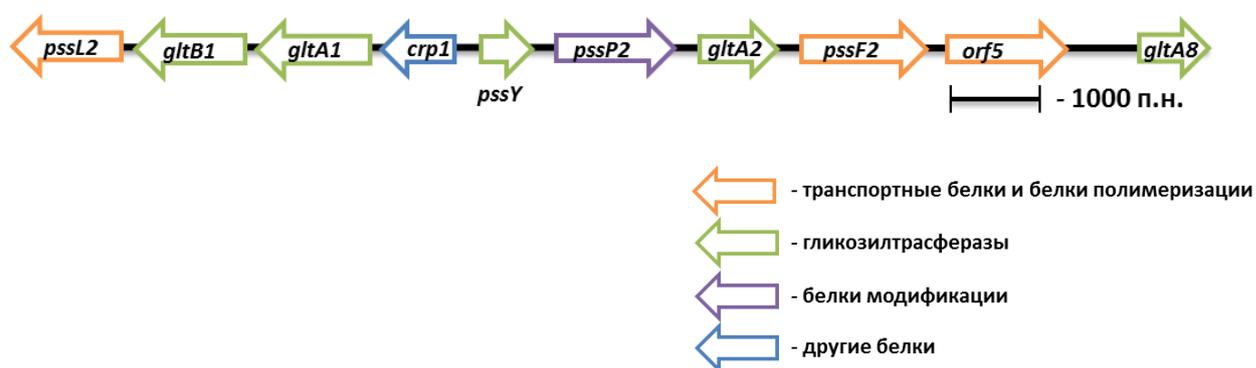


Рисунок. 5. Генетическая организация кластеров генов Pss-II. Гены, расположенные в области Pss-II, были идентифицированы по сходству с ключевыми элементами Wzx/Wzy-зависимого пути. Гены/ORF (открытая рамка считывания) окрашены в соответствии с аннотированными или экспериментально подтвержденными функциями на последующих этапах биосинтеза экзополисахаридов.

Pss-III представляет собой область биосинтеза полисахаридов, с неизвестной функцией, которая расположена на плазмиде pRleTA1b. Высокоомологичный сегмент был обнаружен и в *R. leguminosarum* bv. *viciae*, но не был найден в геноме *R. etli*. Pss-IV и Pss-V также являются участками биосинтеза хромосомных полисахаридов, предположительно функционально связанными с биосинтезом LPS. Множественные Pss участки могут кодировать альтернативные пути синтеза поверхностных полисахаридов. Например, у *R. leguminosarum* кислый CPS имеет сходную или даже идентичную структуру с кислым ЭПС, отличаясь только неуглеводными остатками (Marczak et al., 2017). Так, гены кластеров Pss-I, Pss-II и Pss-III могут вносить вклад в биосинтез CPS у

R. leguminosarum. Таким образом, можно предположить, о возможном функциональном перекрытии генов путей биосинтеза полисахаридов, расположенных в разных регионах, что подтверждается плейотропными эффектами, вызываемыми мутациями в генах *pss* (Wielbo et al., 2004).

В *R. leguminosarum* и *R. etli* большинство генов биосинтеза полисахаридов являются хромосомными и не связаны с кластером генов *exo/exs*, расположенном на плазмиде pExo как у *S. meliloti* (Finan et al., 2001). Тем не менее, плазмиды не являются полностью незаменимыми в отношении биосинтеза поверхностных структур. Некоторые локусы синтеза полисахаридов были картированы вне хромосом в *R. leguminosarum* bvs. *trifolii* и *viciae*, а также в *R. etli* (Krol et al., 2007; Young et al., 2006). Штаммы, у которых присутствует плазида pRleTA1b синтезируют более высокие количества ЭПС по сравнению с диким типом, что свидетельствует о существовании сложной регуляторной сети синтеза ЭПС, состоящей из генов, расположенных на разных плаزمиде и особенно на pSym (Stasiak et al., 2014). Ранее было показано, что внехромосомные репликоны придают бактериям значительную метаболическую гибкость, что важно для их адаптации в почве и конкурентоспособности клубеньков, а также может быть вызвано модуляцией состава поверхности ризобий (Mazur et al., 2013).

1.2.5. Роль ЭПС в бобово-ризобиальном симбиозе

Несмотря на то, что существует множество исследований, посвященных роли ЭПС в бобово-ризобиальном симбиозе, механизмы, при которых ЭПС оказывают полезные эффекты на взаимодействия между хозяином и симбионтом у бобовых растений, в основном, все еще остаются неизученными (Marczak et al., 2017). Однако было описано несколько открытий, касающихся симбиотической функции ЭПС. Было показано, что у ризобий, формирующих детерминированные клубеньки, ЭПС играют сигнальную роль на более поздних стадиях установления симбиоза, как инициации роста инфекционных нитей, так и высвобождения бактерий в симбиозе с *Lotus japonicus* (Kelly et al., 2017). Мутантные штаммы *M. loti*, с нарушенными средними или поздними стадиями биосинтеза ЭПС,

индуцировали образование неинфицированных клубеньков, и не были способны к развитию полноценных инфекционных нитей. С другой стороны, было показано, что штамм *S. fredii* НН103, одинаково эффективно образующий клубеньки на различных видах бобовых, в том числе, и на растениях, образующих детерминированные и недетерминированные клубеньки, при отсутствии ЭПС, обладает большей конкурентоспособностью в нодуляции сои. Показано, что в этом взаимодействии ЭПС являются незаменимыми, но их присутствие снижает способность данного штамма инфицировать растение сои (Lopez-Baena et al., 2016). Также было показано, что в установлении симбиотических отношений между *R. galegae* и бобовыми растениями, для инициации и распространения инфекционных нитей, а также для развития клубеньков, необходимы некоторые поверхностные полисахариды (Jones et al., 2007; Fraysse et al., 2003).

Роль ЭПС в инфекционном процессе наиболее интенсивно изучалась при исследовании симбиотических взаимодействий *S. meliloti* и *R. leguminosarum*. Мутанты, не синтезирующие ЭПС, способны вызывать скручивание корневых волос, но не образуют инфекционных нитей и клубеньков, фиксирующих азот (Skorupska et al., 2006; Jones et al., 2007; Fraysse et al., 2003). Так, например *S. meliloti* синтезирует симбиотически активные соединения – сукциногликан (ЭПС I) и галактоглюкан (ЭПС II). Галактоглюкан представляет собой полимер повторяющейся единицы дисахарида, состоящей из ацетилированной глюкозы и остатка пирувиллированной галактозы, и он был определен как важный для установлений симбиотических отношений *S. meliloti* экзополисахарид (Marczak et al., 2017). Сукциногликан состоит из повторяющихся звеньев октасахарида, состоящих из одной галактозы и семи остатков глюкозы и модифицированных сукцинилными, ацетильными и пирувилными заместителями. ЭПС *R. leguminosarum* состоят из октамеров, состоящих из одной галактозы, двух звеньев глюкуроновой кислоты и пяти остатков глюкозы, с О-ацетильными и пирувилными заместителями (рис. 1). Эти ЭПС синтезируются в двух полимерных формах: с низкой молекулярной массой (LMW), состоящей из мономеров, димеров и тримеров основной субъединицы, и с высокой

молекулярной массой (HMW) с массой 10^6 – 10^7 Да (Skorupska et al., 2006; Mazur, et al., 2003). Показано, что ЭПС фракция LMW в *S. meliloti* и *R. leguminosarum* важна для эффективного инфицирования клубеньков (Marczak et al., 2017). Однако, полученные данные однозначно показывают, что мутанты *S. meliloti*, которые не продуцируют LMW-сукциногликан, способны устанавливать продуктивные симбиотические отношения с люцерной усеченной (*Medicago truncatula*), хоть и с меньшей эффективностью, чем штамм дикого типа (Mendis et al., 2016). Было доказано, что мутант *exoH* *S. meliloti* синтезирует несукцинилизированный ЭПС I в форме HMW ЭПС, который не расщепляется специфическими гликаназами и вызывает снижение количества неэффективных клубеньков на корнях люцерны, в которых прекращается течение инфекции (Maillet et al., 2020; Mendis et al., 2016). Работы Mendis и соавт. (2016) продемонстрировали, что мутантный штамм дефектный по *ExoH* и *ExoK* гликаназам, не был способен синтезировать LMW ЭПС, но смог установить продуктивный симбиоз с люцерной усеченной (*M. truncatula*). Это указывает на то, что ЭПС фракция LMW не играет существенной роли в симбиозе; однако для эффективного клубенькообразования необходимо сукцинилизирование ЭПС. Более того, было доказано, что LMW сахаросодержащий материал, продуцируемый мутантами *ExoH/ExoK* был схож с циклическим β -глюканом. Эти результаты подтвердили, что сукцинилизированный HMW ЭПС I необходим для продуктивного симбиоза *S. meliloti* с модельным растением *M. truncatula* (Mendis et al., 2016). Высокомолекулярная фракция ЭПС может служить защитой от высыхания бактерий (Gharzouli et al., 2013). Также было показано, что важную роль играют и отрицательно заряженные сукцинильные и пирувилльные остатки в ЭПС I. Потеря сукцинильных групп в ЭПС I привела к увеличению вязкости и жесткости полимерной цепи (Simsek et al., 2013). Отсутствие отрицательного заряда снижает способность сукциногликана реагировать с положительно заряженными ионами в инфекционных нитях. Более того, ацилирование сукциногликана может влиять на его способность подавлять активные формы кислорода (АФК) внутри инфекционных нитей и, таким образом, влиять на их образование (Lehman et al., 2018). Повышение количества

сукциногликана, продуцируемого штаммами *S. meliloti*, сверхэкспрессирующими ген *exoY*, ответственный за синтез галактозилтрансферазы, усиливало его симбиотические эффекты с люцерной усеченной (*M. truncatula*). Было высказано предположение, что уровень экзополисахаридов, синтезируемый ризобиями, может быть одним из факторов, участвующих в оптимизации взаимодействий с растениями-хозяевами (Jones et al., 2019). У *R. leguminosarum* фракция НМВ ЭПС может быть полезной на стадии инфекции. Было показано, что мутанты *R. leguminosarum*, которые синтезируют больше экзополисахаридов с более высокой степенью полимеризации, чем штаммы дикого типа, способствуют производству большего количества зеленой массы инфицированных растений клевера (Mazur et al., 2003; Marczak et al., 2013). Роли, которые играют LMW и НМВ ЭПС в симбиотических взаимодействиях, коррелируют с функциями, которые LMW и НМВ полисахариды играют у других бактерий. Так например, О-антиген S (короткая цепь) *Shigella flexneri* определяет вирулентность штамма, в то время как О-антиген VL (очень длинная цепь) отвечает за устойчивость бактерий к системе врожденного иммунитета (Purins et al., 2008).

Kawaharada и соавт. (2015) продемонстрировали, как происходит узнавание ЭПС бобовыми растениями и идентифицировали рецепторный белок растений, взаимодействующий с ЭПС ризобий. *M. loti* синтезирует кислые ЭПС, состоящие из О-ацетилированных октамеров рибозы, глюкозы и галактозы, и вступают в симбиоз с лотосом японским (*L. japonicus*), образуя клубеньки детерминированного типа (Kelly et al., 2013; Muszynski et al., 2016). Мутантный по гену *exoU* штамм *M. loti* синтезировал укороченный ЭПС (пентагликан), образуя колонии с шероховатой морфологией и индуцируя небольшое количество мелких неэффективных клубеньков на растениях-хозяевах (Kelly et al., 2013). Таким образом, мутант *ExoU* не влиял на процессы индукции ответных реакций растения-хозяина на ранних стадиях инфекции, такие, например, как скручивание корневых волосков, и не был способен к образованию нормальных инфекционных нитей. Это позволило сделать вывод, о том, что укороченные ЭПС избегают распознавание мутированной формы рецепторного белка, таким

образом, ведущее к нормальной нодуляции растений (Gharzouli et al., 2013). Далее у *L. japonicus* был идентифицирован экзополисахаридный рецептор 3 (EPR3), который оказался мембранным рецепторо-подобным белком со значительным сходством с белком NFR1 (рецептор Nod-фактора 1), ответственным за распознавание ризобияльного NF, но с уникальной доменной организацией. И EPR3, и NFR1 имеют три внеклеточных домена LysM, связанных с хитин-связывающими белками. Внутриклеточный киназный домен, присутствующий в обоих белках, трансдуцирует сигнал от рецептора к внутриклеточным сигнальным каскадам. Kawaharada и соавт. (2015) показали, что, как и ЭПС дикого типа, так и функциональный рецептор EPR3 необходимы для образования инфекционных нитей. В исследованиях *in vitro* было доказано, что мономеры ЭПС могут распознаваться эктодоменом EPR3 путем прямого связывания, что указывает на то, что распознавание осуществляется на стадии инфекции и колонизации эпидермальных клеток. Экспрессия гена *Epr3* в корневых волосках и эпидермальных клетках чувствительной зоны запускается Nod-факторами, передающими сигналы через NRF1 и NRF5 (серин/треониновые рецепторные киназы), которые отвечают за первый симбиотический сигнал, передаваемый растительным клеткам, приводящий к нескольким ответам, включая транскрипцию *Epr3* и восприятие структурно специфичных ЭПС у инфицирующих бактерий. Существует предположение, о том, что EPR3 различает структуры ЭПС и отрицательно реагирует на несовместимые ЭПС и положительно на совместимые ЭПС (Kawaharada et al., 2015). В дальнейших исследованиях Kawaharada и соавт. (2017) установили, что действие белка-рецептора EPR3 не ограничивается корневыми волосками, но способствует развитию внутриклеточной инфекции и коррелирует с инвазией инфекционных нитей коркового вещества корня и зачатков клубеньков, способствуя эффективному инфицированию растений. Было высказано предположение, о том, что распознавание совместимых ЭПС с помощью EPR3 повторяется во время прогрессирования инфекции и способствует механизму внутриклеточной инфекции. Наличие ЭПС и восприятие ЭПС посредством EPR3 весьма важно для

развития клубеньковой инфекции и формирования клубеньков. Мутации в генах синтеза ЭПС или *Epr3* снижает или вовсе исключает процессы инфицирования клубеньков инфекционными нитями, а также снижает количество инфицированных клеток (Kawaharada et al., 2017). Данные работы значительно продвинули понимание механизмов заражения ризобиями, при которых структурно совместимые ЭПС могут распознаваться специфическими рецепторами растений-хозяев.

Было показано, что качество и количество поверхностных полисахаридов, особенно экзополисахаридов (ЭПС) и липополисахаридов (LPS), продуцируемых ризобиями, может влиять как на их аутоагрегацию, так и на образование биопленок (Rinaudi and Gonzalez, 2009; Sorroche et al., 2012). Взаимодействие ризобиальных клеток с поверхностью, приводящее к образованию биопленки, играет решающую роль в инфицировании корневых волосков во время образования симбиоза (Vogino et al., 2013).

1.3. Структурно-функциональные особенности ризобиальных биопленок и их роль в бобово-ризобиальном симбиозе.

Ключевую роль на начальных этапах формирования бобово-ризобиального симбиоза выполняет колонизация корней растений, в процессе которой, ризобии формируют микроколонии или биопленки (Vogino et al., 2013). Биопленка – это сообщество микроорганизмов, которые прикреплены к поверхности или друг к другу, заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ и имеют измененный фенотип, проявляющийся другими параметрами роста и экспрессии специфичных генов. Данное определение подчеркивает отличие микробных сообществ в биопленках от лишь похожих на них внешне структур, например, растущих на поверхности агара колоний бактерий, которые не проявляют ни одной из характеристик, свойственных биопленке (Тец, 2013).

Бактериальные сообщества, представленные биопленкой, окружены самопродуцируемой полимерной матрицей и присоединены к инертной или биотической поверхности. Адгезия бактерий ведет к тому, что они начинают

активно размножаться и сообщества приобретают трехмерную структуру, которая может быть пронизана каналами, которые выступают в роли некой «системы кровообращения», служащей для обмена воды, питательных веществ, ферментов, и сигналов, повышения скорости метаболических процессов, а также перемещения потенциально токсичных метаболитов (Stanley and Lazazzera, 2004). Однако сложно провести четкую грань между агрегатами клеток и прочно прикрепленными на поверхности биопленками. При этом образованные структуры, которые ранее были описаны как бактериальная агрегация, микроколония, агглютинация и флокуляция, в настоящее время характеризуются с помощью термина биопленка.

Основные компоненты биопленок, как правило, представлены водой и бактериальными клетками. Следующим наиболее важным компонентом является матрица полисахаридов, состоящая главным образом из экзополисахаридов. Матрица обеспечивает физический барьер против диффузии выделяемых растением веществ и антибиотиков, а также для защиты от осмотического и водного стресса и факторов среды, таких как УФ-излучения и изменения pH (Sutherland, 2001). Так, например, показано, что фитопатогенные бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, которые представлены поверхностно-ассоциированной популяцией, расположенной либо на растениях, либо на частицах почвы, при перепроизводстве целлюлозы увеличивают количество формаций биопленок на корнях (Matthysse et al., 2005). Также в состав биопленок входят белки, ДНК и различные продукты, полученные в результате лизиса. Эти макромалекулы также влияют на функции биопленок в целом (Branda et al., 2005).

Формирование бактериальной биопленки строго регулируемый опосредованный процесс. Каждый вид отвечает на специфичный набор экологических сигналов через набор молекулярных механизмов. Несмотря на такое многообразие сигналов, существует ряд стимулов, которые действуют через консервативные регуляторные системы и важны для взаимодействий между растением и ризобактериями. Ключевыми стимулами в образовании, развитии и распространении биопленок являются бактериальные компоненты клеток,

которые довольно тщательно изучены, поскольку включают молекулы играющие решающую роль в процессе заражения растения-хозяина, независимо от того какими будут эти взаимоотношения (симбиотическими или конкурентными). Ризобактерии, как и другие бактерии, способны образовывать многоклеточные конгломераты, заключенные в матрицу из полимерных веществ, производимых самими бактериями. Регулируются такие высокоорганизованные структуры бактерий благодаря механизмам межклеточной коммуникации (Hooshangi, Bentley, 2008). Такие бактериальные конгломераты или сообщества клеток образуются на границе раздела фаз твердое-жидкое. Процесс прикрепления бактерий к субстрату завершается формированием на поверхности тонкого слоя клеток, который будет реструктурирован и реорганизован – так образуются основные структурно-функциональные единицы биопленок – микроколонию. Транспорт клеток к этой структуре опосредован механизмами поверхностного движения бактерий (роение, «ходульная ходьба, скольжение). Накопление ризобактериальных клеток на границе раздела является двухфазным процессом, состоящим из:

1. обратимой неспецифической стадии, регулируемой гидрофобными и электростатическими взаимодействиями между клетками и примыкающими поверхностями;
2. необратимой стадии, на которой завершается процесс адгезии и формируются зрелые бактериальные микроколонию (Flemming and Wingender, 2010).

Фазы роста, созревания и распада биопленок связаны с биосинтезом внеклеточных биополимеров, среди которых ЭПС, внеклеточная бактериальная ДНК (eDNA) и различные белки. Все они обеспечивают иммобилизацию бактериальных клеток в матриксе, механическую стабильность структуры биопленки, а также ее архитектуру и функциональность заключенного в оболочку микробного сообщества (Flemming and Wingender, 2002)

При микроскопировании зрелые микроколонию выглядят как интенсивно окрашенные гомогенные образования (рис. 6)

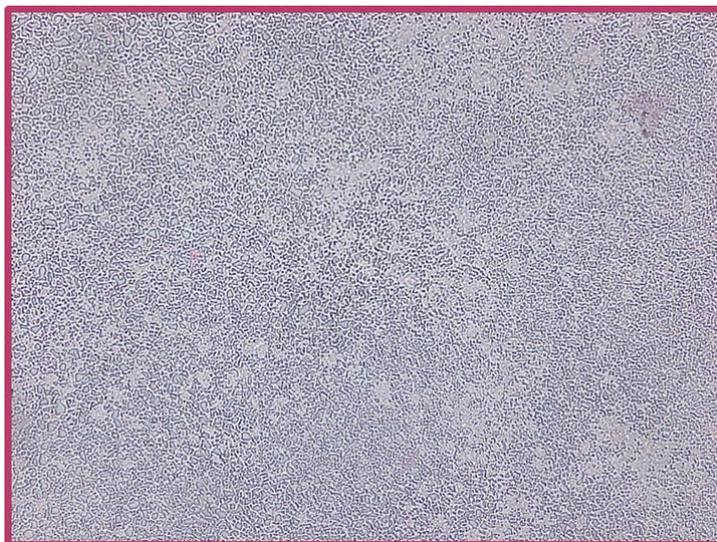


Рисунок 6. Биопленка, образованная штаммом *Pseudomonas sp.* EP4 (светлопольная микроскопия, окраска генциан фиолетовым).

Ризобиальные биопленки широко распространены, и связаны с выживаемостью этих бактерий как в среде богатой питательными веществами, так и испытывающей дефицит в азоте, фосфатах, воде и питательных веществах. Образование биопленок неподвижными бактериями почвы позволяет колонизировать окружающую среду обитания и обеспечивает выживание в условиях экологического стресса, а также вступить в симбиоз с растением-хозяином. Существование ризобий в форме биопленок, а не свободноживущих бактерий, повышает и их конкурентоспособность, так как бактерии, представленные в форме биопленок функционируют как структуры, устойчивые к стрессовым факторам, таким как засуха, УФ-излучения, хищничеству и антибиозу. Переход от планктонного образа жизни к биопленке у ризобактерий обусловлен многочисленными экологическими сигналами, включая доступность питательных веществ, осмотический потенциал и чувство кворума (Quorum sensing) (Stanley and Lazazzera, 2004).

1.3.1. Молекулярные механизмы, влияющие на формирование ризобиальных биопленок

Важную роль в процессах заражения и формирования клубеньков на корнях растения-хозяина, при образовании бобово-ризобиального симбиоза, играют

различные виды поверхностных компонентов бактерий, в том числе экзополисахариды (ЭПС), липополисахариды, и капсульные полисахариды (Fraysse et al., 2003; Skorupska et al., 2006). Мутанты, не синтезирующие эти полисахариды, не участвуют в образовании клубеньков (Hirsch, 2009). Вещества, располагающиеся на поверхности клеток бактерий, в частности экзополисахариды, жгутики, а также липополисахариды, в сочетании с наличием бактериальных функциональных сигналов, имеют решающее значение для формирования биопленок во всех видах исследований.

Наличие прямой взаимосвязи между формированием биопленок и процессами заражения растений все еще не доказано. Однако было показано, что штаммы *S. meliloti*, синтезирующие сукциногликан, хоть и не колонизировали корни люцерны (*Medicago sativa*) так же эффективно, как штаммы, продуцирующие галактоглюкан, тем не менее более эффективно инфицировали бобовые растения (Pellock et al. 2002). Это исследование показало, что образование биопленок может обеспечить ризобиям благоприятную микросреду для долгого нахождения в почве и, в конечном итоге, колонизировать поверхность корней и установить симбиоз. Тем не менее, биопленкообразование не является абсолютно необходимым условием для заражения бобовых растений. С другой стороны, растения-хозяева, а также и другие почвенные микроорганизмы могут извлечь выгоду из способности формировать биопленку ризобактериями, способствующими росту растений, поскольку ЭПС внутри биопленок помогает поддерживать влажность и улучшает структуру почвы. (Morris and Monier 2003). Кроме того, биопленки могут также увеличивать доступность азота и фосфатов, как это было показано на примере с брадиризомиями и обычными почвенными грибами (Sereviratne and Jayasinghearachchi 2004a). Более того, эти исследования убедительно свидетельствуют о том, что, как и в случае других бактериальных биопленок, образование биопленок ризобактерий представляет собой сложный процесс и, следовательно, не может быть легко объяснено лишь на молекулярном уровне и с использованием лишь одного механизма их формирования.

Формирование ризобийных биопленок на корнях растений это последовательный процесс развития, кульминацией которого, является создание этих бактериальных сообществ. Этот процесс связан с появлением симбиотических и патогенных реакций. Однако не выяснено, как растения регулируют создание ассоциаций с ризобактериями. Необходимо продолжать изучать роль биопленок в ризобийно-бобовом симбиозе, так как механизмы, участвующие в формировании бактериальных биопленок и их закрепления на корнях растений, а также соотношение этих механизмов в выживании ризобий еще не выяснены и пересматриваются (Rinaudi and Giordano, 2010). Имеющиеся на данный момент некоторые данные о прикреплении к поверхности и образовании биопленок ризобиями суммированы в таблице 1.

Таблица 1. Ризобии колонизирующие корни бобовых и небобовых видов растений.

Вид ризобий	Фактор, отвечающий за формирование биопленок	Источник
<i>M. huakii</i>	«Ощущение кворума»	Wang <i>et al.</i> , 2004
<i>M. tianshanense</i>	Экзополисахариды	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>S. meliloti</i>	Экологические условия	Rinaudi <i>et al.</i> , 2006
	Сукциногликан и жгутики	Fujishige <i>et al.</i> , 2006b
	Двухкомпонентная система ExoR и ExoS-ChvI	Wells <i>et al.</i> , 2007
	Nod-факторы	Fujishige <i>et al.</i> , 2008
	«Ощущение кворума» и экзополисахариды	Fujishige <i>et al.</i> , 2006a, Wells <i>et al.</i> , 2007 Rinaudi and Gonzalez, 2009

<i>B. elkanii</i>	Ассоциации с грибами	Seneviratne and Jayasinghearachchi, 2003
	Фиксация азота бактериями, представленными биопленкой, улучшение плодородия почв	Jayasinghearachchi and Seneviratne, 2004a, 2004b, 2006; Seneviratne and Jayasinghearachchi, 2005
<i>B. japonicum</i>	Лектин сои и экзополисахариды	Perez-Gimenez et al., 2009
<i>R. leguminosarum</i>	RapA1 белок	Mongiardini et al., 2008, Хакимова и др., 2016
	Глюкоманнан	Williams et al., 2008
	«Ощущение кворума»	Edwards et al., 2009

Экзопалисахариды. Показано, что во время взаимодействия растений с бактериями ЭПС участвуют в адгезии бактерий к корням, а также колонизации корней (Matthysse et al., 2005) и, следовательно, являются основным фактором развития биопленок на корнях растений (Bianciotto et al. 2001a; Ramey et al., 2004; Fujishige et al., 2006a). В ризосфере бактериальные ЭПС вносят существенный вклад в агрегацию почвы, склеивая ее частицы. Инокуляция растений ризобактериями, синтезирующими ЭПС, такими как *Rhizobium* sp. YAS34 (Alami et al., 2000) и *Rhizobium* sp. KYGT207 (Kaci et al. 2005) изменяет агрегацию прилипшей к корням почвы и в конечном итоге улучшает рост растений. ЭПС также играют важную роль и в формировании биопленок ризобиями (Fujishige et

al., 2006b; Russo et al., 2006; Wells et al., 2007; Wang et al., 2008; Williams et al., 2008; Perez-Gimenez et al., 2009; Rinaudi and Gonzalez, 2009; Rinaudi and Giordano, 2010). Так, например, *Sinorhizobium meliloti* синтезирует два вида экзополисахаридов, сукциногликан (ЭПС I) и галактоглюкан (или ЭПС II), тем не менее, формирование биопленок *S. meliloti* Rm1021 (*expR* мутантный штамм), не зависило от синтеза ЭПС (Rinaudi and Giordano, 2010). Однако перепроизводство сукциногликана в мутантах *exoR* и *exoS* привело к увеличению массы образованных биопленок по сравнению с диким типом (Fujishige et al., 2006b; Wells et al., 2007). Исследования формирования биопленок штаммом *S. meliloti* Rm8530 (штамм с неповрежденной копией гена *expR*, который отвечает за синтез ЭПС II), показали, что оно зависит от наличия низкомолекулярной фракции ЭПС II. ЭПС II опосредует прикрепление к абиотическим поверхностям, таким как ПВХ и боросиликатное стекло, а также к поверхности корней бобовых растений-хозяев (люцерна посевная – *Medicago sativa*) (Rinaudi and Gonzalez, 2009). Было показано, что штаммы, у которых не нарушен синтез ЭПС II, эффективно колонизируют корневые волоски. Штаммы, лишённые ЭПС II или способные синтезировать только НМВ-фракцию этого полимера, образуют очень тонкие биопленки, колонизируя в основном главный корень, формируя на нем неоднородные, обрывочные биопленки (Rinaudi and Gonzalez, 2009). В работах по оценке способности формирования биопленок *Rhizobium leguminosarum*, с применением конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (CLSM), было показано, что данные ризобактерии образуют высокоструктурированные и организованные биопленки на боросиликатном стекле (Russo et al., 2006; Williams et al., 2008). Биопленки, образованные мутантными штаммами с перепроизводством целлюлозы и глюкоманнана (соответственно *celA* и *gmsA*), были неотличимы от биопленок штамма дикого типа, однако эти мутанты оказались дефектными при колонизации корней растения-хозяина (горошек волосистый – *Vicia hirsuta*). Данный факт позволяет предположить, что взаимодействия между ризобиями и поверхностью стекла отличаются от тех, что возникают при инфекции корневой системы бобовых растений клубеньковыми

бактериями. (Williams et al., 2008). В работах Vanderlinde и др. был изолирован мутант *R. leguminosarum* bv. *viciae*, высокочувствительный к высыханию. Этот штамм показал низкий уровень накопления ЭПС, а также образовывал дефектные биопленки на микропланшетах из полистирола, что доказывает важность ЭПС в устойчивости к высыханию у ризобий и свидетельствует об их важной роли в процессах формирования биопленок в условиях стресса (Vanderlinde et al., 2009). В еще одном исследовании было показано, что ЭПС-мутантный штамм *B. japonicum* (с неактивной UDP-глюкозо-4-эпимеразой) показал маленький уровень синтеза ЭПС, которые не содержали галактозы. Данный штамм продемонстрировал низкую адгезию к корням сои по сравнению со штаммом дикого типа, что указывает на то, что синтез полноразмерных молекул ЭПС необходим для эффективной колонизации сои культурной (*Glycine max*) брадиризовиями (Perez-Gimenez et al., 2009) Аналогичным образом, ЭПС-дефицитные штаммы *M. tianshanenses* показали низкий уровень образования биопленок на боросиликатном стекле и были неспособны образовывать клубеньки на корнях солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis*), что также указывает на то, что ЭПС необходимы для образования биопленок (Wang et al., 2008).

Была проведена оценка прикрепления биоконтрольного штамма *Pseudomonas fluorescens* СНА0 к внешнему мицелию гломеромицетов (*Glomus intraradices*) – эффективного симбионта сельскохозяйственных культур, микоризных и немикоризных корней моркови (Bianciotto et al., 2001b). Во всех случаях два мукоидных мутанта, сверхпродуцирующего альгинатоподобный ЭПС, демонстрировали усиленное прикрепление к поверхностям по сравнению с таковым у дикого типа (Bianciotto et al., 2001b). Биопленкообразование и перепроизводство полимерных веществ матрикса могут повлиять на выживаемость этих мутантных штаммов в почве, так как они придают устойчивость к некоторым воздействиям окружающей среды. Однако также было высказано предположение, и о том, что это может и не привести к усилению защиты растений с помощью биоконтрольных штаммов, поскольку

противогрибковые препараты или антибиотики могут оставаться в биопленке, а избыточное производство ЭПС может ограничивать диффузию этих соединений в ризосферу (Bianciotto et al. 2001b). При этом сверхэкспрессия ЭПС не всегда коррелирует с повышенной способностью к образованию биопленок у бактерий (Parsek and Fuqua, 2004). Например, *Agrobacterium tumefaciens* почвенные бактерии, которые образуют биопленки на корнях таких растений как томат, люцерна и резуховидка Таля (*Arabidopsis thaliana*) (Matthysse et al., 2005). Мутанты *A. tumefaciens*, не способные к синтезу целлюлозы, не прикреплялись к корням томатов и демонстрировали пониженную колонизацию поверхности, в то время как избыточный синтез целлюлозы приводил к увеличению образования биопленок и уменьшению колонизации корней по сравнению с диким типом (Matthysse et al., 2005). Несмотря на то, что в большинстве исследований указывается на то, что ЭПС играют важную роль в процессах образования биопленок, данный факт нельзя рассматривать, как постулат. Так, например, было показано, что синтез ЭПС *Rhizobium* sp. YAS34 не играет никакой роли в процессах, связанных с формированием биопленок ни на полипропиленовых поверхностях, ни на корнях таких небобовых растений как резуховидка Таля (*A. thaliana*) и рапс (*Brassica napus*) (Santaella et al., 2008).

Липополисахариды. Липополисахариды – это основная составляющая внешней мембраны грамотрицательных бактерий, в том числе и ризобий, которая является ключевым детерминантом антигенности бактериальной клеточной поверхности. Структура и биосинтез ризобияльных ЛПС детально изучены (Russo, 2015). ЛПС состоят из «заякоренного» липида А, который прикрепляет молекулу к внешней мембране и связан через центральный олигосахарид с обнаженным на поверхности полисахаридом с О-специфической цепью. Отличительной особенностью ризобияльных липидов А является то, что все они представлены длинной молекулой, содержащей жирную кислоту (Choma et al, 2004). ЛПС *R. leguminosarum* и *R. etli* имеют общую липидную структуру А-ядра и отличаются лишь по структуре их О-цепей (Carlson et al., 2010). Центральный олигосахарид видов *R. leguminosarum* и *R. etli* состоит из остатков маннозы (Man),

галактозы (Gal), галактуроновой кислоты (GalA) и 3-дезоксид-D-манно-2-октулозоновой кислоты (Kdo), в молярном соотношении 1:1:3:3 (Carlson et al., 2010). У *Rhizobium* spp. встречаются относительно гидрофобные нейтральные полисахариды О-антигена. Остатки, сообщающие суммарный отрицательный заряд, отсутствуют или, если они присутствуют, блокируются этерификацией или нейтрализуются положительным заместителем. Основные присутствующие гликозильные остатки – это дезоксигексозы и метилированные гликозиды (Carlson et al., 2010). О-антиген штамма *R. leguminosarum* 3841 образован разветвленным тетрагетерогликаном, состоящим из трех или четырех повторяющихся единиц 6-дезоксид-3-О-метилталозы (3Me-6dTal), 2-ацетамидо-2-дезоксид-1-хиновозамина (QuiNAc), 3-ацетимидоиламино-3-дезоксид-D-глюкогексуриновой кислоты (Glc3NAcA; ризоаминоуроновая кислота) и остатков фукозы (Fuc) с эндогенным О-метилированием и О-ацетилированием (Forsber, Carlson, 2008).

Роль ЛПС в формировании биопленок была тщательно изучена (Spiers and Rainey, 2005; Wang et al., 2011). Так, например, сообщалось об участии липидного компонента ЛПС *R. leguminosarum* в устойчивости к высыханию, формированию биопленок и подвижности (Vanderlinde, 2009). В работе Russo et al. (2015) показано, что центральная область О-антигена ЛПС *R. leguminosarum* важна для установления межклеточных взаимодействий и необходима для образования компактной структуры биопленки. А также, что внешняя часть ЛПС влияет на адгезионные свойства как на абиотической поверхности, так и на поверхности корней растений, что обусловлено химическими свойствами ЛПС. Структурные изменения ЛПС, как было показано, влияют на образование или структуру биопленок у симбиотических бактерий, связанных с растениями. Мутантные штаммы ризобактерий с измененной структурой ЛПС демонстрируют изменения в процессе образования биопленок. Например, мутант по О-антигену *B. japonicum* показал повышенную адгезию к пластиковым носителям (Lee et al., 2010). Кроме того, активные ЛПС играют важную роль в инфицировании как детерминированных, так и недетерминированных клубеньков бобовых растений

(Russo et al., 2015). О-специфическая цепь (О-антиген) и ядро олигосахарида (центральный олигосахарид), важны для установления симбиотических отношений и для структурных модификаций во время дифференциации до бактериоидов (Frayse et al., 2003). Ризобияльные ЛПС проявляют значительную неоднородность в различных микробиологических средах обитания растений и почвенной среде, и которые факторы вызывают модификации в структуре ЛПС (Brown et al., 2012, Vanderlinde et al., 2009). Это указывает, на то, что различные вариации ЛПС могут играть роль в выживании и адаптации.

Капсульные поверхностные полисахариды. Ризобии синтезируют капсульные полисахариды (KPS), аналогичные антигенам группы II К *Escherichia coli*. Они состоят из небольших повторяющихся единиц гексоз и 3-дезоксид-манно-2-октулозоновой кислоты (Kdo, обычно компонент липополисахарида) или других 1-карбокси-2-кето-3-дезоксисахаров и участвуют в клубенькообразовании (Becker et al., 2017). При отсутствии сукциногликана (ЭПС I) и галактоглюкана (ЭПС II) KPS могут влиять на процессы заражения люцерны, но, образованные в таком случае инфекционные нити, часто задерживаются в росте и имеют аномальный характер (Pellock et al., 2000). Однако у родственных видов *Sinorhizobium fredii*, инфицирование которым ведет к образованию клубеньков на корнях соевых бобов и голубинового гороха, мутации в генах *rkpH* или *rkpG* блокирующих синтез KPS, нодуляция была значительно снижена. В тоже время мутантный по сукциногликану (*exoA*) штамм не оказал существенного эффекта (Parada et al., 2006). Показано, что KPS являются штамм-специфичными антигенами и их синтез зависит от условий роста ризобий (Becker et al., 2017). Таким образом, KPS ,участвуют в недетерминированном клубенькообразовании, в частности, в стимулировании инициации и развития инфекционных нитей (Pellock et al., 2000; Le Quere JL et al., 2006)

Quorum sensing. Процессы миграции планктонных форм клеток, формирования и развития биопленок ризобактерий регулируются посредством механизмов межклеточной коммуникации (Fuqua, 2002). В литературе описаны различные системы восприятия «чувства кворума», которые влияют на перенос

плазмид, эффективность клубенькообразования и азотфиксации, синтез ЭПС и роение бактериальных ассоциаций (Sanchez-Contreras et al., 2007). Ризобии используют сигнальный механизм QS для модуляции и координации их взаимодействий с растением-хозяином.

Показано, что QS играет важную роль и в формировании ризобиальных биопленок (Wang et al. 2004; Zheng et al. 2006; Edwards et al. 2009; Rinaudi and Gonzalez, 2009). Например, мутантные по QS штаммы MrtR-MrtI в *M. tianshanenses* продемонстрировали снижение эффективности прикрепления корневых волосков на 60%, что может быть причиной, по которой эти штаммы не были способны к образованию клубеньков на корнях растения-хозяина (*G. uralensis*) (Zheng et al., 2006). В то же время нарушение системы распознавания чувства кворума CinI/CinR в штаммах *R. leguminosarum* ведет к улучшению образования биопленок (Edwards et al. 2009). Этот эффект, по-видимому, опосредован регулятором транскрипции ExpR, а также небольшим белком CinS, коэкспрессируемым с аутоиндуктором синтазы CinI. ExpR и CinS регулируют экспрессию ЭПС глюканазы PlyB, ответственной за расщепление кислых ЭПС, которые участвуют в биопленкообразовании (Russo et al., 2006; Hoang et al., 2004, 2008; Williams et al., 2008). Наличие исправной системы QS ExpR/Sin в *S. meliloti* необходимо для образования толстых биопленок на абиотических поверхностях, а также для регулирования структуры зрелых биопленок (Rinaudi and Gonzalez, 2009). Так, было показано, что штамм *S. meliloti* Rm1021, лишенный гена *expR*, образовывал лишь плоскую биопленку простой организации, в то время как штамм *S. meliloti* Rm8530, у которого система QS ExpR/Sin была активна, формировал структурированные и высокоорганизованные биопленки.

Ризобиальные белки. В процессах биопленкообразования ризобактерий кроме QS и ЭПС, также участвуют и некоторые ризобиальные белки. Например, у *Bradyrhizobium* sp. рикадгезиноподобный белок опосредует прикрепление ризобий к корням арахиса (*Arachis hypogaea*) (Dardanelli et al. 2003). Ризобиальный адгезионный белок 1 (RapA1) – это внеклеточный кальций-связывающий белок *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, который стимулирует

аутоагрегацию ризобий через полюса клеток и участвует в прикреплении к красному клеверу (*Trifolium pratense*) (бобовому растению-хозяину) и несимбиотическим растениям, таким как фасоль, люцерна и соя (Mongiardini et al. 2008; Хакимова и др. 2006).

Механизмы движения. Известно, что различные механизмы движения бактерий, такие как роение, плавание, а также скольжение по твёрдой поверхности без участия бактериальных жгутиков, влияют на процессы биопленкообразования. Движения ризобактерий непосредственно связано с колонизацией корней растений и развитием в зрелые структурированные поверхностные сообщества. В ходе исследования нефлагеллированные и нехемотаксические мутанты *Azospirillum brasilenses* показали сильно сниженную колонизацию корней пшеницы (*Triticum aestivum*) по сравнению с диким типом, что позволяет предположить, что для начала колонизации корней требуется подвижность бактерий (Vande Broek et al. 1998). В работах Turnbull было показано, что подвижные штаммы *P. fluorescens* имели более высокую выживаемость в почве и лучше прикреплялись к корням пшеницы, по сравнению неподвижными штаммами (Turnbull et al. 2001). Кроме того, подвижные бактерии могли перемещаться от корней к окружающей ризосфере. Этому движению способствовали сигнальные соединения, присутствующие в экссудатах корней и семян, которые, как известно, влияют на прикрепление и колонизацию, а также образование биопленок. Схожий эффект влияния экссудатов выделяемых семенами и корнями сои на хемотаксис и образование биопленок был получен при изучении штамма *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339 с антагонистической активностью против некоторых грибов, вызывающих болезни сельскохозяйственных культур (Yagura et al. 2008). Таким образом, хемотаксис и, следовательно, подвижность регулируются количественными и качественными изменениями в составе экссудатов семян и корней. У ризобий подвижность жгутиков обеспечивает доступ к участкам прикрепления и заражения растений. Так, как и в случае с другими PGPR, мутанты Fla⁻ *S. melilotis* показали меньшую способность к образованию биопленок по сравнению со штаммом Rm1021 дикого

типа (Fujishige et al. 2006b). Мутанты *fliP* и *flgH*, использованные в исследовании, показали снижение образования биопленок более чем на 50%, поскольку были дефектны в первоначальном прикреплении к ПВХ. Также мутантные штаммы показали задержку и в процессах развития клубеньков на корнях бобовых растений.

1.3.2. Характеристика биопленок R. leguminosarum

Прикрепление *R. leguminosarum* к корневым волоскам растений происходит в два этапа: первый – первичное прикрепление, опосредованное либо бактериальными адгезинами (Хакимова и др., 2017d), либо растительными лектинами (Карпунина и др., 2002; Садовникова и др., 2003; De Hoff et al., 2009), а затем вторичное прикрепление при помощи фибрилл целлюлозы на поверхности бактерий (Laus et al., 2005; Rodriguez-Navarro et al., 2007; Цыганова, Цыганов, 2012).

R. leguminosarum, как и многие другие бактерии, также образует биопленку и на стерильных инертных поверхностях (Fujishige et al., 2005, 2006). Способность этих ризобактерий к формированию биопленок оценивалась с помощью микропланшетного анализа и в *pSym*-дефицитных мутантах оказалась значительно ниже, чем в штаммах дикого типа *R. leguminosarum* bv. *viciae* 128C53. Считается, что факторы, кодируемые симбиотической *pSym* плазмидой, необходимы для образования биопленок бактериями данного вида (Fujishige et al., 2005). Образование биопленок *R. leguminosarum* может быть усилено ограничением питательных веществ, например, при применении среды Хогланда-Арнона в отличие от использования богатой питательными веществами среды с триптон-дрожжевым экстрактом (Fujishige et al., 2006b; Вершинина и др., 2019c). Наличие и доступность питательных веществ в среде, таким образом, играет важную роль при переходе бактерий от планктонной формы существования к биопленке. Штаммы *R. leguminosarum* способны образовывать сложные трехмерные биопленки на инертных поверхностях и окрашивание этой биопленки обеспечивает визуализацию ее экзополисахаридной матрицы (Fujishige et al.,

2006b). Однако картина, наблюдаемая на модели инертной поверхности, не всегда может быть экстраполирована на модель поверхности корня, так как – это относительно богатая питательными веществами среда, которая все же позволяет ризобиям формировать биопленки. Возможно, это связано с тем, что существуют еще неизвестные сигналы или факторы растений, способствующие образованию биопленок и оказывающие ингибирующий эффект на питательные вещества, выделяемые корнем (Rinaudi, Giordano, 2010).

Russo и соавт. (2006) было показано, что штамм *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* A34 формирует толстые биопленки в виде колец на воздушно-жидкостной фазе культур выращенных в среде без питательных веществ на шейкере и хорошо прикрепляется к инертным поверхностям, таким как стекло и полипропилен. При оценке структуры биопленок, образованных данным штаммом с применением конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, бактерии дифференцировались в трехмерные структуры. Далее образовались высокоорганизованные комплексы биопленок, похожие на соты (Russo et al., 2006). Нарушение системы секреции PrsD-PrsE типа I у данного штамма приводит к уменьшению образования биопленок. У мутантов с дефектом этой системы секреции образовалась незрелая биопленка без структур, подобных сотам, что позволяет предположить, что эта система секретирует один или несколько белков, участвующих в развитии биопленки *R. leguminosarum* (Russo et al., 2006). Кислый экзополисахарид *R. leguminosarum* деполимеризуется гликаназами PlyA и PlyB, которые секретируются системой PrsD-PrsE типа I (Finnie et al., 1997, 1998). Сравнение биомассы биопленок, образованных штаммом *R. leguminosarum* A34 дикого типа по сравнению с мутантным по гену *plyA* штаммом, выявило незначительное различие, в то время, как у мутантных по генам *plyB* и *plyA/plyB* штаммов отмечалось значительное снижение. Причем, в случае двойного мутантного штамма отличие биомассы было больше, чем у мутанта *plyB*. В виду того, что опытные штаммы сформировали биопленку с большим количеством маленьких плотных микроколоний, был сделан вывод о том, что гликаназы PlyA и PlyB влияют на фенотип штаммов (Russo et al., 2006). Также Russo и соавт. (2006)

показали, что резкое снижение образования биопленок вызывают мутации в гене *pssA*, так как они блокируют синтез экзополисахаридов у *R. leguminosarum*. Применение конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показало, что мутантный штамм не был способен развивать сотовые структуры и образовывал лишь плоскую биопленку (Russo et al., 2006). Таким образом, авторы выяснили, что азотфиксирующим бактериям *R. leguminosarum* необходимо наличие ЭПС для образования биопленок, а система секреции PrsD-PrsE типа I экспортирует белки, которые связаны с поверхностным прикреплением и созреванием биопленки.

Как в качестве структурных компонентов, так и в качестве сигнальных молекул в бобово-ризобиальном симбиозе выступают липополисахариды, которые являются основным компонентом внешней мембраны ризобий (Frayse et al., 2003). «Заякоренный» липид А внешней мембраны, связан через центральный олигосахарид с обнаженным на поверхности полисахаридом с О-специфической цепью. О-специфическая цепь или О-антиген, а также ядро олигосахариды, которое представляет собой центральный олигосахарид играют важную роль в установлении симбиотических отношений (Frayse et al., 2003). Кроме того, О-антиген липополисахаридов *R. leguminosarum* bv. *viciae* необходим и для межклеточного взаимодействия и образования компактной структурированной биопленки (Russo et al., 2015).

Белки адгезины ризобактерий (белки Rap), были выделены из штамма *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Ausmees et al., 2001). RapA1 – это внеклеточный кальций-связывающий белок, который способствует аутоагрегации ризобий через полюса клеток, участвует в процессах инфицирования и прикрепления ризобактерий к корневым волоскам (Mongiardini et al., 2008, Нигматуллина и др., 2015, Хакимова и др., 2016). Штамм, сверхпродуцирующий RapA1, по сравнению со штаммом R200 дикого типа, показал более высокую адсорбцию, как на корнях бобового растения (клевера красного, выступающего в роли растения-хозяина), так и на корнях несимбиотических растений (фасоль обыкновенная, люцерна и соя) (Mongiardini et al., 2008). Mongiardini и соавт. (2008) показано, что белок RapA1 способствовал адсорбции ризобий на поверхности корней, однако

избыточное производство этого белка адгезина не влияло на прикрепление бактерий к таким абиотическим поверхностям, как полистероловые планшеты или полипропиленовые шарики. Не были выявлены статистически значимые различия и при исследовании адгезии ризобий к песку и вермикулиту. Кроме того, авторами было обнаружено, что перепроизводство белка RapA1 не оказало влияния на образование клубеньков на корнях бобовых растений (Mongiardini et al., 2008). Таким образом, рецепторы RapA1 расположены только на поверхности растений и, функции этого белка могут быть связаны с начальным прикреплением бактерий и колонизацией ими корней, но не с образованием клубеньков.

Nod-гены и их продукты, а также NF бактерий рода *Rhizobium* важны для развития азотфиксирующих клубеньков на корнях бобовых растений (Skorupska et al., 2017). В работах Fujishige и соавт. (2008) обнаружено, что для образования зрелой ризобиальной биопленки необходимо присутствие Nod-факторов. Эта новая характеристика NF, и она отличается от их ранее установленной роли в качестве фактора, индуцирующего развитие клубеньков на корнях бобовых растений. Выполнение NF двух характеристик, как в качестве структурных компонентов в биопленках, так и в качестве предшественников специфичных для хозяина морфогенов, указывает на то, что существуют и две системы регуляции этих процессов; одна из которых связана с синтезом флавоноидов, которые являются индукторами *nod*-генов ризобий, а другая от них совсем не зависит (Fujishige et al., 2008).

Глюкоманнан, полисахарид, расположенный на одном из полюсов клеток *R. leguminosarum*, участвует в прикреплении к поверхности корней посредством связывания с лектином растения-хозяина (Laus et al., 2006). Глюкоманнан-опосредованное прикрепление к корням гороха имеет большое значение в процессе инфицирования корневой системы бобовых растений клубеньковыми бактериями (Williams et al., 2008). Подобно результатам, полученным Russo et al. (2006) для штамма А34 секвенированный штамм 3841 образует трехмерные биопленки на стеклянных поверхностях с микроколониями, окруженными водяными каналами и кластерами плотно упакованных гексагональных клеток,

которые формируют соты (Williams et al., 2008). В работах Williams и соавт. (2008) были получены схожие с работой Russo и соавт (2006) результаты о том, что экзополисахариды играют важную роль в формировании биопленок, так как мутант по гену *pssA* штамм образовывал лишь тонкие неструктурированные биопленки. Несмотря на это мутантные по генам *celA*, *gelA* и *gmsA* штаммы, которые, соответственно, не были способны продуцировать целлюлозу, гелеобразующий экзополисахарид и глюкоманнан, образовывали биопленки, неотличимые от таковых у штамма дикого типа (Williams et al., 2008). При этом, не синтезирующие глюкоманнан и целлюлозу мутантные штаммы не были способны к колонизации корней при их совместной культивации с растением-хозяином *Vicia hirsuta* (вика). Следовательно, взаимодействия, которые происходят между ризобиями и поверхностью стекла, отличаются от тех взаимодействий, которые возникают при формировании бобово-ризобияльного симбиоза (Williams et al., 2008). Работы Edwards и соавт (2009) показали, что нарушение системы контроля кворума *CinIR* у *R. leguminosarum* ведет к увеличению образования биопленок, в то время как, у других видов ризобий получены противоположные результаты, что может быть опосредовано работой регулятора транскрипции *ExpR*, а также белка *CinS*, коэкспрессируемым с аутоиндуктором синтазы *CinI*. Показано, что мутантные по генам *expR* или *cinS* ризобияльные штаммы лучше прикреплялись к стеклянным поверхностям. Тем не менее, образованные мутантным штаммом *expR* кольца биопленок, были менее стабильны, чем у мутантов *cinR* и *cinI* quorum-sensing или у штамма с разрушенным геном *cinS* (Edwards et al., 2009). Показано, что экспрессию экзополисахаридгликаназы PlyB, ответственной за расщепление ЭПС, регулируют белки *ExpR* и *CinS* (Zorreguieta et al., 2000). Следовательно, в случае образования биопленок *R. leguminosarum* необходим правильный размер молекул ЭПС. Несмотря на то, что в большинстве случаев экзополисахариды играют важную роль в формировании биопленок, в некоторых случаях, они не оказывают эффект такого рода. Так, например, *Rhizobium* sp. YAS34 был использован для изучения функции экзополисахаридов при колонизации и образовании биопленок на

корнях двух небобовых растений – *Arabidopsis thaliana* и *Brassica napus* (Santaella et al., 2008). Синтез ЭПС этим штаммом не оказывал эффекта на образование биопленок ни на инертных поверхностях (полипропилен), ни на корнях вышеуказанных растений, тем не менее бактериальные экзополисахариды внесли свой вклад в колонизацию определенных зон в зависимости от доступности питательных веществ (Santaella et al., 2008).

Таким образом, в отсутствие бобового растения-хозяина, ризобии способны прикрепляться и колонизировать корни других растений, позволяя им поглощать питательные вещества и выживать в этой защищенной нише до тех пор, пока не возникнут оптимальные условия для установления симбиоза с бобовым растением. Как упоминалось ранее, механизмы передвижения бактерий, как известно, играют важную роль в формировании биопленок, включая колонизацию и последующее развитие в зрелые структурированные поверхностные сообщества. В частности, скользящее движение, позволяет группам бактерий согласованно перемещаться по твердой поверхности, распространяясь в виде биопленки (Verstraeten et al., 2008). Анализ последовательности различных мутантов *Rhizobium etli*, дефектных по скольжению, показал влияние на восприятие кворума, состав или экспорт полисахаридов, подвижность и метаболизм аминокислот и полиаминов. Несколько таких мутантов показали снижение симбиотического акта связывания азота.

1.3.3. Роль процессов биопленкообразования в бобово-ризобииальном симбиозе

Для того чтобы показать роль биопленок, образованных ризобактериями, в бобово-ризобииальном симбиозе, важно указать и различные способы выживания биопленок в ризосфере. Существует три основных типа биопленок, которые могут возникать в ризосфере, а именно бактериальные биопленки (включая актиномицеты), грибковые биопленки и грибково-бактериальные биопленки, а также грибково-ризобииальные биопленки (FBBs/FRBs). Бактериальные и грибковые биопленки, состоящие из одного или нескольких видов, образуются на биотических или абиотических поверхностях почвы. FBB / FRB несколько

отличаются от бактериальных или грибковых биопленок в том смысле, что во время образования этой биопленки грибы действуют как биотическая поверхность, к которой прикрепляются бактерии (Seneviratne et al., 2008a). В случае нефиламентных грибов в качестве биотических поверхностей могут выступать как бактерии, так и грибы. Эти взаимодействия приносят пользу обоим партнерам во время метаболического взаимодействия и т.д. Кроме прикрепленных к поверхности бактериальных биопленок в ризосфере сохраняются и менее сложные биопленки с меньшим количеством клеток, которые по-разному описываются как микроколонии, агрегаты или кластеры клеток (Bloemberg and Lugtenberg, 2001; Morris and Monier, 2003; Ramey et al., 2004).

Многочисленные исследования показали, что ряд различных бактерий существует в ризосфере в виде бактериальных биопленок (Ramey et al., 2004). Например, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* и *Sinorhizobium meliloti* способны формировать биопленки как на корнях, так и на абиотических поверхностях почвы (Fujishige et al., 2006a, b). В работе Pearce и соавт. (1995) обсуждали роль ризосферных биопленок в сложной сети взаимодействий в ризосфере, которые управляют ростом растений и микробной динамикой посредством химических, физических, биотических и питательных взаимодействий. Развитие таких мутуалистических взаимодействий принесло пользу как биопленкам, так и растениям. Так, например, Foster and Wenseleers (2006) утверждают, что наиболее важным фактором, объясняющим успешное межвидовое сотрудничество, является рассмотрение фенотипических обратных связей, а не только учет развития генетических корреляций между видами. Таким образом, очевидно, что даже простые или сложные структуры биопленок ризосферы играют важную роль в прямой и / или косвенной поддержке взаимодействий между растениями и микроорганизмами, включая симбиоз между ризобиями и бобовыми растениями.

Несмотря на то, что существует множество работ, посвященных изучению инфицирования корней растений ризобиями в бобово-ризобиальном симбиозе, роль формирования биопленок в этом процессе еще не установлена.

Присоединение ризобий к корням бобовых растений – это начальный этап, необходимый для взаимодействия микро- и макросимбионтов (Fujishige et al., 2006b; Williams et al., 2008). Он является предпосылкой для образования микробных биопленок. В исследовании Rodriguez-Navarro и соавт. (2007) указано, что молекулярные механизмы, задействованные в адгезии бактерий к корням, также могут иметь отношение и к развитию биопленок. Формирование микроколоний в ризосфере является типичным явлением, а их прикрепление и агрегация на корнях растений является основой колонизации корней ризобактериями (Ongena and Jacques, 2008). Более того, ввиду совпадения генов, важных для прилипания к абиотическим и биотическим поверхностям, Fujishige et al. (2006b) предположили, что бактериальная колонизация корней эквивалентна биопленке. Они также исследовали образование биопленок на ранних стадиях симбиоза ризобактерий и бобовых, и доказали, что *S. meliloti* создает биопленки на корнях растений-хозяев люцерны посевной (*Medicago sativa*) и донника белого (*Melilotus albus*). Кроме того, полисахариды бактериальной поверхности (например, экзополисахариды (ЭПС)) участвуют в процессах прикрепления (Williams et al., 2008), и синтеза ЭПС, что характерно для биопленочных форм бактерий, включая ризобии. Несколько других исследований также подтвердили, что ЭПС во время образования биопленки усиливает прикрепление бактерий к корням и придаткам корней (Bianciotto et al., 2001a, b; Rudrappa et al., 2008; Williams et al., 2008). В другом исследовании сообщалось, что образование биопленок на участках корней запускается компонентом растительного происхождения, аналогичным тому, который участвует в бобово-ризобийных, а также и других бактериальных взаимодействиях (de Ruijter et al., 1999). Было обнаружено, что лектины бобовых, например, расположенные на кончиках корневых волосков, распознают и связываются со специфическими углеводными структурами, присутствующими на бактериальной поверхности, тем самым способствуя прикреплению и образованию биопленок (Perez-Gimenez et al., 2009). Например, бактерии *R. leguminosarum* bv. *viciae* и *S. meliloti* формируют биопленки на инертных поверхностях и корнях бобовых, при этом микроколонии

S. meliloti на начальной стадии клубенькообразования концентрируются в зоне корневых волосков (Fujishige et al., 2006b).

В микробных сообществах, связанных с растениями, прикрепление и колонизация ризобактерий, регулируется в зависимости от плотности популяции с помощью механизмов QS (Wells et al., 2007, Elasri et al., 2001). Межклеточная коммуникация играет важную роль в адгезии ризобий к корням бобовых, регулируя конкуренцию бактерий при колонизации корневой системы и формировании биопленок. Таким образом, образование ризобияльных биопленок важно для эффективной колонизации корневой системы и образовании клубеньков в бобово-ризобияльном симбиозе.

Кроме прямого влияния биопленочного образа жизни ризобий на симбиотические отношения между ними и бобовыми растениями, также воздействуют и некоторые косвенные эффекты. Например, повышенный уровень синтеза индолилуксусной кислоты (ИУК) биопленкой *Penicillium* spp.-*Bradyrhizobium* spp., который оказал ростостимулирующий эффект на корни сои (*Glycine max*) (Jayasinghearachchi and Seneviratne, 2004a). При росте корней происходит трение почвы, что в свою очередь приводит к утечке содержимого цитоплазмы и, в конечном итоге, замедляет рост корневых клеток (Pearce et al., 1995). Смазывающее действие биопленок на ризосферу посредством высвобождения смазочных веществ, таких как ЭПС, однако, способствует росту корневой системы растений. Следовательно, формирование биопленок в жестких почвах может гарантировать развитие здоровой корневой системы, что, в свою очередь, благоприятно влияет на симбиоз ризобий и бобовых. Большинство зернобобовых культур хорошо себя чувствуют при нейтральном или слегка пониженном pH почвы. В условиях умеренной и высокой кислотности выживаемость ризобий и клубенькообразование ограничены. Так, pH почвы также косвенно влияет на прикрепление ризобий к корням, изменяя доступность Ca^{2+} (Rinaudi et al., 2006), потому что Ca^{2+} действует как связующее звено или мост между отрицательно заряженными активными группами органических молекул на поверхности корня и бактерий. Однако более высокие уровни Ca^{2+}

отрицательно влияют на рост ризобиальных клеток. Наличие биопленок изменяет рН ризосферы во время роста корней (Pearce et al., 1995). Другой важный аспект биопленок связан с тем, что они могут заполнять пористые пространства почвы, а также образовывать тонкий водный слой между наружной поверхностью корней с плотно прилегающими частицами почвы и биопленкой (Pearce et al., 1995). Заполнение пористых пространств, оставляющее более мелкие поры в каналах структуры биопленки, снижает проницаемость и движение воды в ризосфере, таким образом, предохраняя воду от испарения, что крайне важно в условиях засухи. Кроме того, микроорганизмы биопленок более устойчивы к воздействию воды, чем единичные планктонные клетки, благодаря высокой способности ЭПС биопленок удерживать ее (Sutherland, 2001). Оба эти явления помогают ризобиям выжить в условиях стресса. Следовательно, биопленочные сообщества в ризосфере могут косвенно улучшать взаимодействие ризобий и бобовых растений.

1.3.4. Применение ризобиальных штаммов в качестве биопленочных биоудобрений

Применение ризобий в качестве PGPR в значительной степени связано с использованием суспендированных культур, а роль биопленок, образованных этими микроорганизмами, недостаточно изучена. Бактерии, располагаясь на поверхности корней растений, образуют с ними ассоциации, которые, в свою очередь, способствуют их выживанию. Образование биопленок помогает ризобиям поддерживать плотность клеток в течение достаточно длительного времени до момента взаимодействия с растением-хозяином. Ризобии оказывают свое влияние на растения через прямые или косвенные механизмы, то есть они ограничивают роль фитопатогенных микроорганизмов, повышают доступность макро- и микронутриентов из окружающей среды и могут использоваться в качестве недорогой и безопасной технологии снятия стресса растений (Вершинина и др., 2017a; Pathania et al., 2020). Такие экологические стрессы, как засоление, засуха, наводнение и воздействие патогенов преодолеваются путем образования биопленок (Rekadwad and Khobragade, 2017). Биопленки также

косвенно способствуют развитию симбиотических отношений, обеспечивая развитие «здоровой» корневой системы и сохраняя необходимый уровень влажности ризосферы и изменяя pH почвы, что приводит к усилению обмена питательных веществ, биоконтролю и т.д. Низкую выживаемость монокультуры ризобий при использовании технологии инокуляции можно преодолеть с применением инокулятов представленных в форме биопленок, так называемых биопленочных биоудобрений (ББ), которые могут улучшить рост и развитие бобовых культур. Использование ББ также, вероятно, будет способствовать взаимодействиям между микроорганизмами в биопленке, что в свою очередь приведет к росту и развитию бобовых растений (Vaigonussova et al., 2021). Так, Seneviratne и соавт. (2011) сообщили, что использование ББ в сочетании с меньшим количеством химических удобрений привело к увеличению содержания органического углерода в почве на 20% и снижению транспирации листьев на 40%, тем самым поддерживая рост растений.

Применение биоудобрений с улучшенными инокулятами ризобий необходимо, поскольку большинство важных с точки зрения сельского хозяйства зернобобовых видов растений часто плохо развиваются за пределами своего происхождения, вероятно, из-за отсутствия соответствующих ризобий (Bottomley and Myrold, 2007). Таким образом, эффективные микроорганизмы, такие как PGPR, давно используются в полевых условиях во всем мире в качестве биоудобрений (Bloemberg and Lugtenberg, 2001). Было показано, что в большинстве полевых экспериментов не удалось улучшить азотфиксацию даже при использовании PGPR штаммов ризобий, вероятно, из-за плохой и/или недостаточной их выживаемости и неспособности конкурировать с хорошо адаптированными местными штаммами микроорганизмов. Следовательно, в традиционной технологии инокуляции микробных монокультур серьезной проблемой, которую еще предстоит решить, является плохая выживаемость интродуцированных микроорганизмов в почве из-за различных факторов стресса окружающей среды. Таким образом, необходимо найти конкурентоспособные инокуляты, которые смогут конкурировать с менее эффективными популяциями.

В попытке решить эту проблему в ходе эксперимента было показано, что биопленки, ассоциированные с растениями, обладают высокой способностью защищать себя от внешнего стресса и микробной конкуренции, характерной для ризосферы, а также оказывать положительное влияние на рост и развитие растений (Ramey и др., 2004). Более того, было четко показано, что использование FBB/FRB в качестве биопленочных инкуляторов более эффективно с точки зрения их биологической эффективности, чем моно или смешанные микробные культуры (Seneviratne et al., 2008a). Например, ББ, примененные в полевых условиях на растения сои, значительно увеличили урожай семян на 35% по сравнению со стандартным ризобияльным инокулянтом (Sirghalage and Seneviratne, 2020). Более того, биопленки также могут быть использованы для успешного внесения штаммов ризобий в почву (Seneviratne et al., 2008b, 2009). Помимо стресса окружающей среды, одним из важных ограничивающих факторов в связывании азота – процесса, который в конечном итоге влияет на рост и развитие бобовых культур, является дефицит фосфора в почве (Vance, 2001). Грибы арбускулярной микоризы (АМ) создают обширную сеть гиф, которые помогают получать минеральные питательные вещества, и в первую очередь Р (Lum and Hirsch, 2005). Симбиоз бактерий рода *Rhizobium* и АМ (РАМ), которые формируют FRB (Seneviratne et al., 2008a), играет важную роль в бобово-ризобияльном симбиозе (Lum and Hirsch, 2005; Chalk et al., 2006; Kaschuk et al., 2009). Это межродовое взаимодействие улучшает доступность питательных веществ, где грибы АМ поставляют Р, в то время как ризобии обеспечивают N. Этот совместный эффект приводит к увеличению скорости фотосинтеза, а также росту и развитию растений. Было обнаружено, что ассоциации РАМ улучшают продуктивность и урожайность бобовых по сравнению с несимбиотическими растениями (Kaschuk et al., 2009). Аналогичные эффекты могут быть получены и при инокуляции FBB/FRB, как это наблюдалось в почвенной среде (Seneviratne and Jayasinghearachchi, 2005). Кроме того, биопленки из ББ и симбиотической системы ризобии-бобовые взаимодействуют друг с другом, оказывая благоприятное действие как на симбионтов, так и на окружающую среду.

Следовательно, производство и применение эффективных ББ *in vitro* может служить альтернативой химическим удобрениям и способствовать росту и развитию бобовых культур экологически безопасным и устойчивым образом.

Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Гены:

- *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR* – регулируют биосинтез ЭПС у бактерий рода *Rhizobium*;
- *gfp*, кодирует зеленый флуоресцентный белок GFP;
- *rapA1*, кодирует внеклеточный кальций-связывающий белок, который способствует аутоагрегации ризобий через полюса клеток, участвует в процессах инфицирования и прикрепления ризобактерий к корневым волоскам.

Бактериальные штаммы:

В случае создания коллекции генетически охарактеризованных штаммов ризосферных бактерий, обладающих ростостимулирующей активностью объектами исследования являлись 114 штаммов *R. leguminosarum* и 3 штамма *R. galegae* из коллекции микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН. Штаммы были изолированы из клубеньков 10 видов дикорастущих бобовых растений, представленных в таблице 2.

Таблица 2. Список растений, из клубеньков которых были изолированы ризобиальные штаммы

Растение-хозяин	Количество штаммов
Горошек заборный / <i>Vicia sepium</i>	12
Горошек лесной / <i>Vicia sylvatica</i>	12
Чина лесная / <i>Lathyrus sylvestris</i>	47
Чина гороховидная / <i>Lathyrus pisiformis</i>	15
Чина луговая / <i>Lathyrus pratensis</i>	10

Чина Литвинова / <i>Lathyrus litvinovii</i>	10
Клевер розовый / <i>Trifolium hybridum</i>	2
Фасоль обыкновенная / <i>Phaseolus vulgaris</i>	2
Клевер луговой / <i>Trifolium pratense</i>	4
Козлятник восточный / <i>Galega orientalis</i>	3

Для проведения опытов по оценке ростостимулирующего эффекта ризобий на растения, нами использовались следующие штаммы: *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* Pvu5+RapA1, *R. leguminosarum* VSy12 (2008), *R. leguminosarum* LSy10 (D17), *R. leguminosarum* THy1, *R. galegae* 0702, *R. leguminosarum* TPr3 (2004), *P. aureofaciens* ИБ51 «Елена», *P. aureofaciens* ИБ51 «Елена»+RapA1

При проведении экспериментов по клонированию использовали штамм *E. coli* XL1 Blue.

В исследованиях, посвященных изучению биопленкообразования ризосферными бактериями на биотических и абиотических поверхностях, использовали следующие штаммы:

- *Pseudomonas* sp. EP4, *Pseudomonas* sp. 2137, *Azotobacter vinelandii* ИБ 4 «Азолен», *Pseudomonas aureofaciens* ИБ51 «Елена», *Pseudomonas* sp. 102, *Pseudomonas* sp. 103;

- Ризобиальные штаммы дикого типа: *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12 (2008), *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4 (2004), *R. galegae* 0702, *R. leguminosarum* VSy3

- Ризобиальные штаммы, рекомбинантные по гену *pssB*, трансформированные с помощью плазмиды pJB658+pssB: *R. leguminosarum* Pvu5 pJB658+pssB, *R. leguminosarum* VSy12 (2008) pJB658+pssB, *R. leguminosarum* THy2 pJB658+pssB, *R. leguminosarum* TPr4 (2004) pJB658+pssB;

- Ризобиальные штаммы, рекомбинантные по гену *pssA* или *rosR*, трансформированные с помощью плазмиды pJB658GFP: *R. leguminosarum* Pvu5 pJB658GFP PssA, *R. leguminosarum* Pvu5 pJB658GFP RosR, *R. leguminosarum*

THy2 pJB658GFP PssA, *R. leguminosarum* THy2 pJB658GFP RosR, *R. leguminosarum* TPr4 pJB658GFP PssA, *R. leguminosarum* TPr4 pJB658GFP RosR, *R. leguminosarum* VSy12 pJB658GFP PssA, *R. leguminosarum* VSy12 pJB658GFP RosR, *R. leguminosarum* VCr7 pJB658GFP PssA, *R. leguminosarum* VSy3 pJB658GFP RosR, *R. galegae* 0702 pJB658GFP PssA, *R. galegae* 0702 pJB658GFP RosR.

Плазмиды: pAL-TA, pAL-2T, pJN105, pJN105TurboGFP, pJB658.

Растения: салат латук (*Lactuca sativa* L.), репа (*Brassica rapa* L.), козлятник восточный (*Galega orientalis* Lam.), огурец обыкновенный (*Cucumis sativus* L.), клевер красный или луговой (*Trifolium pratense* L.), томат (*Solanum lycopersicum* L.) и рапс (*Brassica napus* L.).

2.2. Состав водных растворов и питательных сред

Используемые в работе питательные среды и водные растворы, состав, которых приведен в таблице 3, стерилизовали автоклавированием при 120°C в течение 30 мин.

Таблица 3. Состав водных растворов и питательных сред

1 x TAE (pH 7,6)	2 mM ЭДТА, 40 mM трис-основание, 20 mM уксусной кислоты.
1 x TE (pH 8,0),	10 mM трис-HCl, 1 mM ЭДТА
среда LB	бакто-триптон (1%), дрожжевой экстракт (0,5%), NaCl (1%)
агаризованная среда LB	бакто-триптон (1%), дрожжевой экстракт (0,5%), NaCl (1%), агар-агар (1,5%)
среда TY	бакто-триптон (1%), дрожжевой экстракт (0,1%), CaCl ₂ (0,1%)
агаризованная среда TY	бакто-триптон (1%), дрожжевой экстракт (0,1%), CaCl ₂ (0,1%), агар-агар (1,5%)
среда YM	маннитол (1%), дрожжевой экстракт (0,04%), NaCl (0,01%),

	MgSO ₄ (0,01%), K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (0,05%), CaCl ₂ (0,03%)
агаризованная среда YM	маннитол (1%), дрожжевой экстракт (0,04%), NaCl (0,01%), MgSO ₄ (0,01%), K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (0,05%), CaCl ₂ (0,03%), агар-агар (1,5%)
среда (RDM) Rhizobium Defined Medium (минимальная среда для агробактерий и ризобий)	сахароза (0,5%), RDM A (10%), RDM B (10%), биотин (0,4%), тиамин (0,1%). RDM A: KNO ₃ (0,6%), CaCl ₂ ·2H ₂ O (0,1%), MgSO ₄ 7H ₂ O (2,5%), FeCl ₃ ·6H ₂ O (0,1%). RDM B: K ₂ HPO ₄ (1%), KH ₂ PO ₄ (1%). Биотин = 0,25 мг./мл. Тиамин = 10 мг./мл.
агаризованная среда RDM	сахароза (0,5%), RDM A (10%), RDM B (10%), биотин (0,4%), тиамин (0,1%), агар-агар (1,5%) RDM A: KNO ₃ (0,6%), CaCl ₂ ·2H ₂ O (0,1%), MgSO ₄ 7H ₂ O (2,5%), FeCl ₃ ·6H ₂ O (0,1%). RDM B: K ₂ HPO ₄ (1%), KH ₂ PO ₄ (1%). Биотин = 0,25 мг./мл. Тиамин = 10 мг./мл.
Tris-buffer (TBS) (pH 7,5)	20 mM трис-основание, 150 mM NaCl
Tris-buffer с Tween 20 (TBST) (pH 7,5)	20 mM трис-основание, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20

2.3. Реактивы и материалы

Агароза для электрофореза ДНК (Bio-Rad, США; Serva, ФРГ)

Ампициллин (Fisher scientific, США)

Бакто-агар (Difco, США)

Бакто-триптон (Difco, США)

Бромфеноловый синий (Serva, ФРГ)

Глицерин (Serva, ФРГ)

Дезоксинуклеотидтрифосфаты:

дАТФ (Pharmacia, Швеция)

дЦТФ (Pharmacia, Швеция)

дГТФ (Pharmacia, Швеция)

дТТФ (Pharmacia, Швеция)

Дезоксихолат натрия (Serva или Merck, обе ФРГ)

ДНК-лигаза фага T4 (MBIFermentas, Литва)

Додецилсульфат натрия (ДДС-натрия) (Serva, ФРГ)

Дрожжевой экстракт (Difco, США)

Кальций хлористый (Merck, ФРГ)

Карбенициллин (Serva, ФРГ)

Магний хлористый (Serva, ФРГ)

Полиэтиленгликоль 6000 (Fluka, Швейцария или Merck, ФРГ)

Рестрикционные эндонуклеазы:

SmaI (NEB, Англия)

NdeI (NEB, Англия)

BamHI (NEB, Англия)

HindIII (NEB, Англия)

Трис (гидроксиэтиламинометан) "тризма" или "Sigma 7-9" (Sigma, США)

ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль) (Serva, ФРГ)

Этидиум бромид (Fluka, Швейцария)

m-толуиловая кислота (Sigma Aldrich, США).

2.4. Олигонуклеотидные праймеры

В работе применялся ряд олигонуклеотидных праймеров в зависимости от цели проводимого эксперимента. В таблице 4 приведены олигонуклеотидные праймеры, которые были использованы при скрининге генов, ответственных за биосинтез экзополисахаридов; при создании векторных конструкций (фланкирующие структурную часть генов и содержащие необходимые сайт

рестрикции); при секвенировании нуклеотидной последовательности вектора между промотором и искомым геном.

Таблица 4. Олигонуклеотидные праймеры

праймер	последовательность, 5'→3'
pssAF	AACAGAGTACGATCCTTGAGCAT
pssAR	GACGTAGTAGAGATCGCTGGC
pssBF	ACAGGAATTCACCGTCAACATC
pssBR	TCCCGTCTTGCCGTAGGT
prsDF	TACTTGCGTTGATGCTTTACAC
prsDR	CGACAGTGACTTGCTTGGTAG
prsEF	GCATGCCGGGATAGAGTTTTA
prsER	GCTCTACAAGAAGGGGCTCGT
rosRF	TATGACGGATATAGCAGGCAATG
rosRR	GTCGATGCTTTCGAAAATGCTCAG
pssBF_NdeI	AAG GCA TAT GCT GAG GAC ATT CGA AAA GGC
pssBR_NdeI	ATT CCG GAT CCT TAT CAC GCC AGT TCG
RosRF_NdeI	AAA GCA TAT GAC GGA TAT CGC GAC CGG C
RosRR_NdeI	TTT GGA TCC TCA TCA GCC TCT GCC GC
prPSSA_F	TAC GAC ATA TGA GCA TCA CGG AAT TAA ACA AC
prPSSA_R	AGC CAT ATG TCT TTC TCA CAA AGC TCA GAA
prPSSB_F	AAA AGG CAT ATG CTG AGG ACA TTT GAA AAG GCG GCG
prPSSB_R	TTC AGC CAT ATG CGC AGG TGA TCA CGC CG
prROSR_F	GAA AGC ATA TGA CGG ATA TAG CGA CC
prROSR_R	TGT CGC ATA TGC TTT CGA AAA AGC TCA GC
FpJB658	ACAGGAGTGCAAAAAATGGCTATCT
M13 Forward	GTTGTAAAACGACGGCCAGTG
M13 Reverse	AGCGGATAACAATTTACACAGGA

2.5. Методы исследования

2.5.1. Выделение ДНК

С целью выделения бактериальной ДНК культуры ризобии выращивали в 100 мл. питательной среды ТУ в колбах Эрленмейера объемом 250 мл. при 28°C и постоянном перемешивании для обеспечения достаточной аэрации в течение 2 суток.

При выделении бактериальной ДНК ризобий для дальнейшего проведения ПЦР использовали ионообменную смолу Chelex100, приготовленную с использованием следующих реагентов: Triton X-100 (1%), Tween-20 (1%), Chelex 100, TRIS-HCl (pH 9,1, 100 mM), крезоловый красный и ddH₂O. Для этого растворяли 0,5 г. Chelex 100, 5 мл. TRIS-HCl и 0,5 мл. Triton X-100 в 50 мл. в ddH₂O (Баймиев и др., 2011). Добавляли небольшое количество красителя (крезоловый красный) и перемешивали до полного растворения. Во время использования постоянно перемешивали готовый реактив. Для выделения ДНК бактерий стерильной бактериальной петлей брали небольшое количество бактерий и помещали на стенку эппендорфа (Eppendorf, Германия) объемом 1,5 мл. Далее, в каждую пробирку с бактериями добавляли по 200 мкл. смолы Chelex. Содержимое пробирок тщательно ресуспендировали на центрифуге-вортекс «Микроспин» (BioSan Ltd, Латвия), а затем помещали в термостат на 10 минут при температуре 95°C. После этого повторно перемешивали содержимое пробирок на приборе Микроспин и центрифугировали пробирки на приборе Eppendorf 5804R (Германия), на максимальных оборотах в течение 5 минут. Надосадочная жидкость содержала необходимую ДНК. В дальнейшем полученную ДНК использовали в качестве матрицы для амплификации исследуемых генов (*pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD* и *prsE*, регулирующих биосинтез ЭПС у *R. leguminosarum*) методом ПЦР.

Для выделения высокомолекулярной ризобиальной ДНК также использовали и метод Грэхэма (Graham, 1978) с некоторыми модификациями.

2.5.2. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей и подбор специфичных праймеров к исследуемым генам

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей был проведен в Международной базе данных нуклеотидных последовательностей GenBank (ресурс базы данных NCBI), с помощью ресурса Blast базы данных NCBI (программа Blastn), а также с помощью пакета компьютерных программ «Lasergene» фирмы (DNASTAR, Inc., США).

Так, поиск заданной последовательности ДНК производили в базе данных GenBank, на основе базы данных NCBI. Для этого в окошке Search открывали вкладку Nucleotide и вводили в поле название искомого микроорганизма и необходимого гена. Полученную нуклеотидную последовательность копировали в буфер обмена программы EditSeq пакета Lasergene (DNASTAR, Inc., США) для дальнейшей работы.

Подбор специфичных праймеров производили в программе PrimerSelect пакета Lasergene (DNASTAR, Inc., США). В подменю Primer Characteristics устанавливали желаемую температуру плавления праймеров, а так же длину и размеры шпилек и димеров. В подменю Primer Locations устанавливали размер ампликона. Для автоматического подбора праймеров по указанным характеристикам переходили в меню Locate и выбирали Primers&Probes.

2.5.3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и real-time ПЦР

Аmplification участков ДНК осуществляли с использованием стандартных наборов на амплификаторе «Терцик МС-2», «ДНК-технология».

Перед началом работы располагали в штативе буфер Taq-полимеразы, dNTP, растворы праймеров для разморозки, затем ресуспендировали на центрифуге-вортекс «Микроспин» (BioSan ltd, Латвия).

Состав реакционной смеси для 1 пробирки (общий объем реакционной смеси 20 – 30 мкл) составлял: 67 мМ трис-НСl, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 1,5 мМ MgCl₂, 0,01% Tween-20, 0,1 мкг геномной ДНК, по 10 пМ каждого праймера, по 200 мкМ дАТФ, дЦТФ, дТТФ, дГТФ и 1 е.а. Taq-полимеразы. Во

избежание испарения жидкости на поверхность каждой реакционной смеси добавляли по 1 капле минерального масла.

Вначале проводилась денатурация ДНК при 95°C в течение 1 мин., после чего осуществлялось 30 циклов амплификации, каждый из которых включал стадию денатурации ДНК (30 сек. при 95°C), стадию отжига праймеров при соответствующей для каждой пары праймеров температуре отжига (1 мин 40 сек.), а также стадию элонгации (1 мин 30 сек.) при температуре 72°C, которая оптимальна для активности Taq ДНК полимеразы. На заключительной стадии реакционная смесь выдерживалась при температуре 72°C в течение 2 мин для завершения построения комплементарных цепей фрагментов ДНК и исключения копий, содержащих не полностью достроенные молекулы. После проведения завершающей стадии прибор переходил в режим хранения при 10°C.

В случае проведения ПЦР в реальном времени для определения интенсивности транскрипции гена *rosR* во время активации промотора P_m и в тот момент, когда он выключен, реакцию проводили на термоциклере Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, Австралия) в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I. Ввиду того, что для проведения реакции необходимо выбрать ген, который сыграет роль референсного гена (housekeeping), кодирующего белок, необходимый для гомологичной рекомбинации, нами был использован ген *gcsA*. При необходимости индукции промотора, культивировали исследуемые штаммы на питательной среде с добавлением 1 мМ *m*-толуиловой кислоты.

2.5.4. Аналитический гель-электрофорез ДНК

Электрофоретический анализ продуктов ПЦР осуществляли в 1-2% (в зависимости от длины фрагментов ДНК) горизонтальном агарозном геле. В качестве буферной системы служил ТАЕ-буфер, полученный путем добавления к 20 мл 50х-ного ТАЕ буфера 980 мл дистиллированной воды. Для приготовления геля к агарозе добавляли 2 мл 50х-ного ТАЕ буфера, перемешивали и расплавляли смесь в микроволновой печи в течение 2-3 минут. Агарозу разливали на ровную поверхность в специальную камеру, соблюдая толщину геля 2-5 мм. Затем для

появления «колодцев» в геле устанавливали две пластиковые гребенки, толщина которых составляла 1,5 мм., ширина зубчиков от 3 до 8 мм.

При электрофоретическом фракционировании использовали ДНК маркер 100-1000 п.н. с дополнительным фрагментом 1500 п.н. (Евроген, Россия). Запуск электрофореза производили при помощи источника питания (Источниками питания служили приборы модели 250/2.5 фирмы Bio-Rad (США) или модели «Эльф – 4» фирмы ДНК-технология, Россия) при следующих параметрах: сила тока 400 мА, мощность 80Вт, напряжение 100 В. Контроль за электрофоретическим разделением осуществлялся визуально по движению полосы красителя. Электрофорез проводили 30 минут, затем гель вынимали из формы и помещали в кювету для окрашивания. В кювету с гелем наливали слабый раствор бромистого этидия и окрашивали в течение 5-7 мин. Далее гель промывали и помещали в УФ-трансиллюминатор. Под УФ светом трансиллюминатора проводили анализ, полученных результатов (длина волны 302 нм.). Документирование результатов проводили с использованием цифровой фотодокументационной системы фирмы UVP (США) и программы «LabWorks».

2.5.5. Определение ростостимулирующего эффекта ризосферных бактерий

Для определения ростостимулирующего эффекта ризосферных штаммов на семена исследуемых растений, в каждом опыте использовали 100 шт. растений. Бактерии культивировали на среде УМ в течение суток до концентрации 10^8 КОЕ/мл. Далее их разбавляли до концентрации 10^4 КОЕ/мл. и 10^5 КОЕ/мл. стерильной водой. Семена стерилизовали в течение 1 мин в 70% спирте и затем 20 минут в 5% растворе гипохлорита натрия с добавлением нескольких капель Tween-20. Затем семена на несколько секунд погружали в суспензию ризобактерий, а семена контрольных растений в стерильную воду. После этого семена размещали на стерильных чашках Петри и заматывали парафильмом. Чашки Петри выдерживали в термостате при 30°C в течение недели.

В случае оценки ростостимулирующего эффекта на всхожесть семян растений, процент всхожести семян рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{A}{B} \times 100\%,$$

где C – процент всхожести семян, A – количество проросших семян, B – количество посеянных семян.

При проведении экспериментов по измерению ростостимулирующего эффекта исследуемых штаммов на корневую систему и длину гипокотилей проростков, высоту стебля растений, длину и ширину самого большого листа на побеге, определяли среднее значение соответствующего ростового параметра опытных растений и сравнивали его со средним значением контрольных растений:

$$G = \frac{P_1 - P_2}{P_2} \times 100\%,$$

где G – показатель ростостимулирующего эффекта, P_1 – среднее значение ростового параметра опытных проростков, P_2 – среднее значение ростового параметра контрольных проростков.

Вычисления среднего значения, стандартного отклонения и доверительного интервала проводили с помощью программы MS Office Excel 2010.

2.5.6. Обработка ДНК щелочной фосфатазой и полинуклеотидкиназой фага

T4

Для повышения эффективности лигирования плазмидных векторов со вставкой (но не амплифицированных фрагментов ДНК, как известно, уже не имеющих фосфатных групп на 5'-концах, вследствие особенностей стандартного химического синтеза олигонуклеотидных праймеров) предварительно удаляли 5'-концевой остаток фосфорной кислоты на концах расщепленного рестриктазой вектора, обработкой щелочной фосфатазой. Дефосфорилирование проводили в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl (рН 9,0), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ спермидина и 1 мМ ZnCl₂ при 37⁰С в течение 30 мин в присутствии 0,1 е.а. фермента. Щелочную фосфатазу удаляли двукратной фенольной обработкой. Затем препарат ДНК осаждали этанолом и центрифугировали в микроцентрифуге модели 320а

(ПНР) 5 мин при 12000 об/мин. Осадок, отмытый от следов фенола 70%-ным этанолом, подсушивали и растворяли в требуемом объеме бидистиллированной воды.

При проведении сайт-направленного мутагенеза генов, вектор-ампликон уже не имеет фосфатных групп на 5'-концах и для лигирования его со вставкой, представляющей собой также амплифицированный фрагмент ДНК, необходимо 5'-концы последней обрабатывать T4 полинуклеотидкиназой. Для переноса концевой фосфатной группы АТФ на 5'-конец олигонуклеотидного праймера использовали киназный буфер (50 мМ трис-НСl рН 7,6, 10 мМ MgCl₂, 50 мМ дитиотрейтола, 1 мМ спермидина), 0,05-0,1 мМ АТФ и 2 е.а. полинуклеотидкиназы фага T4. Инкубацию проводили в течение 30 мин при 37⁰С. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 20 мМ и фермент удаляли фенольной обработкой. Затем препарат осаждали этанолом, отмывали от следов фенола 70%-ным этанолом, подсушивали и растворяли в требуемом объеме бидистиллированной воды.

2.5.7. Расщепление ДНК рестрикционными эндонуклеазами

Расщепление ДНК проводили в буферах, рекомендованных фирмами-поставщиками. Время рестрикции варьировало от 1 час до 1 суток в зависимости от цели эксперимента, а также от количества расщепляемого препарата ДНК и единиц активности взятого в реакцию фермента.

Для каждого конкретного фермента применялась наиболее оптимальная для него температура инкубации (30⁰С и 37⁰С). При комбинированном расщеплении препаратов ДНК двумя или более рестрикционными эндонуклеазами либо выбирали буферные растворы, наиболее оптимально соответствующие особенностям действия всех используемых ферментов, либо проводили последовательную инкубацию расщепляемой ДНК с разными ферментами, начиная с требующего более низкую ионную силу.

В экспериментах по молекулярному клонированию рестрикции эндонуклеазы инактивировали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 20 мМ с последующей обработкой смесью фенола и хлороформа.

2.5.8. Препаративный гель-электрофорез ДНК

Препаративный гель-электрофорез использовали для разделения различных форм плазмидной ДНК, рестриктазных фрагментов ДНК после их расщепления рестрикционными эндонуклеазами с целью их последующей элюции и очистки. Основными отличиями препаративного электрофореза от аналитического являлись толщина гелевой пластины и размер колодцев для нанесения препарата ДНК. В зависимости от количества разделяемого препарата толщина геля могла достигать от 3 мм до 1 см при ширине ячейки или колодца до 12 см.

По завершению рестрикции к препаратам расщепленной ДНК добавляли специальный буфер для нанесения, содержащий 6-ти кратный ТАЕ-буфер (для агарозных гелей) или ТВЕ-буфер (для полиакриламидных гелей), 50%-ный глицерин и маркерные красители ксиленцианол FF и бромфеноловый синий, и фракционировали их с помощью электрофореза.

Фрагменты ДНК элюировали из агарозного геля после препаративного электрофореза с помощью набора для очистки ДНК («Цитокин», Россия).

При препаративном расщеплении полноту рестрикции проверяли аналитическим электрофорезом соответствующих аликвот реакционной смеси в 0,8% - 2,0%-ных агарозных гелях.

2.5.9. Выделение и очистка плазмидной ДНК

Плазмидную ДНК выделяли методом мягкого лизиса (Clewel, Helinski, 1969) с некоторыми модификациями, заключавшимися в сильном уменьшении концентрации сахарозы в суспендирующем буфере и осаждении плазмидной ДНК из осветленного лизата полиэтиленгликолем. Колонией *E. coli*, несущей какую-либо плазмиду, засеивали 100 мл. среды Лурия-Бертани (LB), содержащей 150 мкг./мл. гентамицина или другие необходимые антибиотики и выращивали при 37°C без встряхивания в течение ночи. Для штамма *E. coli* XL1-Blue, несущего на

эписоме транспозон *Tn10*, определяющего устойчивость к тетрациклину кроме прочих антибиотиков добавляли 12,5 мкг/мл этого антибиотика. Часть полученной ночной культуры переносили, обеспечив ее 100-кратное разбавление, в колбу со свежеприготовленной средой LB, содержащей требуемые антибиотики. Нарращивание продолжали до достижения оптической плотности, соответствующей концентрации $2-3 \times 10^8$ клеток/мл (обычно 14-16 часов).

Бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 3000 об./мин. в течение 10 мин. на центрифуге Eppendorf 5804R (Германия). Осадок суспендировали в 8 мл. 10%-ной сахарозы. После добавления 2 мл. свежеприготовленного раствора лизоцима (10 мг/мл в 250 мМ трис-HCl, pH 7,8) выдерживали 10 мин при 0°C и добавляли 2 мл. 0,5 М ЭДТА и продолжали инкубацию еще в течение 5 мин при прежних условиях. Лизис проводили с помощью смеси детергентов бридж 58-дезоксихолат натрия (конечные концентрации 1% и 0,4%, соответственно). Осторожно перемешивали в течение 5 мин, пока раствор не становился вязким и прозрачным. Полученный лизат осветляли в ультрацентрифуге Spinco L2-65B (Beckman-Coulter, США) в бакет-роторе SW-41 в течение 30 мин при 39000 об./мин. Осторожно сливали супернатант, не допуская перетекания вместе с ним иногда образующегося вязкого придонного слоя, содержащего хромосомную ДНК, и добавляли к нему 1/5 объема 5 М NaCl и 1/4 объема 50%-го полиэтиленгликоля 6000. При 0°C в холодильнике в течение нескольких часов формировался осадок плазмидной ДНК, содержащий загрязняющее количество РНК, белка, полисахаров.

Сформированный осадок собирали в центрифуге Eppendorf 5804R при 3000 об./мин в течение 10 мин. После растворения осадка в 1 х TE перед этапом депротенизации проводили удаление остаточного полиэтиленгликоля встряхиванием с хлороформом и расслаиванием в центрифуге Eppendorf 5804R при 2500 об./мин в течение 5 мин. Депротенизацию проводили встряхиванием с равным объемом смеси хлороформа и 80%-ого свежеперегнанного фенола (pH 8,0), взятых в соотношении 1:1 в течение 10 мин. Затем проводили центрифугирование в центрифуге Eppendorf 5804R при 2500 об./мин в течение

20 мин. Верхний водно-солевой слой, содержащий ДНК, отбирали и подвергали повторной депротеинизации. Эту процедуру повторяли до тех пор, пока не исчезала интерфаза, состоящая из денатурированного белка. Затем супернатант встряхивали с равным объемом хлороформа и после центрифугирования осаждали ДНК двумя объемами этилового спирта. Осадок ДНК промывали 70%-ным этанолом для удаления следов фенола и хлороформа и растворяли в соответствующем объеме 1 x TE.

При анализе рекомбинантных клонов для определения размера вставки применяли быстрый метод щелочного лизиса бактериальных колоний (Birnboim, Doly, 1979). Для этого тefлоновыми палочками (изготовленными вручную из листа фторопласта толщиной 1,5 мм) переносили бактериальные колонии в микроцентрифужные пробирки и тщательно суспендировали в 100 мкл раствора I, содержащего 50 mM трис-HCl (pH 7,8) и 20 mM ЭДТА. Затем добавляли 200 мкл раствора II, содержащего 1%-ный раствор SDS натрия и 0,2 M NaOH. После осторожного перемешивания через 5 мин добавляли 150 мкл 5M ацетата калия (pH 5,0). Тщательно перемешав, выдерживали при 0°C в течение 10 мин и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 5 мин в микроцентрифуге Mini-Spin plus (Eppendorf, Германия). Осторожно отбирали осветленную жидкость, не захватывая осадок и липидный слой, и осаждали ДНК двумя объемами этанола при -70°C. После растворения сформировавшегося и собранного в микроцентрифуге в минимальном объеме 1 x TE препараты ДНК были готовы или для их непосредственного анализа агарозным гель-электрофорезом или для расщепления соответствующими рестрикционными эндонуклеазами.

2.5.10. Подготовка компетентных клеток *E. coli*

Компетентные клетки *E. coli* готовили как предложено Hanahan (1983). 1 мл ночной культуры определенного штамма *E. coli* штамма вносили в колбу на 500 мл со 100 мл среды LB (для штамма *E. coli* XL1-Blue содержащей 12,5 мкг/мл тетрациклина) и наращивали клетки до $D_{550}=0.3$ при 37°C, при интенсивной аэрации на орбитальном встряхивателе. Затем собирали клетки

центрифугированием в стерильных центрифужных стаканах в центрифуге Eppendorf 5804R при 3000 об/мин, 10 мин. Удаляли супернатант и осторожно суспендировали клетки в 25 мл холодного (4°C) буфера I (10 мМ CaCl₂, 50 мМ MnCl₂, 100 мМ KCl, 30 мМ ацетат калия, pH 5,8). Повторно проводили центрифугирование при 2500 об/мин, 10 мин. Удаляли супернатант и также мягко суспендировали клетки в 5 мл холодного (4°C) буфера II (75 мМ CaCl₂, 10 мМ KCl, 15%-ный глицерин, 10 мМ MOPS, pH 6,5). Оба буфера стерилизовали автоклавированием. Расфасовывали клеточную суспензию по 200 мкл в предварительно охлажденные стерильные полипропиленовые микропробирки и замораживали при -70°C.

2.5.11. Трансформация компетентных клеток *E. coli* плазмидной ДНК

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* рекомбинантной ДНК проводили по методу Cohen (1972). К 200 мкл. размороженной на льду суспензии компетентных клеток, приготовленных и хранящихся, как описано в предыдущем разделе, добавляли 10 мкл лигазной смеси и инкубировали 20 мин. на льду. Подвергнув клетки тепловому шоку при 42°C в течение 2 мин, инкубировали их еще 1 час при 37°C, предварительно разбавив в 10 раз свежей средой LB. После инкубации суспензию клеток кратковременно осаждали в микроцентрифуге и осадок суспендировали в 100 мкл среды LB. Затем эту суспензию равномерно распределяли стерильным стеклянным шпателем по поверхности 1,5%-ного агара, приготовленного на LB среде с селективным антибиотиком и разлитого в чашки Петри. Жидкости давали возможность впитаться в агар или, если было необходимо, подсушивали его поверхность потоком стерильного воздуха в ламинарном боксе и чашки Петри в перевернутом виде помещали в термостат (37°C) на 24 часа.

2.5.12. Автоматическое секвенирование ДНК ферментативным методом

Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК проводили на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 фирмы «Applied Biosystems» (США), используя наборы для секвенирования «Big Dye Terminator

v.3.1». Секвенирующие реакции проводили при следующем режиме: 96°C – 60 сек., 30 циклов, включающих 96°C – 35 сек., 48-49°C – 30 сек., 60°C – 2 мин. В конце проводили дополнительную элонгацию при 60°C в течение 3-4 минут. Состав реакционной смеси включал 4 мкл. «Terminator Ready Reaction Mix», 10-15 нг. амплифицированной или плазмидной ДНК-матрицы, 3,2 пкМ праймера. Смесь до конечного объема 10 мкл доводили деионизованной водой (MilliQ). Очистку от избытка невключившихся меченых дидезокситерминаторов проводили с помощью набора «Centri-Step» фирмы «Applied Biosystems» (США).

2.5.13. Приготовление электрокомпетентных клеток ризобий

В течение 2 суток наращивали жидкую культуру штаммов в среде TY при температуре 28⁰C до концентрации 10⁹ клеток на 1 мл. После этого культуру клеток разливали в стерильные центрифужные пробирки по 50 мл и охлаждали на снегу. Затем клетки осаждали на центрифуге Eppendorf 5804R, при охлаждении с последующей промывкой осадка 10% стерильным глицерином. Промывание осуществляли 4 раза, при этом добавляя по 40, 30, 20, 10 мл. жидкой культуры соответственно. Все операции с клетками проводили на снегу в ламинарном боксе для исключения контаминации другими микроорганизмами. После 4-й промывки клетки суспендировали в стерильном и охлажденном 1М сорбитоле, с последующей расфасовкой по стерильным полипропиленовым пробиркам по 50 мкл., фиксировали и хранили в морозильной камере при – 70°C.

2.5.14. Электропорация компетентных клеток ризобактерий

Электропорацию компетентных клеток проводили на электропораторе MicroPulser (Bio-Rad, США). При этом использовали электропорационные кюветы с расстоянием между электродами 0.1 см. При использовании для трансформации плазмид, выделенных методом мягког лизиса проводили ее дополнительную очистку смесью фенол-хлороформ и несколько раз переосаждали ДНК с последующей ее промывкой 70% этиловым спиртом для уменьшения концентрации солей, которые могут вызывать электрический пробой в кювете. При электропорации, также как и при приготовлении

электрокомпетентных клеток все операции проводили на льду при 0°C. После разморозки клеток в пробирки вносили 0.5-1 мкл раствора ДНК, перемешивали и переносили эту смесь в охлажденные кюветы, потом выбирая соответствующий режим электропорации, пропускали электрический ток через кювету. После этого смесь клеток и ДНК смывали питательной средой LB, и в стерильном эппендорфе подращивали в течение 2-3 часов. После инкубации суспензию клеток осаждали непродолжительным центрифугированием. После чего осадок, ресуспендированный в среде LB равномерно распределяли стерильным стеклянным шпателем на поверхности 1,5% агаризованной среды с селективным антибиотиком. Чашки с трансформированными ризобактериями наращивали в течение 2-х суток при 28°C.

2.5.15. Образование ризосферными бактериями биопленок на инертных поверхностях

Для получения биопленок использовали среды YM и RDM (Vincent, 1970) с применением 96-луночных пластиковых планшетов (полистерол) (Corning Inc., США). Для этого исходные и рекомбинантные штаммы ризосферных бактерий выращивали 48 часов в жидкой среде на качалке при 28°C и 140 об./мин до концентрации 10^8 - 10^9 КОЕ/мл. Затем культуру разводили свежей средой до 10^6 КОЕ/мл и переносили по 1 мл. в лунки 96-луночного пластикового планшета. На данном этапе также добавляли ампициллин, индуктор *m*-толуиловую кислоту в случае трансформированных штаммов, а также хлорид кальция (Ca^{2+} 0 мМ-4.5 мМ) в экспериментах по влиянию Ca^{2+} на толщину биопленок. Планшеты герметизировали Parafilm (Amcor, США) и инкубировали при температуре 18°C-38°C и 50 об./мин. в течение 7 суток. После культивирования из лунок удаляли среду с планктонными клетками.

В случае культивирования биопленок на 96-луночных планшетах из лунок сначала удаляли среду с планктонными клетками. Окраска ризосферных бактерий по методу Грама. Биопленки промывали 1М фосфатносолевым буфером (PBS, pH 6,5). Далее в течение 5 мин окрашивали основным красителем (0.1% раствор

генциан фиолетового (Агат-Мед, Россия)) и осторожно сливали содержимое лунки. Добавляли раствор Люголя и оставляли на 2 минуты, после чего промывали лунки 96%-ным раствором этанола. Затем еще раз промывали биопленки водой и добавляли дополнительный краситель – фуксин (Химреактивснаб, Россия). Окрашивание производили в течение 2-х минут, после чего несколько раз аккуратно промывали лунки водой, смывая краситель.

Микроскопирование проводили с помощью микроскопа Axio Imager M1 (CarlZeiss, Германия) с флуоресцентным фильтром. При необходимости детекции меченых белком GFP ризобий использовали набор светофильтров №10 (полоса возбуждения BP 450–490, испускания BP 515–565). А также лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM510 на базе инвертированного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия). Для возбуждения автофлуоресценции использовали аргоновый лазер 30 мВт с длиной волны 488 нм, дихроичным зеркалом 490 нм и пропускающим светофильтром 505 нм.

2.5.16. Оценка зависимости биопленкообразования от логарифма числа живых клеток при росте культур на несменяемой среде

После культивирования бактерий из лунок удаляли среду с планктонными клетками. Биопленки промывали 1М фосфатносолевым буфером (PBS, pH 6,5), окрашивали 5 мин 0.1% об. раствором генциан фиолетового (Агат-Мед, Россия) и осторожно промывали водой. Связавшийся с биомассой биопленок краситель растворяли в этаноле и измеряли оптическую плотность при длине волны 590 нм. (O'Toole, Kolter, 1998). Оптическую плотность образцов измеряли с помощью прибора EnspireModel 2300 MultilabelMicroplateReader (PerkinElmer, США). Строили кривую роста и размножения клеток.

2.5.17. Подготовка корней томата к микроскопированию

Семена растений в течение одной минуты стерилизовали в 70% спирте, а через 20 минут в 5% растворе гипохлорита натрия и проращивали в течение недели на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри, которые герметизировали Parafilm (Amcor, США). Далее проростки выдерживали при

покачивании (25 об./мин.) в суспензии ризобий (10^5 КОЕ/мл.) в 50 мМ фосфатносолевом буфере (PBS, pH7.2). Для приготовления суспензий использовали двухсуточные культуры бактерий, выращенные в жидкой среде YM и отмытые от среды PBS. Через 3 ч проростки промывали стерильным PBS и помещали в пробирки, содержащие 10 мл. жидкой среды MS. Растения выращивали в стерильных условиях 7 суток при 25°C и естественном освещении. Затем проростки однократно отмывали стерильным PBS (5 мин при покачивании 25 об./мин.) и корни нарезали на фрагменты длиной 10–15 мм для микроскопирования

2.5.18. Оценка количества адгезированных на корнях растений ризобактерий

Для инокуляции использовали бактерии, которые наращивали при 28°C на шейкере (150 об/мин) в течение двух суток в жидкой среде TY до концентрации 10^8 КОЕ/мл. Суспензию бактерий разбавляли до 10^5 КОЕ/мл, и инокулировали в ней корни растений в течение суток и рассматривали под микроскопом. После этого от каждого растения брали по 3 фрагмента корня длиной 1 см, отмывали их трижды стерильной водой по 5 мин на микрошейкере и гомогенизировали в 50 мкл. среды LB. Полученный объем разбавляли в 1000 раз и 50 мкл. этой суспензии рассеивали на агаризованную TY среду и выращивали в термостате при 28°C в течение семи суток. Количество адгезированных бактерий определяли по числу выросших колоний. Визуальное наблюдение меченых бактерий проводили на флуоресцентном микроскопе Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия).

2.5.19. Статистический анализ

На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения из n-числа повторностей (где $n \geq 10$) и их стандартные отклонения. Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента, значения t-критерия находили для 95% уровня значимости.

Данные в таблицах и на диаграммах представляют средние арифметические величины и стандартные ошибки, количество повторений указано для каждого случая отдельно.

Результаты обработаны с использованием стандартных пакетов программы Microsoft Excel 2010.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Идентификация генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR* в геноме

R. leguminosarum и *R. galegae*

В данной работе в качестве генов-регуляторов путей синтеза экзополисахаридов нами были выбраны следующие гены:

- *pssA* – ключевой ген, кодирует трансферазу, участвующую в начальной стадии биосинтеза ЭПС. Мутации в этом гене приводят к прекращению синтеза ЭПС;
- *pssB* – отрицательный регулятор биосинтеза экзополисахаридов, мутации в нем ведут к производству большего количества ЭПС мутантными штаммами (по сравнению со штаммами дикого типа), однако образованные ими клубеньки на корнях бобовых растений неспособны фиксировать азот;
- *rosR* – еще один ключевой ген, который кодирует регулятор транскрипции синтеза ЭПС и влияет на экспрессию генов *pss*, в том числе *pssA* и *pssB*, в ответ на сигналы окружающей среды;
- *prsD*, *prsE* – кодируют компоненты системы секреции белка типа I, которая экспортирует белки, связанные с поверхностным прикреплением и созреванием биопленки бактерий рода *Rhizobium*.

Представленные гены хорошо изучены, участвуют в синтезе экзополисахаридов и процессах сигналинга, а также формировании клубеньков. Ввиду этого, мы исследовали их в рамках воздействия на формирование биопленок ризобиями.

Для того чтобы изучить как влияет экспрессия исследуемых генов на синтез ЭПС и выживаемость ризобий в целом, нами был проведен скрининг 114 штаммов *R. leguminosarum* 3 штаммов *R. galegae* из коллекции микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН (штаммы были изолированы из клубеньков 10 видов дикорастущих бобовых растений) на предмет наличия у них генов регулирующих биосинтез экзополисахаридов (*pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*).

3.1.1. Проведение сравнительного анализа последовательностей генов, участвующих в биосинтезе ЭПС

Поиск последовательностей генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD* и *prsE* у *R. leguminosarum* был проведен в базе данных нуклеотидных последовательностей GenBank (ресурс базы данных NCBI). Сравнительный анализ последовательностей представленных в GenBank, с помощью ресурса Blast базы данных NCBI (программа Blastn) подтвердил, литературные данные о том, что гены *pssA* и *rosR* являются довольно консервативными (Janczarek et al., 2009; 2007). Ген *rosR* практически идентичен генам *ros* и *rosAR* агробактерий, а также гену *mucR* у *S. meliloti*. гены *prsD* и *prsE* широко представлены у *R. leguminosarum* (Long et al., 2001). Исследуемые гены идентифицированы у *R. tropici*, *R. esperanzae*, *R. etli*, *R. phaseoli*, *R. laguerreae*, *R. pusense*, а также у представителей близкородственного рода *Agrobacterium*, однако данные о присутствии генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR* в геноме *R. galegae* отсутствуют. Однако в работе Fraysse и соавт. (2003) было показано, что в установлении симбиотических отношений между *R. galegae* и бобовыми растениями, для инициации и распространения инфекционных нитей, а также для развития клубеньков, необходимо присутствие поверхностных полисахаридов, в том числе и ЭПС.

3.1.2. Скрининг генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR* в геноме *R. leguminosarum* и *R. galegae*.

Проведение ПЦР-амплификации фрагментов исследуемых генов, регулирующих биосинтез экзополисахаридов, позволило оценить, как часто данные гены идентифицируются у представителей *R. leguminosarum* и *R. galegae*. Для амплификации использовали олигонуклеотидные праймеры, подобранные к кодирующей части генов. Данные полученные при секвенировании амплифицированных последовательностей показали, что секвенированная последовательность гена *pssA* была гомологична последовательности зарегистрированной под номером AAG45930.2 (Janczarek and Skorupska, 2007), гена *pssB* AAB67614.2 (Janczarek and Skorupska, 2003), гена *prsD* AIZ50110.1

(Janczarek and Rachwal, 2014), гена *prsE* AIZ50109.1 (Janczarek and Rachwal, 2014), а в случае гена *rosR* AAB67614.2 (Janczarek, 2009) последовательностям представленным в GenBank у *R. leguminosarum* *bv. trifolii*.

В результате скрининга 114 штаммов *R. leguminosarum* на наличие у них гена *pssA*, положительный результат был отмечен у 38 штаммов (табл. 5). Ген *pssA* у *R. galegae* идентифицирован не был. Длина амплифицированной нуклеотидной последовательности фрагмента гена составляла 660 п.н. (рис. 7).

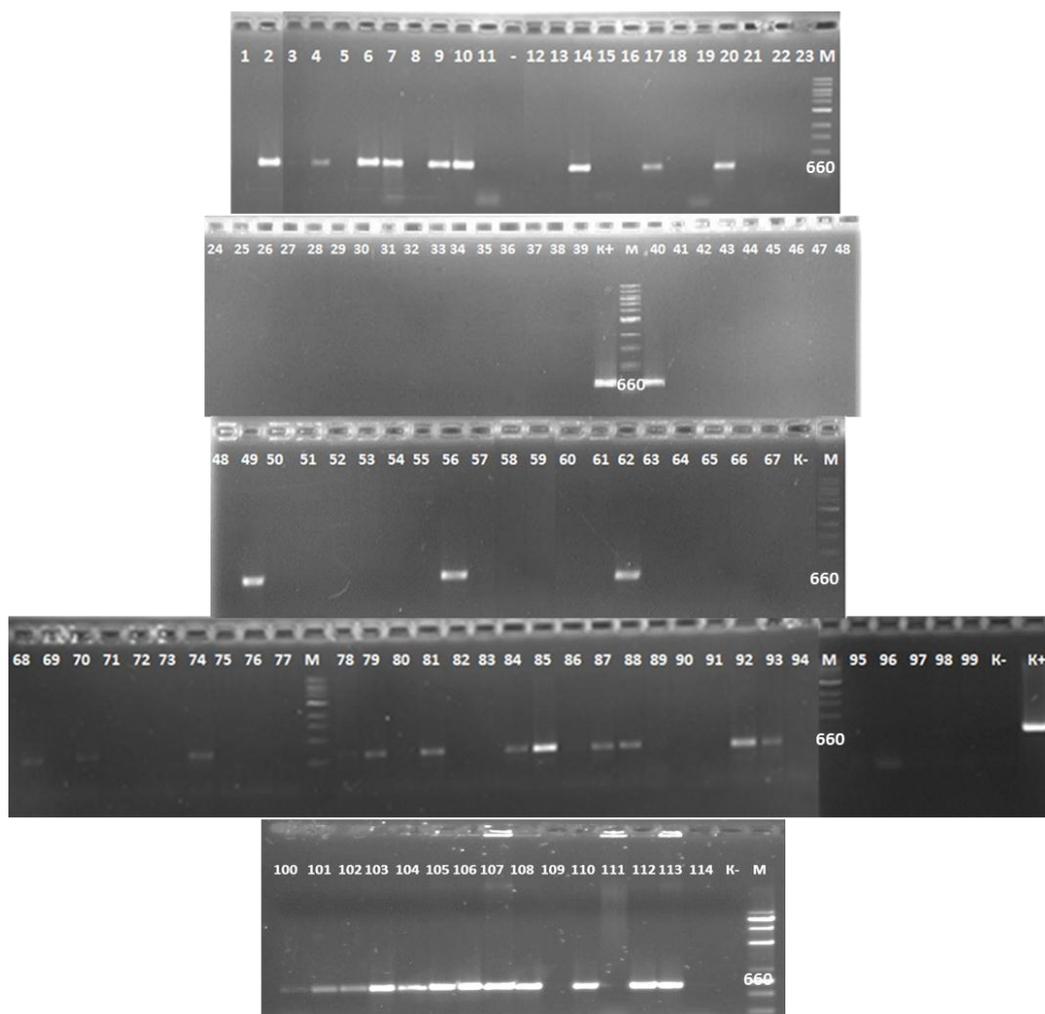


Рисунок 7. Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК штаммов *R. leguminosarum* на наличие гена *pssA* в их геноме.

1 – 114 штаммы *R. leguminosarum*,

К- – отрицательный контроль

К+ – положительный контроль

М – маркер, п.н.

Таблица 5. Результаты ПЦР анализа с праймерами специфичными к гену *pssA*

Всего исследуемых штаммов	Идентифицировано	Бобовое растение, из клубеньков которого были изолированы штаммы	Штаммы
12	3	Горошек заборный 9	<i>R. leguminosarum</i> VSe4, <i>R. leguminosarum</i> VSe8, <i>R. leguminosarum</i> VSe11
11	6	Горошек лесной 7	<i>R. leguminosarum</i> VSy2, <i>R. leguminosarum</i> VSy4, <i>R. leguminosarum</i> VSy6, <i>R. leguminosarum</i> VSy7, <i>R. leguminosarum</i> VSy9, <i>R. leguminosarum</i> VSy10
1	1	Горошек лесной 2008	<i>R. leguminosarum</i> VSy12 (2008)
12	0	Чина лесная 1	
12	1	Чина лесная 2	<i>R. leguminosarum</i> LSy17 (D2)
10	2	Чина лесная 3	<i>R. leguminosarum</i> LSy3 (D3), <i>R. leguminosarum</i> LSy12 (D3)
10	1	Чина лесная 4	<i>R. leguminosarum</i> LSy7 (D4)
1	1	Чина лесная 19	<i>R. leguminosarum</i> LSy10 (D19)
1	1	Чина лесная 18	<i>R. leguminosarum</i> LSy10 (D18)
1	1	Чина лесная 17	<i>R. leguminosarum</i> LSy10 (D17)
12	8	Чина гороховидная 4	<i>R. leguminosarum</i> LPi1 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LPi2 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LPi4 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LPi7 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LPi8 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LPi9 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LPi10 (D4),

			<i>R. leguminosarum</i> LPi11 (D4)
3	3	Чина гороховидная 2008	<i>R. leguminosarum</i> LPi19 (2008), <i>R. leguminosarum</i> LPi9 (2008), <i>R. leguminosarum</i> LPi3 (2008)
10	2	Чина луговая 5.	<i>R. leguminosarum</i> TRp4 (D5), <i>R. leguminosarum</i> TRp5 (D5)
10	3	Чина Литвинова 3	<i>R. leguminosarum</i> LAI 1 (D3), <i>R. leguminosarum</i> LAI 3 (D3), <i>R. leguminosarum</i> LAI 7 (D3)
2	2	Клевер розовый	<i>R. leguminosarum</i> THy1, <i>R. leguminosarum</i> THy2
2	1	Фасоль обыкновенная	<i>R. leguminosarum</i> Pvu5
4	2	Клевер луговой	<i>R. leguminosarum</i> TPr2, <i>R. leguminosarum</i> TPr3
3	0	Козлятник восточный	

Ген *pssB* был идентифицирован у 34 штаммов *R. leguminosarum*, а у *R. galegae* не был найден. Полученные результаты представлены в таблице 6. Размер продукта составлял 439 п.н.

Таблица 6. Результаты ПЦР анализа с праймерами специфичными к гену *pssB*

Всего исследуемых штаммов	Идентифицировано	Бобовое растение, из клубеньков которого были изолированы штаммы	Штаммы
12	5	Горошек заборный 9	<i>R. leguminosarum</i> VSe4, <i>R. leguminosarum</i> VSe8, <i>R. leguminosarum</i> VSe11,

			<i>R. leguminosarum</i> VSe12, <i>R. leguminosarum</i> VSe18
11	3	Горошек лесной 7	<i>R. leguminosarum</i> VSy3, <i>R. leguminosarum</i> VSy5, <i>R. leguminosarum</i> VSy7
1	1	Горошек лесной 2008,	<i>R. leguminosarum</i> VSy12 (2008)
12	6	Чина лесная 1	<i>R. leguminosarum</i> LSy1 (D1), <i>R. leguminosarum</i> LSy2 (D1), <i>R. leguminosarum</i> LSy8 (D1), <i>R. leguminosarum</i> LSy9 (D1), <i>R. leguminosarum</i> LSy10 (D1)
12	3	Чина лесная 2	<i>R. leguminosarum</i> LSy14 (D2), <i>R. leguminosarum</i> LSy17 (D2), <i>R. leguminosarum</i> LSy21 (D2)
10	1	Чина лесная 3	<i>R. leguminosarum</i> LSy11 (D3)
10	3	Чина лесная 4	<i>R. leguminosarum</i> LSy8 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LSy9 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LSy13 (D4)
1	1	Чина лесная 19	<i>R. leguminosarum</i> LSy10 (D19)
1	1	Чина лесная 18	<i>R. leguminosarum</i> LSy10 (D18)
1	1	Чина лесная 17	<i>R. leguminosarum</i> LSy10 (D17)
12	0	Чина гороховидная 4	
3	3	Чина гороховидная 2008	<i>R. leguminosarum</i> LPi19 (2008), <i>R. leguminosarum</i> LPi9 (2008), <i>R. leguminosarum</i> LPi3 (2008)
10	0	Чина луговая 5.	
10	0	Чина Литвинова 3	

2	2	Клевер розовый	<i>R. leguminosarum</i> THy1, <i>R. leguminosarum</i> THy2
2	2	Фасоль обыкновенная	<i>R. leguminosarum</i> Pvu5, <i>R. leguminosarum</i> Pvu6
4	2	Клевер луговой	<i>R. leguminosarum</i> TPr3, <i>R. leguminosarum</i> TPr4
3	0	Козлятник восточный	

Ген *prsD* был найден у 33 штаммов *R. leguminosarum*, а у *R. galegae* также как и в предыдущих случаях обнаружен не был (табл. 7). Размер продукта 813 п.н.

Таблица 7. Результаты ПЦР анализа с праймерами специфичными к гену *prsD*

Всего исследуемых штаммов	Идентифицировано	Бобовое растение, из клубеньков которого были изолированы штаммы	Штаммы
12	4	Горошек заборный 9	<i>R. leguminosarum</i> VSe2, <i>R. leguminosarum</i> VSe5, <i>R. leguminosarum</i> VSe7 <i>R. leguminosarum</i> VSe8
11	2	Горошек лесной 7	<i>R. leguminosarum</i> VSy4, <i>R. leguminosarum</i> VSy10
1	1	Горошек лесной 2008	<i>R. leguminosarum</i> VSy12 (2008)
12	0	Чина лесная 1	
12	0	Чина лесная 2	
10	6	Чина лесная 3	<i>R. leguminosarum</i> LSy1 (D3), <i>R. leguminosarum</i> LSy3 (D3), <i>R. leguminosarum</i> LSy6 (D3),

			<i>R. leguminosarum</i> LSy7 (D3), <i>R. leguminosarum</i> LSy8 (D3), <i>R. leguminosarum</i> LSy9 (D3)
10	4	Чина лесная 4	<i>R. leguminosarum</i> LSy2 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LSy3 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LSy8 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LSy14 (D4)
1	1	Чина лесная 19	<i>R. leguminosarum</i> LSy10 (D19)
1	1	Чина лесная 18	<i>R. leguminosarum</i> LSy10 (D18)
1	1	Чина лесная 17	<i>R. leguminosarum</i> LSy10 (D17)
12	0	Чина гороховидная 4	
3	2	Чина гороховидная 2008	<i>R. leguminosarum</i> LPi9 (2008), <i>R. leguminosarum</i> LPi3 (2008)
10	2	Чина луговая 5.	<i>R. leguminosarum</i> TRp6 (D5), <i>R. leguminosarum</i> TRp11 (D5)
10	2	Чина Литвинова 3	<i>R. leguminosarum</i> LAI 2 (D3), <i>R. leguminosarum</i> LAI 6 (D3)
2	1	Клевер розовый	<i>R. leguminosarum</i> THy2
2	2	Фасоль обыкновенная	<i>R. leguminosarum</i> Pvu5, <i>R. leguminosarum</i> Pvu6
4	4	Клевер луговой	<i>R. leguminosarum</i> TPr1, <i>R. leguminosarum</i> TPr2, <i>R. leguminosarum</i> TPr3, <i>R. leguminosarum</i> TPr4
3	0	Козлятник восточный	

ПЦР-анализ ДНК штаммов *R. leguminosarum* на наличие в их геноме гена *prsE* показал, что положительный результат отмечается в 49 из 114 случаев. В

штаммах *R. galegae* целевой ген обнаружен не был (табл. 8). Длина амплифицированной нуклеотидной последовательности фрагмента гена составляла 614 п.н.

Таблица 8. Результаты ПЦР анализа с праймерами специфичными к гену *prsE*

Всего исследуемых штаммов	Идентифицировано	Бобовое растение, из клубеньков которого были изолированы штаммы	Штаммы
12	9	Горошек заборный 9	<i>R. leguminosarum</i> VSe3, <i>R. leguminosarum</i> VSe5, <i>R. leguminosarum</i> VSe7, <i>R. leguminosarum</i> VSe8, <i>R. leguminosarum</i> VSe9, <i>R. leguminosarum</i> VSe11, <i>R. leguminosarum</i> VSe12, <i>R. leguminosarum</i> VSe17, <i>R. leguminosarum</i> VSe18
11	5	Горошек лесной 7	<i>R. leguminosarum</i> VSy2, <i>R. leguminosarum</i> VSy3, <i>R. leguminosarum</i> VSy7, <i>R. leguminosarum</i> VSy10, <i>R. leguminosarum</i> VSy11
1	1	Горошек лесной 2008,	<i>R. leguminosarum</i> VSy12 (2008)
12	0	Чина лесная 1	
12	1	Чина лесная 2	<i>R. leguminosarum</i> LSy23 (D2)
10	2	Чина лесная 3	<i>R. leguminosarum</i> LSy1 (D3), <i>R. leguminosarum</i> LSy11 (D3)
10	2	Чина лесная 4	<i>R. leguminosarum</i> LSy3 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LSy14 (D4)

1	1	Чина лесная 19	<i>R. leguminosarum</i> LSp10 (D19)
1	1	Чина лесная 18	<i>R. leguminosarum</i> LSp10 (D18)
1	1	Чина лесная 17	<i>R. leguminosarum</i> LSp10 (D17)
12	10	Чина гороховидная 4	<i>R. leguminosarum</i> LPi1 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LPi2 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LPi3 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LPi4 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LPi5 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LPi6 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LPi7 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LPi8 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LPi9 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LPi11 (D4)
3	2	Чина гороховидная 2008	<i>R. leguminosarum</i> LPi9 (2008), <i>R. leguminosarum</i> LPi3 (2008)
10	4	Чина луговая 5.	<i>R. leguminosarum</i> TRp4 (D5), <i>R. leguminosarum</i> TRp5 (D5), <i>R. leguminosarum</i> TRp9 (D5), <i>R. leguminosarum</i> TRp11 (D5)
10	3	Чина Литвинова 3	<i>R. leguminosarum</i> LA1 5 (D3), <i>R. leguminosarum</i> LA1 8 (D3), <i>R. leguminosarum</i> LA1 12 (D3)
2	2	Клевер розовый	<i>R. leguminosarum</i> THy1, <i>R. leguminosarum</i> THy2
2	1	Фасоль обыкновенная	<i>R. leguminosarum</i> Pvu5
4	4	Клевер луговой	<i>R. leguminosarum</i> TPr1, <i>R. leguminosarum</i> TPr2, <i>R. leguminosarum</i> TPr3, <i>R. leguminosarum</i> TPr4

3	0	Козлятник восточный	
---	---	------------------------	--

Скрининг 114 штаммов *R. leguminosarum* из коллекции микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН на предмет наличия в их геноме гена *rosR*, показал, что исследуемый ген идентифицируется у 44 штаммов. У штаммов *R. galegae* данный ген не был найден (табл. 9). Длина амплифицированного фрагмента гена составляла 296 п.н.

Таблица 9. Результаты ПЦР анализа с праймерами специфичными к гену *rosR*

Всего исследуемых штаммов	Идентифицировано	Бобовое растение, из клубеньков которого были изолированы штаммы	Штаммы
12	2	Горошек заборный 9	<i>R. leguminosarum</i> VSe8, <i>R. leguminosarum</i> VSe11
11	3	Горошек лесной 7	<i>R. leguminosarum</i> VSy1, <i>R. leguminosarum</i> VSy6, <i>R. leguminosarum</i> VSy8
1	1	Горошек лесной 2008,	<i>R. leguminosarum</i> VSy12 (2008)
12	3	Чина лесная 1	<i>R. leguminosarum</i> LSy10 (D1), <i>R. leguminosarum</i> LSy11 (D1), <i>R. leguminosarum</i> LSy12 (D1)
12	9	Чина лесная 2	<i>R. leguminosarum</i> LSy14 (D2), <i>R. leguminosarum</i> LSy15 (D2), <i>R. leguminosarum</i> LSy16 (D2), <i>R. leguminosarum</i> LSy17 (D2), <i>R. leguminosarum</i> LSy18 (D2), <i>R. leguminosarum</i> LSy19 (D2),

			<i>R. leguminosarum</i> LSy21 (D2), <i>R. leguminosarum</i> LSy22 (D2), <i>R. leguminosarum</i> LSy24 (D2),
10	3	Чина лесная 3	<i>R. leguminosarum</i> LSy3 (D3), <i>R. leguminosarum</i> LSy6 (D3), <i>R. leguminosarum</i> LSy9 (D3)
10	6	Чина лесная 4	<i>R. leguminosarum</i> LSy2 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LSy5 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LSy7 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LSy9 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LSy13 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LSy15 (D4),
1	1	Чина лесная 19	<i>R. leguminosarum</i> LSy10 (D19)
1	1	Чина лесная 18	<i>R. leguminosarum</i> LSy10 (D18)
1	1	Чина лесная 17	<i>R. leguminosarum</i> LSy10 (D17)
12	2	Чина гороховидная 4	<i>R. leguminosarum</i> LPi6 (D4), <i>R. leguminosarum</i> LPi11 (D4)
3	3	Чина гороховидная 2008	<i>R. leguminosarum</i> LPi19 (2008), <i>R. leguminosarum</i> LPi9 (2008), <i>R. leguminosarum</i> LPi3 (2008)
10	2	Чина луговая 5.	<i>R. leguminosarum</i> TRp4 (D5), <i>R. leguminosarum</i> TRp5 (D5)
10	2	Чина Литвинова 3	<i>R. leguminosarum</i> LA1 2 (D3), <i>R. leguminosarum</i> LA1 3 (D3)
2	2	Клевер розовый	<i>R. leguminosarum</i> THy1, <i>R. leguminosarum</i> THy2
2	1	Фасоль обыкновенная	<i>R. leguminosarum</i> Pvu5
4	4	Клевер луговой	<i>R. leguminosarum</i> TPr1,

			<i>R. leguminosarum</i> TPr2, <i>R. leguminosarum</i> TPr3, <i>R. leguminosarum</i> TPr4
3	0	Козлятник восточный	

Проведенный скрининг исследуемых генов у нескольких штаммов *R. galegae*, показал что, последовательности соответствующие генам *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE* у данного вида отсутствуют. Причинами этого может быть, как и то, что подобранные нами праймеры обладают высокой специфичностью к виду *R. leguminosarum*, так и то, что за синтез экзополисахаридов матрикса у данного вида ризобий отвечают другие гены.

В результате скрининга штаммов *R. leguminosarum*, изолированных из клубеньков бобовых растений, нами были идентифицированы все исследуемые гены, однако их наличие не всегда соответствовало 100% (табл. 10). Оказалось, что в некоторых исследуемых штаммах гены могут не идентифицироваться. При этом в 19 штаммах (16,7% от общего количества исследуемых штаммов) мы не обнаружили ни одного из представленных генов. Такие штаммы характеризуются скудным ослизнением клеток, по сравнению со теми, у которых были идентифицированы все 5 из 5 исследуемых генов (10 штаммов – 8,8% от общего количества изучаемых нами штаммов *R. leguminosarum*).

Таблица 10. Скрининг штаммов *R. leguminosarum* на предмет наличия у них генов регулирующих биосинтез экзополисахаридов

Растение-хозяин	Количество исследуемых штаммов	Штаммы с идентифицированным геном				
		<i>pssA</i>	<i>pssB</i>	<i>prsD</i>	<i>prsE</i>	<i>rosR</i>
Горошек заборный 9 / <i>Vicia sepium</i>	12	3	5	4	9	2
Горошек лесной 7 /	11	6	3	2	5	3

<i>Vicia sylvatica</i>						
Горошек лесной 2008 / <i>Vicia sylvatica</i>	1	1	1	1	1	1
Чина лесная 1 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	12	0	6	0	0	3
Чина лесная 2 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	12	1	3	0	1	9
Чина лесная 3 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	10	2	1	6	2	3
Чина лесная 4 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	10	1	3	4	2	6
Чина лесная делянка 19 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	1	1	1	1	1	1
Чина лесная делянка 18 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	1	1	1	1	1	1
Чина лесная делянка 17 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	1	1	1	1	1	1
Чина гороховидная 4 / <i>Lathyrus pisiformis</i>	12	8	0	0	11	2
Чина гороховидная 2008 / <i>Lathyrus pisiformis</i>	3	3	3	2	2	3
Чина луговая 5 / <i>Lathyrus pratensis</i>	10	2	0	2	4	2
Чина Литвинова 3 / <i>Lathyrus litvinovii</i>	10	3	0	2	3	2
Клевер розовый / <i>Trifolium hybridum</i>	2	2	2	1	1	1
Фасоль обыкновенная	2	1	2	2	1	1

/ <i>Phaseolus vulgaris</i>						
Клевер луговой / <i>Trifolium pratense</i>	4	2	2	4	4	3

Проведенный скрининг показал, что наиболее часто в геноме *R. leguminosarum* встречается ген *prsE* (рис. 8). Данный ген, как и ген *prsD*, который был идентифицирован в наименьшем количестве штаммов (29%), кодирует компоненты системы секреции таких белков, как гликаназы и рикадгезины, а также белка NodO. На втором и третьем месте расположились высококонсервативные гены *rosR* (39%) и *pssA* (33%), которые встречаются и близкородственных видов *R. leguminosarum*.

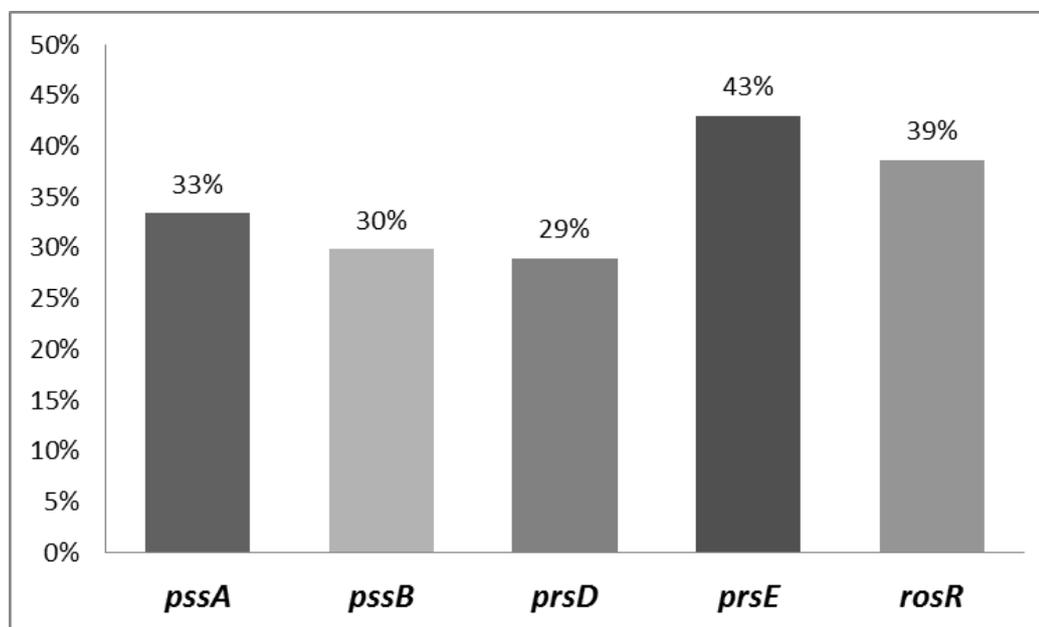


Рисунок 8. Идентифицированные в штаммах *R. leguminosarum* гены экзополисахаридов

В итоге были обнаружены 10 штаммов *R. leguminosarum*, у которых были идентифицированы исследуемые нами гены (табл. 11). У данных штаммов наблюдалось большее ослизнение клеточных стенок, по сравнению с другими штаммами, что указывает на их большую выработку экзополисахаридов и, как следствие, указывает на повышение конкурентоспособности штаммов в ризосфере.

Таблица 11. Ризобияльные штаммы, в геноме, которых были идентифицированы гены *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*

	Растение-хозяин	Штамм ризобий
1	Горошек лесной / <i>V. sylvatica</i>	<i>R. leguminosarum</i> VSy12 (2008)
2	Чина лесная / <i>L. sylvestris</i>	<i>R. leguminosarum</i> LSy10 (D19)
3	Чина лесная / <i>L. sylvestris</i>	<i>R. leguminosarum</i> LSy10 (D18)
4	Чина лесная / <i>L. sylvestris</i>	<i>R. leguminosarum</i> LSy10 (D17)
5	Горошек заборный / <i>Vicia sepium</i>	<i>R. leguminosarum</i> VSe8
6	Чина гороховидная / <i>L. pisiformis</i>	<i>R. leguminosarum</i> LPi9 (2008)
7	Чина гороховидная / <i>L. pisiformis</i>	<i>R. leguminosarum</i> LPi3 (2008)
8	Клевер розовый / <i>T. hybridum</i>	<i>R. leguminosarum</i> THy1
9	Фасоль обыкновенная / <i>P. vulgaris</i>	<i>R. leguminosarum</i> Pvu5
10	Клевер луговой / <i>T. pratense</i>	<i>R. leguminosarum</i> TPr3 (2004)

Для проведения дальнейших опытов мы использовали 5 из 10 обнаруженных нами штаммов *R. leguminosarum*, у которых были идентифицированы исследуемые нами гены ответственные за синтез ЭПС и, наблюдалось большее по сравнению с другими штаммами коллекции ослизнение клеточных стенок: *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12 (2008), *R. leguminosarum* LSy10 (D17), *R. leguminosarum* THy1, *R. leguminosarum* TPr3 (2004), а также штамм *R. galegae* 0702

3.2. Получение штаммов клубеньковых бактерий, трансформированных генами-регуляторами формирования биопленок

Ввиду того, что ЭПС играют важную роль в бобово-ризобияльном симбиозе, и, даже несмотря на то, что существует множество исследований,

посвященных их роли в этом процессе, механизмы, при которых ЭПС оказывают полезные эффекты на взаимодействия между бобовыми растениями и ризобактериями изучены лишь фрагментарно (Marczak et al., 2017). Так, например, все еще малоизвестно о регуляции экспрессии генов *pss* в ответ на сигналы окружающей среды, а она в свою очередь имеет неотъемлемое значение для выполнения роли этого полимера в бобово-ризобиальном симбиозе. Кроме того, качество и количество ЭПС выделяемых ризобиями, может влиять как на их аутоагрегацию, так и на образование биопленок (Rinaudi and Gonzalez, 2009; Sorroche et al., 2012). Взаимодействие ризобиальных клеток с поверхностью, играет решающую роль в инфицировании корневых волосков и образовании биопленок (Vogino et al., 2013). Так, для того, чтобы изучить механизмы формирования биопленок ризосферными бактериями на инертных поверхностях и на поверхности корней растений в искусственных симбиотических системах, где большую роль играет колонизация корней растений, нами были созданы векторные конструкции на основе плазмид широкого круга хозяев, содержащие гены, регулирующие биосинтез экзополисахаридов под управлением индуцибельных промоторов, которые будут способны стабильно реплицироваться и экспрессировать в клетках ризосферных бактерий.

3.2.1. Создание векторных конструкций на основе плазмид широкого круга хозяев, содержащих гены, регулирующие биосинтез экзополисахаридов

Интенсивная транскрипция целевых генов в векторных конструкциях под управлением сильных конститутивных промоторов может способствовать утрате данного вектора и останавливать рост бактерий, ввиду этого с целью регулирования включения и выключения промотора, нами была разработана схема клонирования генов-регуляторов ЭПС в вектор pJB658 класса ВНР (широкого круга хозяев) содержащий репликон *T2*, под управлением индуцибельного промотора P_m , который активируется *m*-толуиловой кислотой (3-метилбензойная кислота) (Sletta et al., 2004).

В качестве матрицы для ПЦР-амплификации последовательностей соответствующих кодирующим частям генов служила тотальная ДНК штамма *R. leguminosarum* Pvu5, выделенного из клубеньков фасоли обыкновенной (*Phaseoli vulgaris* L.). Амплификацию последовательностей целевых генов осуществляли с помощью Pfu-полимеразы, которая обладает высокой точностью включения нуклеотидов в продукт и 3'-5'-редактирующей активностью.

Мы амплифицировали последовательности целевого гена *pssB*, благодаря подобранной олигонуклеотидной паре праймеров FNdeI (содержал сайт рестрикции *NdeI*) и RBamHI (содержал сайт рестрикции *BamHI*), которые фланкировали структурную часть данного гена. Далее вектор pJB658 обработали рестриктазами *BamHI* и *NdeI*, для того чтобы получить «липкие концы», необходимые для дальнейшего клонирования. Так, был вырезан небольшой участок ДНК, который представлял собой сайты мишени для других рестриктаз. На место этой небольшой последовательности и был клонированы под управлением индуцибельного промотора Pm ген *pssB* (рис. 9). Благодаря наличию разных сайтов рестрикции на концах продуктов ПЦР-амплификации (*BamHI* и *NdeI*), клонируемая последовательность попадала в рамку считывания с сайта *NdeI* в правильной ориентации. Так, была получена генно-инженерная конструкция с геном *pssB*, которой, в дальнейшем, были трансформированы химически компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue. Наличие гена в полученном векторе подтвердил ПЦР-анализ с праймером, находившемся ниже Pm промотора - FpJB658 и соответствующего гену reverse праймера, а также проведенное ДНК-секвенирование. Секвенированная последовательность гена *pssB* была гомологична последовательности представленной в GenBank у *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, зарегистрированной под номером AAB67614.2 (Janczarek and Skorupska, 2003). Таким образом, была выделена и очищена плазида pJB658+pssB (Лавина и др., 2016b), в которой целевой ген находился под управлением индуцибельного промотора Pm.

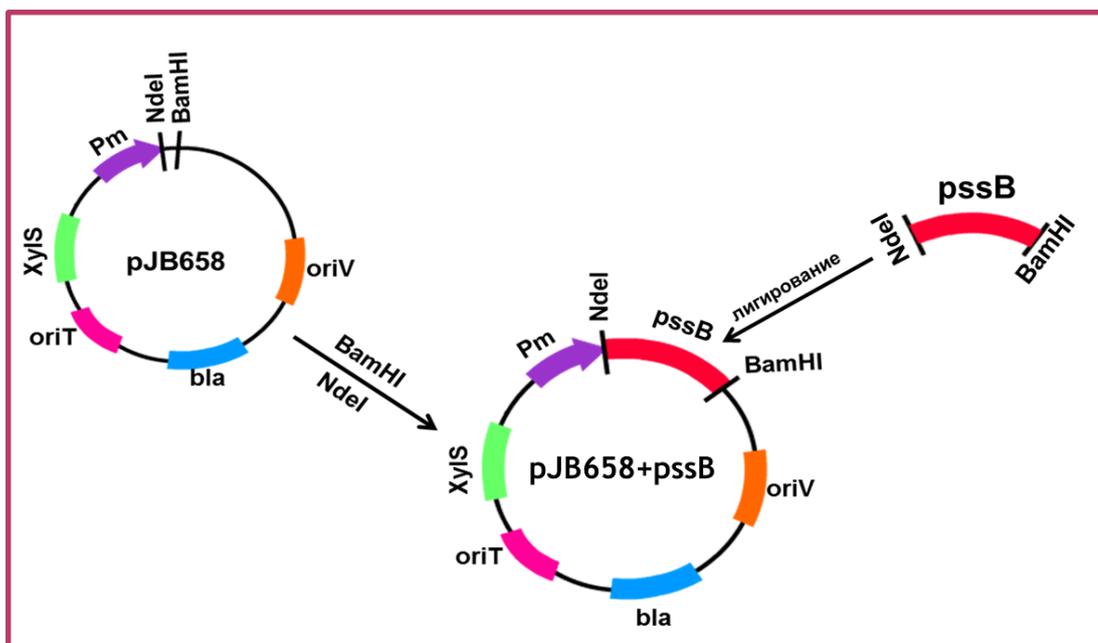


Рисунок 9. Схема получения конструкции pJB658 с геном *pssB*.

Для того чтобы изучить работу генов, участвующих в биосинтезе экзополисахаридов в искусственных симбиотических системах, где колонизация корней растений имеет первостепенное значение, и продемонстрировать их действие на образование биопленок ризобактериями, необходимо детектировать взаимодействие клубеньковых бактерий с корнями растений, не влияя на жизнеспособность ризобактерий и не изменяя при этом их фенотип. С этой целью в геном бактерий внедряются маркерные гены (чаще всего в настоящее время используются гены флуоресцентных белков, такие как GFP или RFP).

Ввиду этого для визуализации взаимодействия микроорганизмов с корнями растений, нами был получен вектор pJB658GFP, который использовался для создания плазмидных конструкций с генами *pssA* и *rosR*, ответственными за синтез экзополисахаридов. Ранее в нашей лаборатории была получена генно-инженерная конструкция pJN105TurboGFP, содержащая ген флуоресцентного белка серии TurboColors: TurboGFP (Баймиев и др., 2011). Так целевой ген *gfp* был амплифицирован из вектора pJN105TurboGFP, а для того, чтобы обеспечить конститутивную экспрессию зеленого флуоресцентного белка, данный ген был амплифицирован вместе с промотором фага T5 при помощи специфичных праймеров, содержащих на концах сайт рестрикции *HindIII*. Далее амплифицированную последовательность ДНК клонировали в промежуточный

вектор pAL-2T, применение которого обуславливается быстрым клонированием продуктов ПЦР без предварительной обработки рестриктазами или экзонуклеазами (Евроген, Россия). Лигирование происходило с помощью Quick-TA T4 ДНК лигазы. Затем плазмиду pAL-2TGFP обработали рестриктазой *HindIII* – так была получена последовательность ДНК, содержащая конститутивный промотор фага T5 и ген *gfp*. После этого целевая последовательность ДНК была клонирована в вектор pJB658 по сайту рестрикции *HindIII*. Таким образом, был получен вектор pJB658GFP (рис. 10).

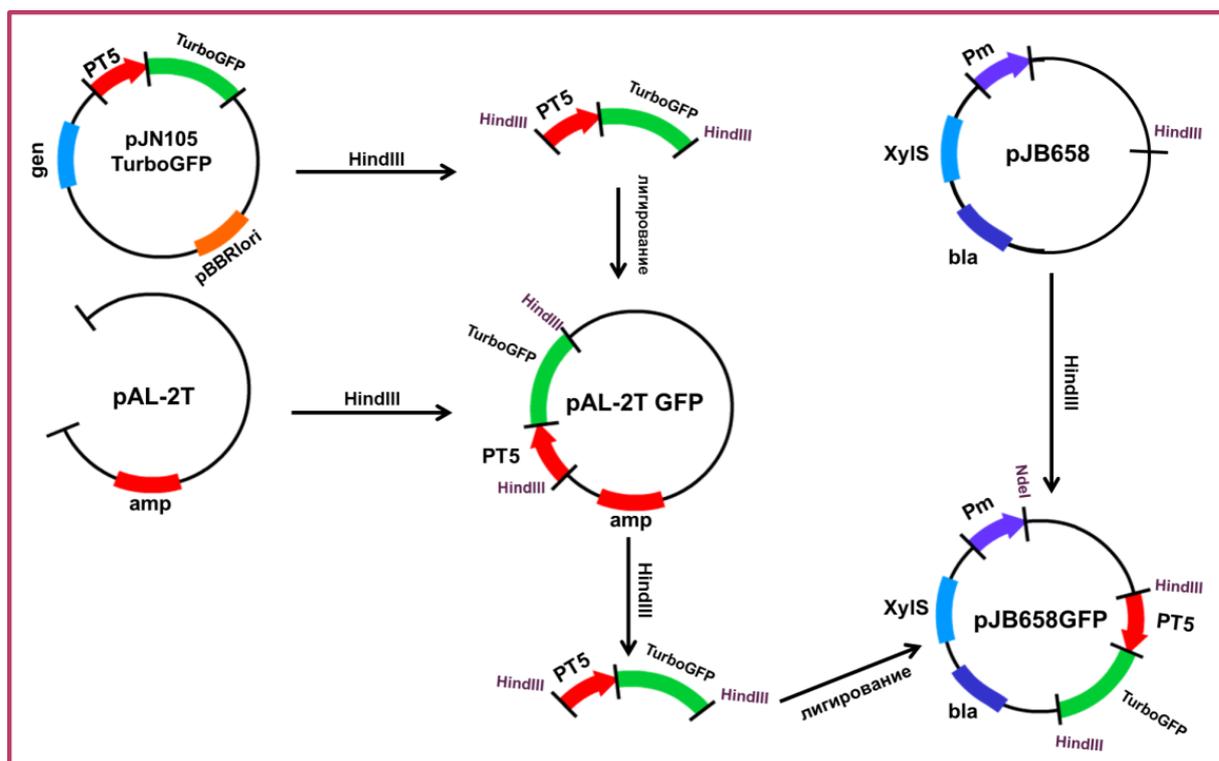


Рисунок 10. Схема создания вектора pJB658GFP.

Данной конструкцией были трансформированы химически компетентные клетки *E. coli*, которые получили способность экспрессировать белок GFP. Более того, бактерии обрели способность флуоресцировать в зелёном диапазоне при их освещении синим светом (полоса возбуждения ВР 450–490, испускания ВР 515–565) (рис. 11).

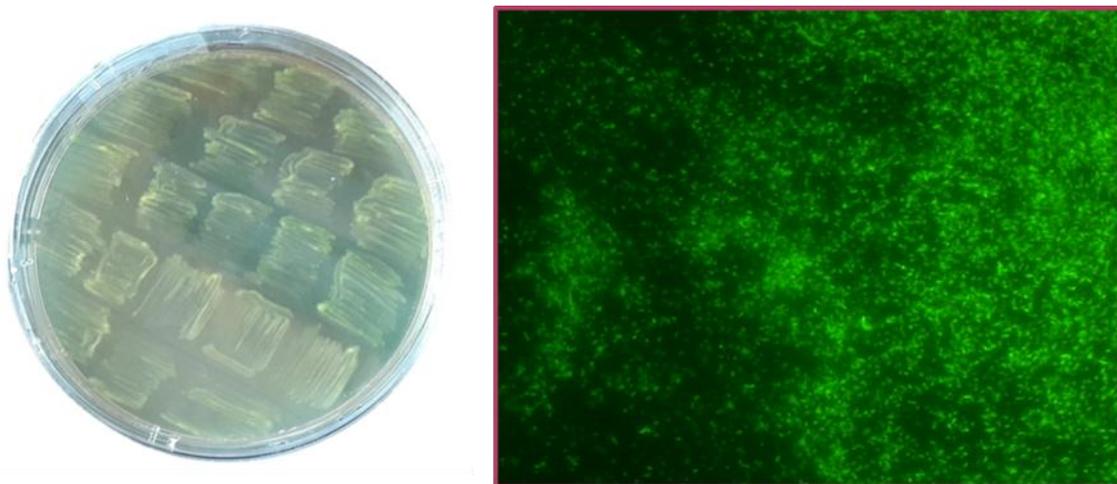


Рисунок 11. *E. coli*, рекомбинантные по гену *gfp*.

Наличие целевой последовательности промотора фага T5 и гена *gfp* в полученном векторе подтвердил ПЦР-анализ с праймером M13 reverse, находящимся ниже последовательности промотора PT5 и обратным праймером к гену *gfp* (*gfpR*). А также ДНК-секвенирование продукта данной ПЦР-амплификации. При этом ризобии, трансформированные полученной плазмидой pJB658GFP, имели устойчивое зеленое окрашивание, что значительно облегчало отбор рекомбинантных штаммов и позволяло отслеживать стабильность данной плазмиды в процессе культивирования бактерий.

Вектор pJB658GFP использовался для создания плазмидных конструкций с генами *pssA* и *rosR* (рис. 12). Для этого амплифицировали последовательности целевых генов *pssA* и *rosR* с помощью специфичных праймеров с сайтами рестрикции *NdeI*, фланкирующими структурную часть генов. Далее проводили лигирование амплифицированных последовательностей ДНК и промежуточного вектора pAL-2T. Для подтверждения наличия последовательности генов в векторах pAL-2T *pssA* и pAL-2T *rosR* проводили ПЦР с соответствующими праймерами. Затем вектора pAL-2T *pssA/rosR* и pJB658GFP обрабатывали рестриктазой *NdeI*. После проведения препаративного гель-электрофореза, необходимого для разделения плазмидной ДНК и рестриктазных фрагментов ДНК, представляющих собой последовательности ДНК с т.н. липкими концами, была проведена их элюция и очистка. В конечном итоге, было произведено лигирование необходимого гена (*pssA/rosR*) и вектора pJB658GFP по липким

концам. В дальнейшем, с помощью векторов pJB658GFP PssA и pJB658GFP RosR, были трансформированы химически компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue. Наличие гена в полученном векторе подтвердил ПЦР-анализ. Также осуществляли проверку ориентации гена в конструкции. Для этого проводили ПЦР с праймером FpJB658, комплементарным последовательности, которая находится ниже промотора Pm, и прямым (pssAF/rosRF) и обратным (pssAR/rosRR) праймерами целевого гена. Данные полученные при секвенировании исследуемых последовательностей подтвердили их идентичность с последовательностями, представленными в GenBank. Секвенированная последовательность гена *pssA* была гомологична зарегистрированной под номером под номером AAG45930.2 (Janczarek and Skorupska, 2007) последовательности представленной в GenBank у *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. А в случае гена *rosR* у *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, зарегистрированной под номером AAB67614.2 (Janczarek, 2009).

Таким образом, гены *pssA* и *rosR* были клонированы в промежуточный вектор pAL-2T, а затем в вектор pJB658GFP под индуцибельным промотором Pm (Лавина и др., 2017).

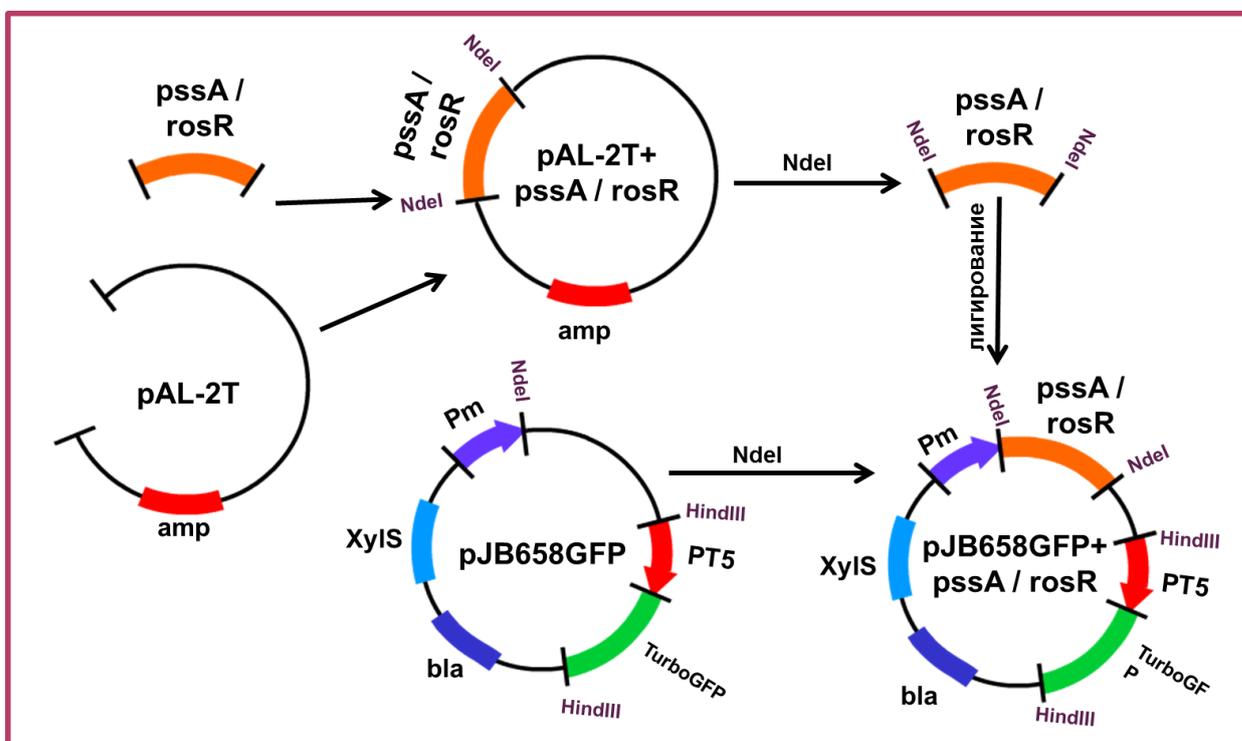


Рисунок 12. Схема получения вектора pJB658GFP и генами *pssA* или *rosR*.

3.2.2. Рекомбинантные по генам-регуляторам формирования биопленок ризобий штаммы

Полученными ранее конструкциями были трансформированы штаммы ризобий, проанализированные нами ранее на предмет наличия в их геноме генов, участвующих в биосинтезе экзополисахаридов. Для этого были подготовлены – электрокомпетентные клетки *R. leguminosarum*, проведена трансформация компетентных клеток ризобий плазмидной ДНК методом электропорации. Эффективность трансформации составила около $4,7 \times 10^4$ клеток/1 мкг. плазмидной ДНК. Наличие вставки в клетках ризобий проверяли методом ПЦР, а также секвенированием. В случае наличия в геноме бактерий репортерного гена *gfp*, клетки приобретали зеленое окрашивание, и способность флуоресцировать в зелёном диапазоне при их освещении синим светом (полоса возбуждения ВР 450–490, испускания ВР 515–565).

Так, в рамках работы по проведению исследования микроскопических структур, образуемых бактериями с измененной экспрессией генов инициации и формирования биопленок на инертных поверхностях и корнях растений, нами использовались следующие штаммы:

Ризобий штаммы, рекомбинантные по гену *pssB*, трансформированные с помощью плазмиды pJB658+pssB:

R. leguminosarum Pvu5 pJB658+pssB,

R. leguminosarum VSy12 (2008) pJB658+pssB,

R. leguminosarum THy2 pJB658+pssB,

R. leguminosarum TPr4 (2004) pJB658+pssB,

R. galegae 0702 pJB658+pssB.

Ризобий штаммы, рекомбинантные по гену *pssA* или *rosR*, трансформированные с помощью плазмиды pJB658GFP.

R. leguminosarum PVu5 pJB658GFP PssA,

R. leguminosarum PVu5 pJB658GFP RosR,

R. leguminosarum THy2 pJB658GFP PssA,

R. leguminosarum THy2 pJB658GFP RosR,

R. leguminosarum TPr4 pJB658GFP PssA,
R. leguminosarum TPr4 pJB658GFP RosR,
R. leguminosarum VSy12 pJB658GFP PssA,
R. leguminosarum VSy12 pJB658GFP RosR,
R. leguminosarum VCr7 pJB658GFP PssA,
R. leguminosarum VSy3 pJB658GFP RosR,
R. galegae 0702 pJB658GFP PssA,
R. galegae 0702 pJB658GFP RosR.

Для того чтобы проанализировать на какие фенотипические признаки влияет наличие плазмиды pJB658GFP PssA в геноме ризобактерий, нами был трансформирован ризобактериальный штамм *R. leguminosarum* VCr7, изолированный из клубеньков горошка мышиного (*Vicia cracca*), у которого мы не идентифицировали исследуемые нами гены, участвующие в биосинтезе ЭПС. В отличие от рекомбинантного, дикий штамм характеризовался скудным ослизнением клеточных стенок (рис. 13). Далее, используя вектор pJB658GFP RosR, мы трансформировали штамм *R. leguminosarum* VSy3, изолированный из клубеньков горошка лесного, у которого ранее нами были идентифицированы гены *pssB* и *prsE*, но не был идентифицирован ген *rosR*. Как и в предыдущем опыте рекомбинантный штамм демонстрировал более ослизненные клеточные стенки.



Рисунок 13. Исходные и трансформированные штаммы:

- А - *R. leguminosarum* VCr7;
- Б - *R. leguminosarum* VCr7 pJB658GFP PssA;
- В - *R. leguminosarum* VSy3;
- Г - *R. leguminosarum* VSy3 pJB658GFP RosR

Согласно литературным данным, ризобияльная клеточная поверхность покрыта капсулой, состоящей главным образом из ЭПС и ризобактерии синтезируют их в большом количестве, так как эти макромолекулы необходимы для установления симбиотических отношений с бобовыми растениями, питания, защиты от вредных факторов окружающей среды, формирования биопленок (Castellane et al., 2015). Чем больше значение этого параметра, тем выше их конкурентоспособность по сравнению с другими ризосферными штаммами. Полученные в данной работе рекомбинантные штаммы ризобий характеризуются большей наработкой ЭПС по сравнению с дикими штаммами, что выражается наибольшим ослизнением клеток азотфиксирующих бактерий.

3.2.3. Оценка влияния индукции *P_m* промотора на штаммы, трансформированные конструкцией *pJB658GFPRosR*

Для того чтобы определить интенсивность транскрипции гена *rosR* во время активации промотора *P_m* и в тот момент, когда он выключен, нами был проведен real-time ПЦР. В качестве контрольного, был выбран штамм *R. leguminosarum* VSy3 GFP. Экспериментальными штаммами являлись штаммы, трансформированные конструкцией *pJB658GFP RosR* – *R. leguminosarum* VSy3 RosR и *R. leguminosarum* VSy12 RosR. Из контрольных и рекомбинантных по гену *rosR* штаммов ризобий была выделена РНК. Ввиду того, что для проведения реакции необходимо выбрать ген, который сыграет роль референсного гена (housekeeping), кодирующего белок, необходимый для гомологичной рекомбинации, нами был использован ген *recA*. При необходимости индукции промотора, культивировали исследуемые штаммы на питательной среде с добавлением 1 мМ *m*-толуиловой кислоты.

Так нами было выявлено, что показатели уровня экспрессии гена *rosR* в трансформированных штаммах *R. leguminosarum* VSy3 RosR и *R. leguminosarum* VSy12 RosR, при индукции промотора *P_m*, значительно выше показателей уровня экспрессии исследуемого гена зафиксированных для контрольного штамма (рис. 14). Более того, значения показателей уровня экспрессии гена *rosR* без добавления

m-толуиловой кислоты – индуктора промотора P_m, также становятся в несколько раз выше контрольного значения, что обусловлено неполным блокированием операторной области этого индуцибельного промотора.

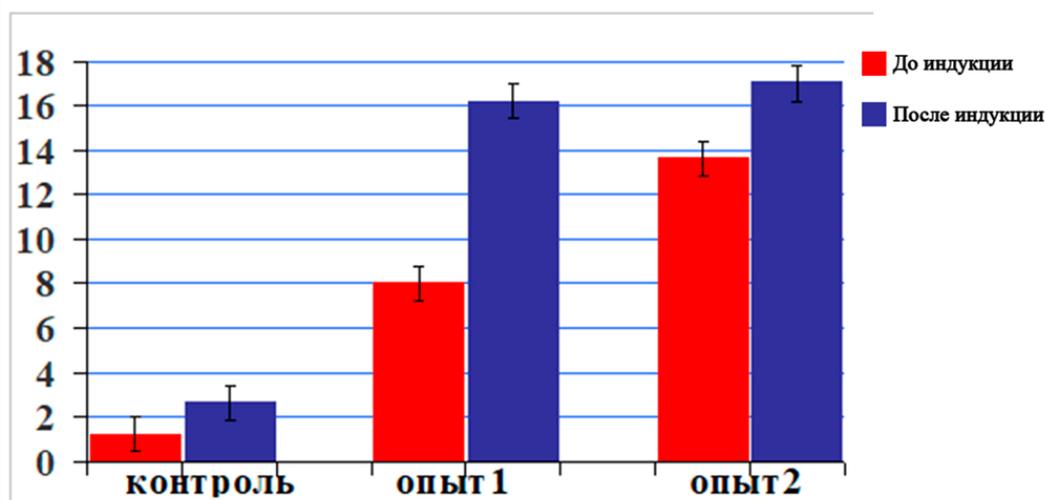


Рисунок 14. Количественный ПЦР анализ уровня транскрипции гена *rosR* с использованием РНК, изолированной из *R. leguminosarum* (контрольный штамм и рекомбинантный штамм, содержащие плазмиду pJB658GFP RosR). В качестве гена домашнего хозяйства, по экспрессии которого нормируется экспрессия гена *rosR*, использовали ген *recA*, кодирующий белок, необходимый для гомологичной рекомбинации. По оси Y – условные единицы, обозначающие уровень транскрипции гена *rosR* в рекомбинантных штаммах относительно дикого штамма.

Контроль – штамм *R. leguminosarum* VSy3 GFP, трансформированный исходным вектором pJB658GFP. Опыт 1 и 2 – штаммы *R. leguminosarum* VSy3 RosR и *R. leguminosarum* VSy12 RosR, соответственно, трансформированные плазмидой pJB658GFP RosR.

3.3. Изучение процессов формирования биопленок ризосферными бактериями на инертных поверхностях и на поверхности корней растений

Ризобии, как и многие другие почвенные бактерии способны образовывать биопленки на инертных поверхностях (стекло, ПВХ и т.д.) и на корнях растений (Vogino et al., 2013). Ризобияльные штаммы образуют биопленки со сложной

трехмерной архитектурой на абиотических поверхностях, и окрашивание данной биопленки обеспечивает визуализацию ее экзополисахаридной матрицы. Однако картина, которую мы можем наблюдать на модели образования биопленок на инертных поверхностях, не всегда может быть перенесена на модель формирования биопленок на поверхности корней, которая представляет собой среду богатую питательными веществами. Некоторые авторы обуславливают данное явление тем, что существуют еще невыявленные сигналы или факторы растений, способствующие образованию биопленок и оказывающие ограничивающий эффект на выделяемые корнем питательные вещества (Rinaudi, Giordano, 2010). Ввиду этого, для того чтобы изучить механизмы инициации и формирования биопленок на инертных поверхностях и корнях растений, нами были проведены детальные микроскопические исследования структур, образуемых дикими ризосферными бактериями и с измененной экспрессией генов, участвующих в биосинтезе ЭПС.

3.3.1. Проведение детальных микроскопических исследований структур, образуемых ризосферными бактериями на инертных поверхностях

R. leguminosarum и *R. galegae* образуют биопленки на стерильных инертных поверхностях, в том числе и на полистироле (Fujishige et al., 2006a). Ввиду этого были проведены микроскопические исследования структур, образованных штаммами, содержащими гены модификаторов механизмов формирования биопленок на поверхности корней и анализ возможности формирования ими биопленок на 96 луночных планшетах. Для этого исходные и рекомбинантные штаммы *R. leguminosarum* выращивали 48 часов в жидкой среде на шейкере при 28°C и 140 об./мин до концентрации 10^8 - 10^9 КОЕ/мл. Далее культуру разводили свежей питательной средой до 10^6 КОЕ/мл. и переносили по 1 мл в лунки 96-луночного пластикового планшета, а затем герметизировали Parafilm и инкубировали при температуре 28°C и 50 об./мин в течение 7 суток.

Микроскопические исследования, проводили с помощью методов световой микроскопии, используя универсальный способ сложной окраски – окрашивание

по Граму. Микроскопическая картина: при правильной окраске мазков по Граму в случае ризобий, которые являются грамотрицательными бактериями – окрашивание в цвет фуксина Пфейффера (розовый цвет).

Для того чтобы оценить склонность ризобиальных штаммов к формированию биопленок, мы сравнили их со штаммами *Pseudomonas* и *Azotobacter*, представители которых являются грамотрицательными аэробными неспорообразующими бактериями, которые часто используют в составе различных биологических препаратов для защиты растений от заболеваний и стимуляции их роста (Вершинина и др., 2019b). Все микроскопированные штаммы оказались способны образовывать биопленки, но показали различные степени их формирования (рис. 15).

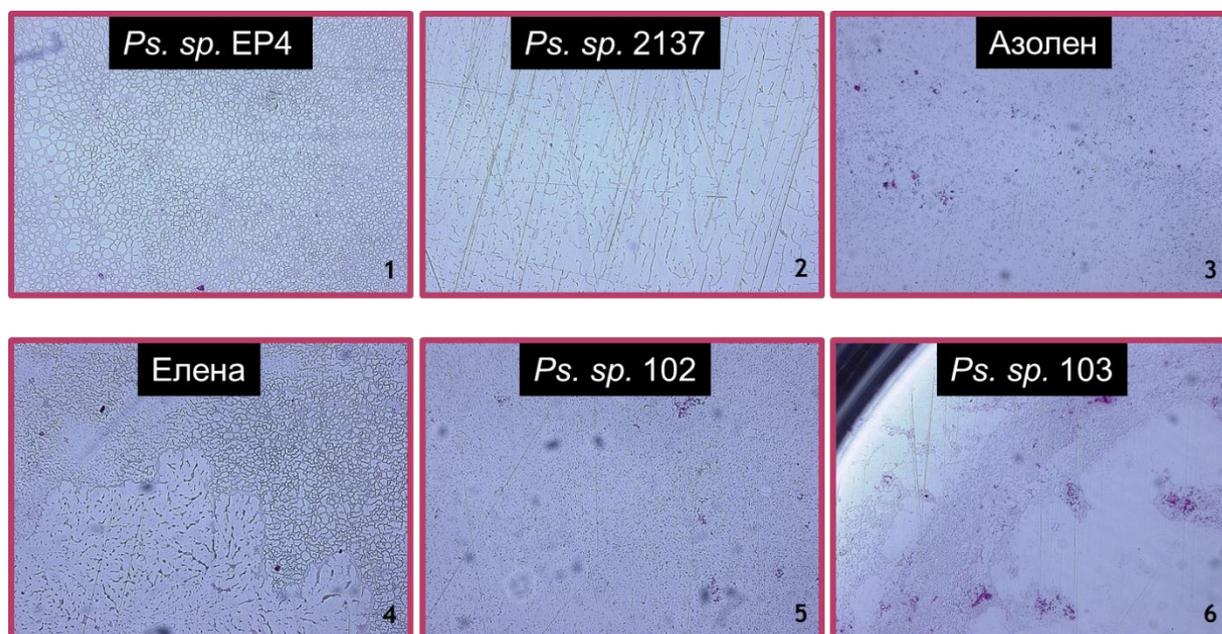


Рисунок 15. Результаты микроскопирования штаммов *Pseudomonas* и *Azotobacter*:

1. *Pseudomonas* sp. EP4,
2. *Pseudomonas* sp. 2137,
3. *Azotobacter vinelandii* ИБ 4 «Азолен»,
4. *Pseudomonas aureofaciens* ИБ51 «Елена»,
5. *Pseudomonas* sp. 102,
6. *Pseudomonas* sp. 103.

В качестве положительного контроля нами был выбран биопленкообразующий штамм *Pseudomonas* sp. EP4, из коллекции ВНИИСХМ, который образует высокоорганизованные комплексы биопленок, похожие на соты, в качестве отрицательного контроля послужил штамм *R. leguminosarum* Pvu 6 при микрокопировании, которого мы наблюдали одиночные, планктонные клетки (рис. 16).

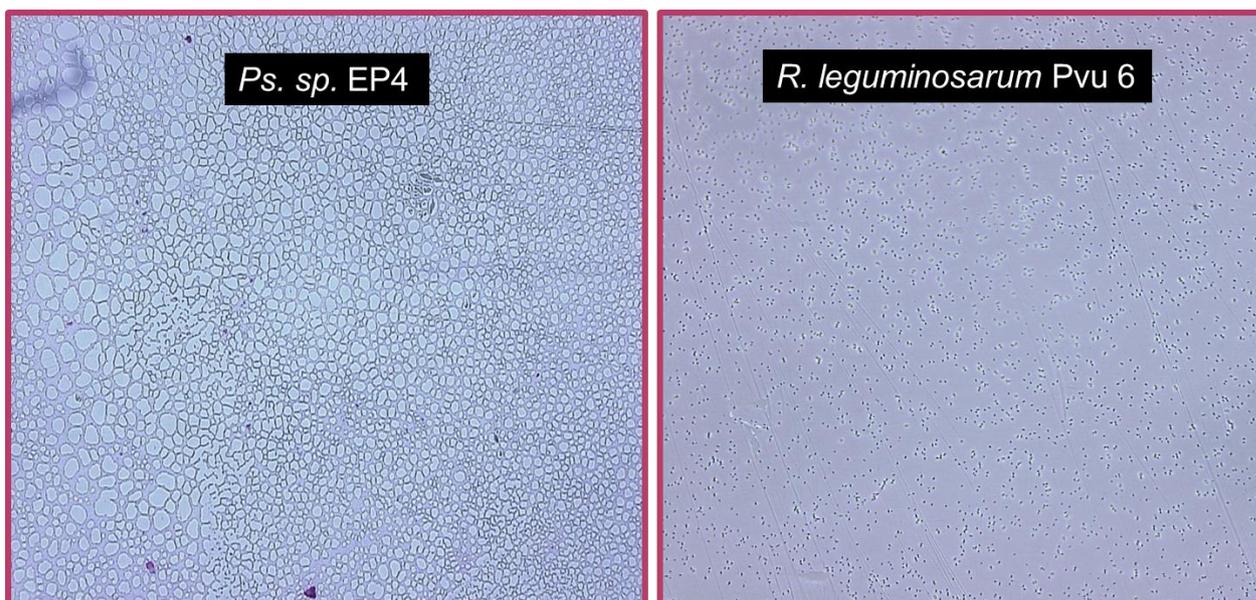


Рисунок 16. Изображения, полученные при микрокопировании штаммов *Pseudomonas* sp. EP4 и *R. leguminosarum* Pvu 6

Для того чтобы рекомендовать исследуемые нами штаммы, оказывающие ростостимулирующее действие в качестве биопрепарата, мы проанализировали эффективность образования биопленок данными ризобияльными штаммами. В рамках данного исследования были выбраны ризобияльные штаммы, у которых были идентифицированы исследуемые нами гены (*pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*), ответственные за биосинтез экзополисахаридов. Кроме этого мы изучили и один штамм *R. galegae*, у которого исследуемые гены не идентифицировали, ввиду высокой специфичности подобранных нами праймеров к виду *R. leguminosarum*, ввиду того, растения обработанные данным штаммом показали высокие значения ростовых параметров. В результате нами было показано, что все штаммы обладают способностью к формированию биопленок, так как при микрокопировании пластиковых микробиологических планшетов мы наблюдали

сложные высокоорганизованные трехмерные структуры, отвечающие определению биопленок (рис. 17), что, в свою очередь, имеет большое значение для выживания и конкурентоспособности ризобий в ризосфере в целом. При этом исследуемый штамм *R. galegae* также формирует биопленки на инертных поверхностях.

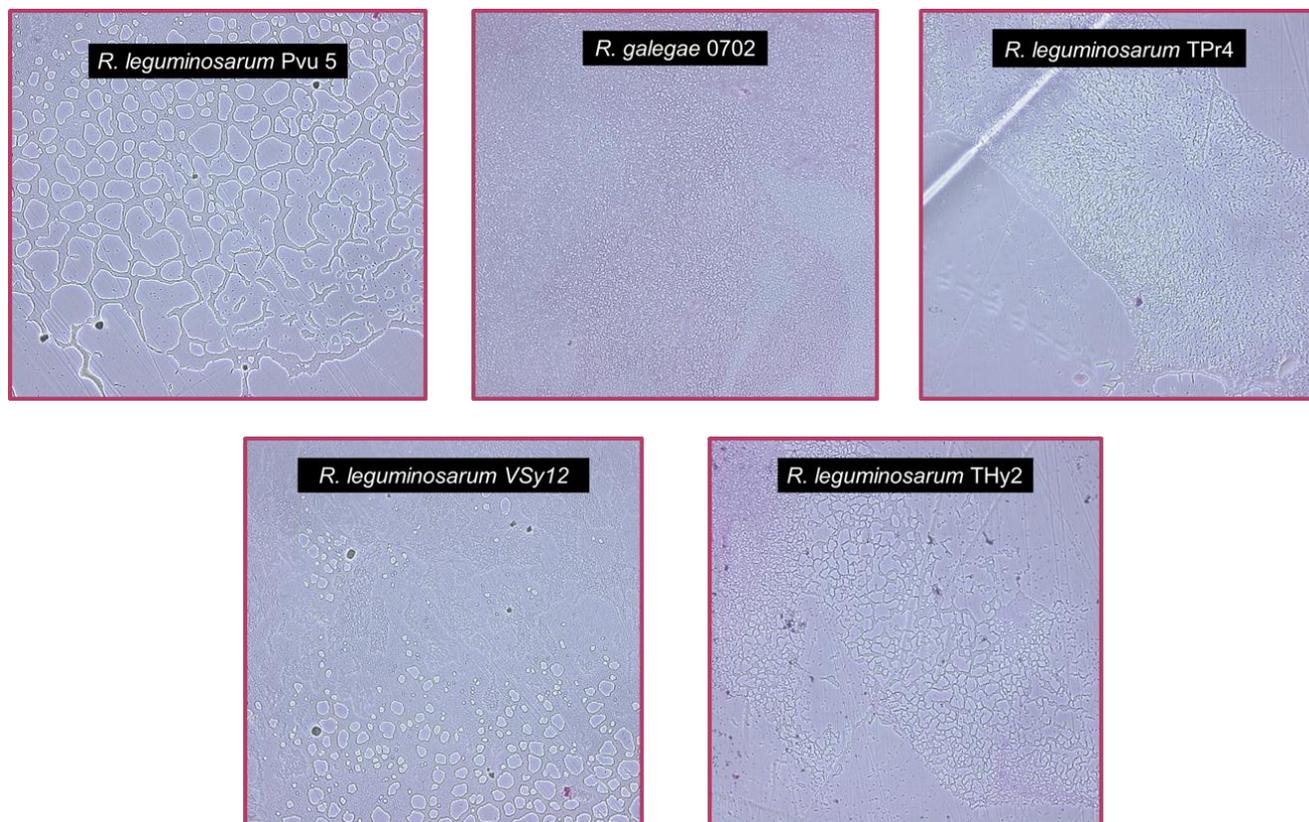


Рисунок 17. Микроскопирование ризобиальных штаммов дикого типа: *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12 (2008), *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4 (2004), *R. galegae* 0702

Опыты по микрокопированию 5 исследуемых штаммов дикого типа и, полученных в результате трансформации плазмидой pJB658+pssB, рекомбинантных ризобиальных штаммов, показали что, рекомбинантные по гену *pssB* штаммы образует менее сложные архитектурные структуры биопленок (рис. 18). Это объясняется наличием у них дополнительной копии гена *pssB*, которая отрицательно влияет на биопленкообразование. Согласно, литературным данным наличие дополнительных копий этого гена в штаммах дикого типа приводит к снижению уровня производства ЭПС (Janczarek et al., 2001). Ген *pssB* кодирует белок, гомологичный членам семейства инозитол монофосфатаз (IMPase). IMPазы

ответственны за превращение инозитол монофосфатаз в свободный инозит, который необходим для регенерации инозит-содержащих фосфолипидов. Однако роль IMPase в метаболизме ризобий все еще невыяснена. Janczarek и соавт. (2001) выдвинули гипотезу о том, что катаболизм инозита важен для выживания и конкурентности ризобияльных штаммов.

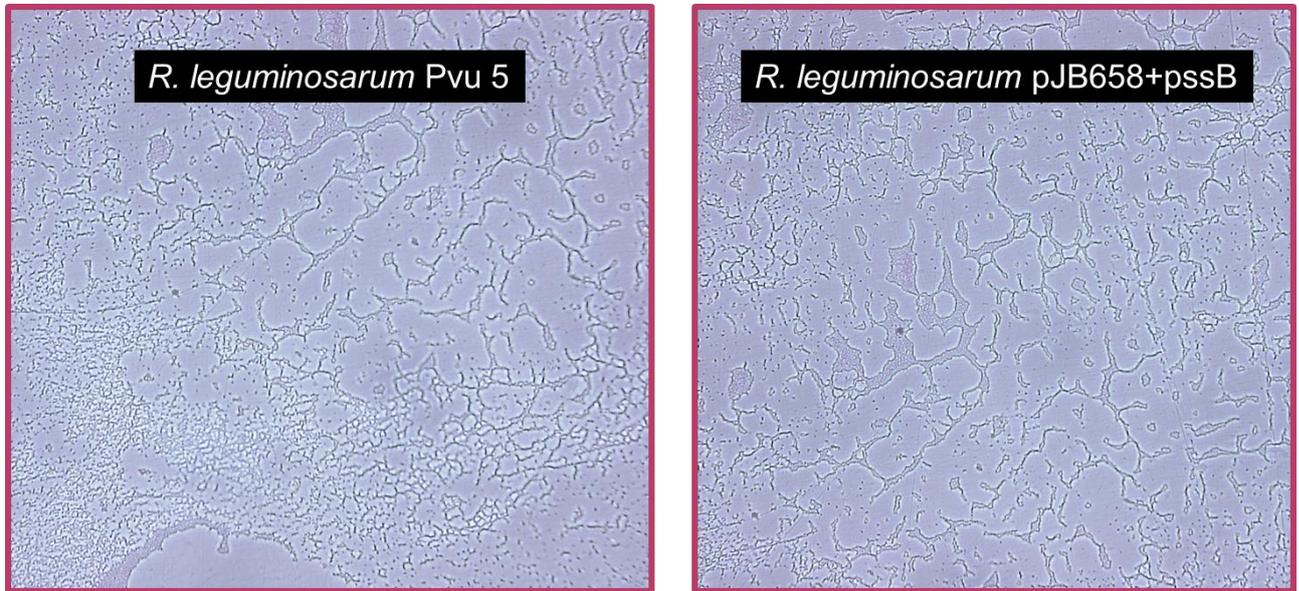


Рисунок 18. Микроскопирование штамма *R. leguminosarum* PVu5 (дикий тип) и штамма *R. leguminosarum* PVu5+pssB, трансформированного конструкцией pJB658+pssB.

Для того чтобы оценить как наличие дополнительной копии гена *rosR*, регулирующего биосинтез ЭПС, влияет на биопленкообразование нами были микроскопированы биопленки, образованные диким штаммом *R. leguminosarum* VSy3, а также биопленки, трансформированного конструкцией pJB658GFP RosR, штамма *R. leguminosarum* VSy3 RosR. Так в случае трансформированного штамма, мы наблюдали более зрелые биопленки со сложной архитектурой и большей по отношению к дикому штамму толщиной (рис. 19). Проведенный эксперимент подтверждает данные представленные в работе Janczarek и соавт. (2009), в которой указывается, дополнительные копии гена *rosR* приводят к увеличению синтеза ЭПС, что в свою очередь положительно влияет на процессы биопленкообразования.

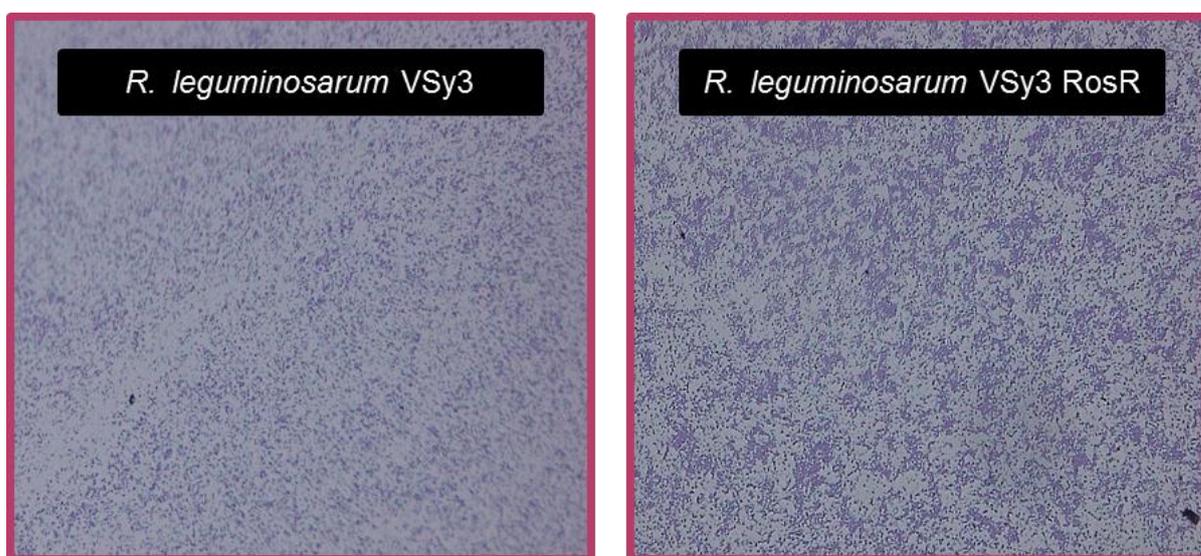


Рисунок 19. Микроскопирование штамма *R. leguminosarum* VSy3 (дикий тип) и штамма *R. leguminosarum* VSy3 RosR, трансформированного конструкцией pJB658GFP RosR (без добавления индуктора).

Исследуемые штаммы ризобий, изолированные из клубеньков бобовых растений создают сложную, трехмерную биопленку на инертных поверхностях, и окрашивание этой биопленки обеспечивает визуализацию ее экзополисахаридной матрицы. Образование биопленок помогает ризобиям поддерживать плотность клеток в течение достаточно длительного времени до момента взаимодействия с растением-хозяином. При этом, в отсутствие макросимбионта, ризобии способны прикрепляться к корням и других небобовых растений и колонизировать их, позволяя данным клубеньковым бактериям поглощать питательные вещества и выживать в этой защищенной нише. В естественных условиях сложно контролировать такие ассоциативные процессы, так как ризосферные бактерии с полезными признаками часто вытесняются более агрессивными бактериями, зачастую обладающими фитопатогенными свойствами. Однако синтез ризобактериями ЭПС, способствует формированию биопленок, что в свою очередь влияет на колонизацию корней небобовых растений. Так, например, в работах Santaella и соавт. (2008) для изучения функции ЭПС при колонизации и образовании биопленок на корнях небобовых растений (резуховидка Таля и рапс) был использован штамм *Rhizobium* sp. YAS34, ЭПС которого, внесли свой вклад в колонизацию определенных зон, в зависимости от доступности питательных

веществ. Проведенные нами ранее опыты по инокуляции растений штаммами ризобий, синтезирующими модификаторы механизмов формирования биопленок на поверхности корней, показали, что использование штаммов, образующих биопленки в качестве биопрепаратов, повышает всхожесть семян и положительно влияет на ростовые параметры как бобовых, так и небобовых растений. Данный факт указывает на целесообразность использования образующих биопленки ризобияльных штаммов в качестве биопрепаратов стимулирующих рост растений и их защиту от фитопатогенов.

Таким образом, исследуемые ризобияльные штаммы способны к образованию биопленок в ассоциативных симбиотических системах, обладают высокой конкурентоспособностью и ростостимулирующим эффектом на бобовые и небобовые растения, который заключается в синтезе фитогормонов, фиксации атмосферного азота, улучшении минерального питания растений, а также защите растений от патогенов.

3.3.2. Оценка зависимости биопленкообразования диких и рекомбинантных ризобияльных штаммов от логарифма числа живых клеток при росте культур на несменяемой среде

Ризобактерии способны образовывать многоклеточные конгломераты, заключенные в матрицу из полимерных веществ, производимых самими бактериями. Зачастую трудно провести четкую грань между простыми конгломератами, образованными множеством планктонных клеток бактерий и прочно прикрепленными на поверхности биопленками. Ввиду этого, нами была построена кривая роста и размножения исследуемых штаммов. Кроме того, чтобы убедиться в том, что рекомбинантные штаммы способны к образованию биопленок, нами были проведены опыты по микроскопированию ризобий с измененной экспрессией генов, участвующих в биосинтезе экзополисахаридов (гены *pssA* и *rosR*). Были микроскопированы и штаммы, трансформированные конструкцией *pJN105TurboRapA1*, т.е. рекомбинантные по гену *rapA1*. Экспрессия белка *RapA1*, способствует агглютинации бактерий и

непосредственно влияет на процессы биопленкообразования (Вершинина и др., 2019а). В качестве контроля были выбраны соответствующие ризобийные штаммы дикого типа. Биопленки, которые образуют штаммы на инертных поверхностях, исследовали с применением 96-луночных пластиковых планшетов и окрашивали, описанным ранее способом по методу Грама.

Для построения кривой роста микроорганизмов проводили оценку зависимости логарифма числа живых клеток от времени, при росте культур на несменяемой среде. Выполняли измерения необходимые для описания лаг-фазы, экспоненциальной фазы и стационарной фазы роста. Измерения прекращали после 48 часов инкубирования, ввиду того что после 2-х суток у ризобий продолжается стационарная фаза, за которой следует фаза отмирания клеток. Так исследуемые ризобактерии выращивали в жидкой среде УМ в стеклянных колбах на качалке при 28°C и 140 об./мин. в течение 1, 4, 16, 24 и 48 часов и, затем, измеряли количество клеток с помощью спектрофотометра. Оптическую плотность измеряли при длине волны 590 нм. Позже строили кривую роста и размножения ризобактерий, представленную в виде логарифма.

В случае контрольного (дикого) и рекомбинантных штаммов *R. leguminosarum* PVu5 мы выяснили, что рост клеток рекомбинантных штаммов происходит интенсивнее по сравнению с диким штаммом (рис. 20). Наибольшее количество клеток мы наблюдали в случае измерения штаммов *R. leguminosarum* PVu5 RapA1 и *R. leguminosarum* PVu5 RosR. Примечательным оказался тот факт, что те же штаммы образовывали более сложные структуры биопленок, при этом все разновидности штамма склонны формировать биопленки (рис. 21). Несмотря на то, что биопленка, образуемая штаммом *R. leguminosarum* PVu5 pssA, по отношению к биопленке штамма *R. leguminosarum* PVu5 имела более сложную структуру (имелось большее количество выстроенных тяжей), на препарате с этим штаммом присутствовало небольшое количество единичных планктонных клеток. Это может указывать на незрелость биопленки и возможное продолжение ее развития, так как произошла адгезия единичных клеток на поверхности

полистероловой лунки, что в свою очередь, является одним из начальных этапов формирования биопленок.

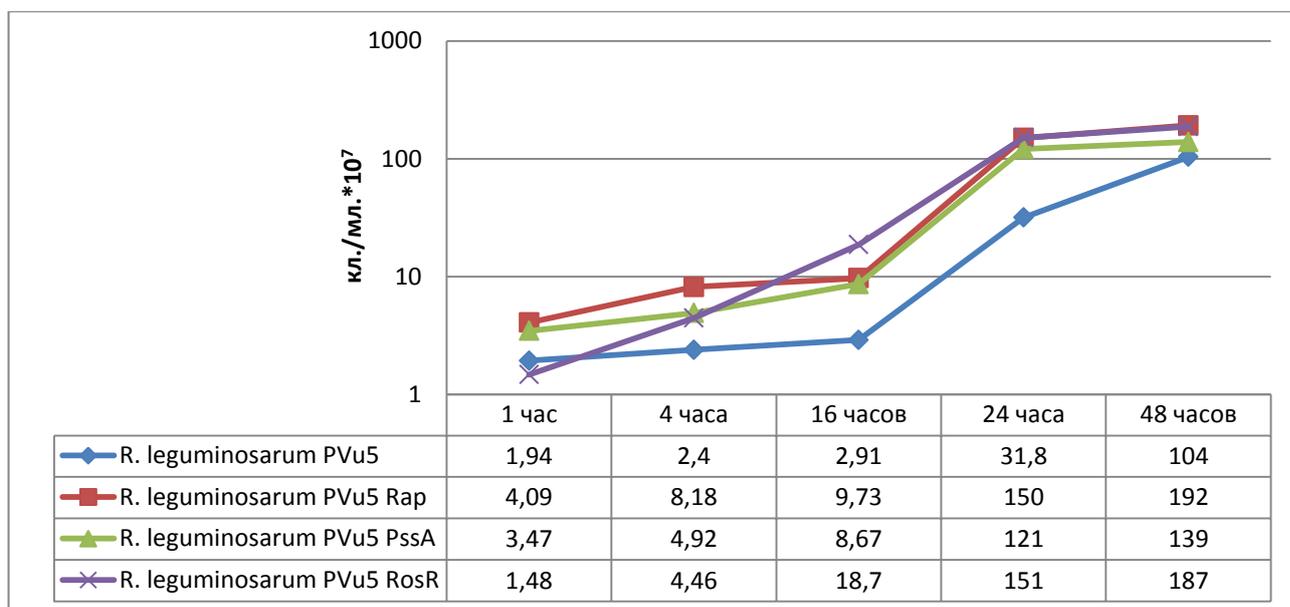


Рисунок 20. Кривая роста и размножения штаммов *R. leguminosarum* PVu5 (дикий тип), *R. leguminosarum* PVu5 RapA1, *R. leguminosarum* PVu5 PssA, *R. leguminosarum* PVu5 RosR, представленная в виде логарифма.

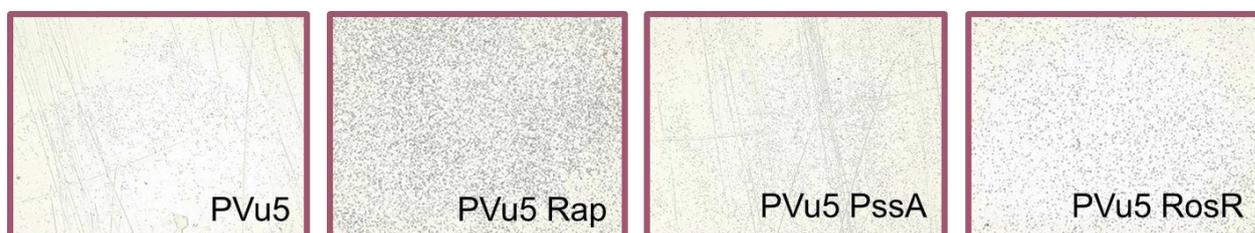


Рисунок 21. Биопленка, образованная, контрольным и рекомбинантными штаммами, за 7 суток: *R. leguminosarum* PVu5, *R. leguminosarum* PVu5 RapA1, *R. leguminosarum* PVu5 PssA, *R. leguminosarum* PVu5 RosR.

При микрокопировании контрольного и трансформированных штаммов *R. leguminosarum* THy2 биопленки наблюдались во всех случаях (рис. 22). Наибольшего развития достигла биопленка, образуемая штаммом *R. leguminosarum* THy2 RapA1, несмотря на то, что после 2-х суточных измерений показатель количества клеток данной культуры был незначительно ниже штамма дикого типа и сильно отставал от показателей штаммов *R. leguminosarum* THy2 PssA и *R. leguminosarum* THy2 RosR (рис. 23). Эти штаммы показали схожие результаты прироста клеток и степени образования биопленок.

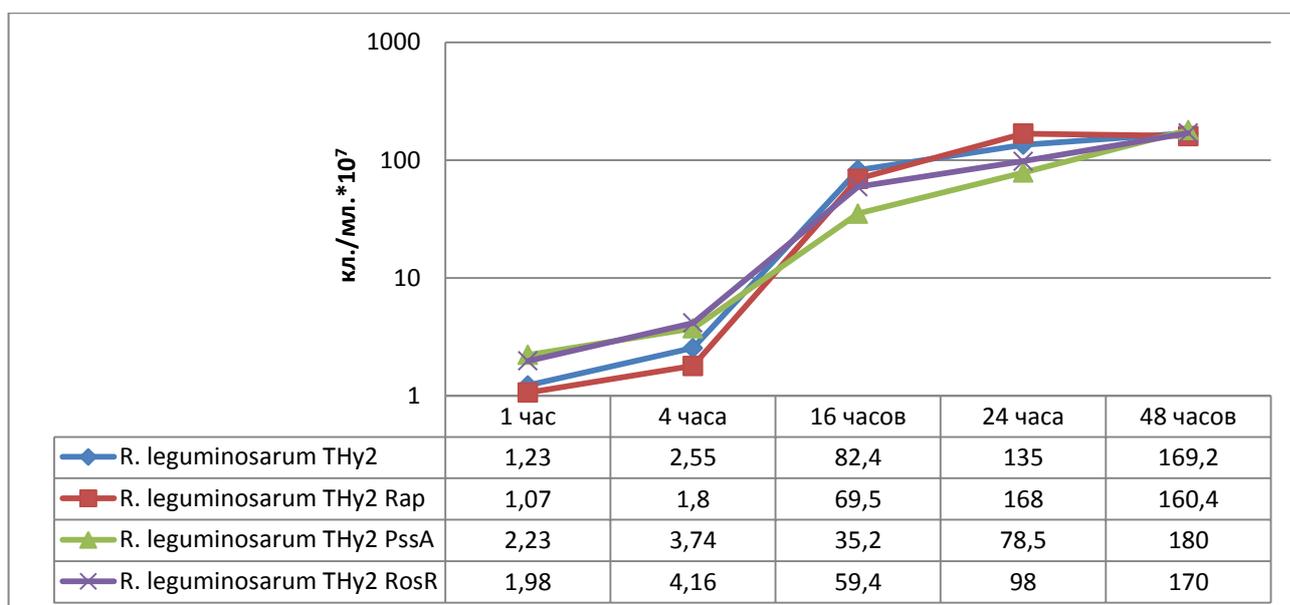


Рисунок 22. Кривая роста и размножения штаммов *R. leguminosarum* THy2 (дикий тип), *R. leguminosarum* THy2 RapA1, *R. leguminosarum* THy2 PssA, *R. leguminosarum* THy2 RosR, представленная в виде логарифма.

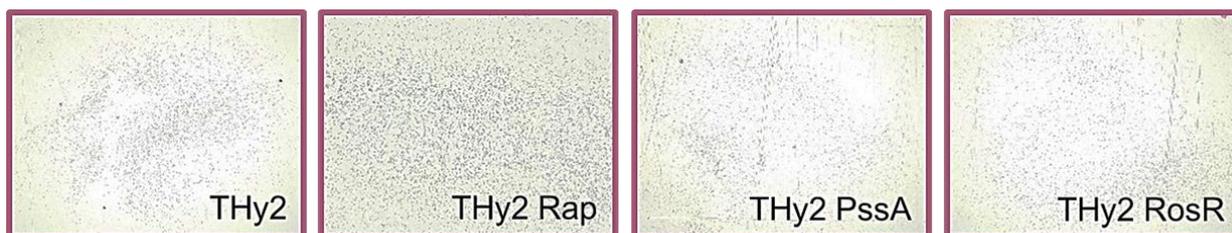


Рисунок 23. Биопленка, образованная, контрольным и рекомбинантными штаммами, за 7 суток: *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* THy2 RapA1, *R. leguminosarum* THy2 PssA, *R. leguminosarum* THy2 RosR

Значения количества клеток трансформированного штамма *R. leguminosarum* TPr4 RosR оказались значительно выше контрольного штамма (рис. 24). Показатели количества клеток штаммов, рекомбинантных по генам *pssA* и *rosR* лишь незначительно отличались от показателей штамма дикого типа. Однако биопленка, формируемая штаммом *R. leguminosarum* TPr4, находилась на более поздней стадии развития по отношению к биопленкам, образованным штаммами *R. leguminosarum* TPr4 PssA и *R. leguminosarum* TPr4 RosR (рис. 25). Продемонстрировавший наиболее быстрый рост клеток штамм *R. leguminosarum* TPr4 RapA1 образовал биопленку с наибольшей стадией развития.

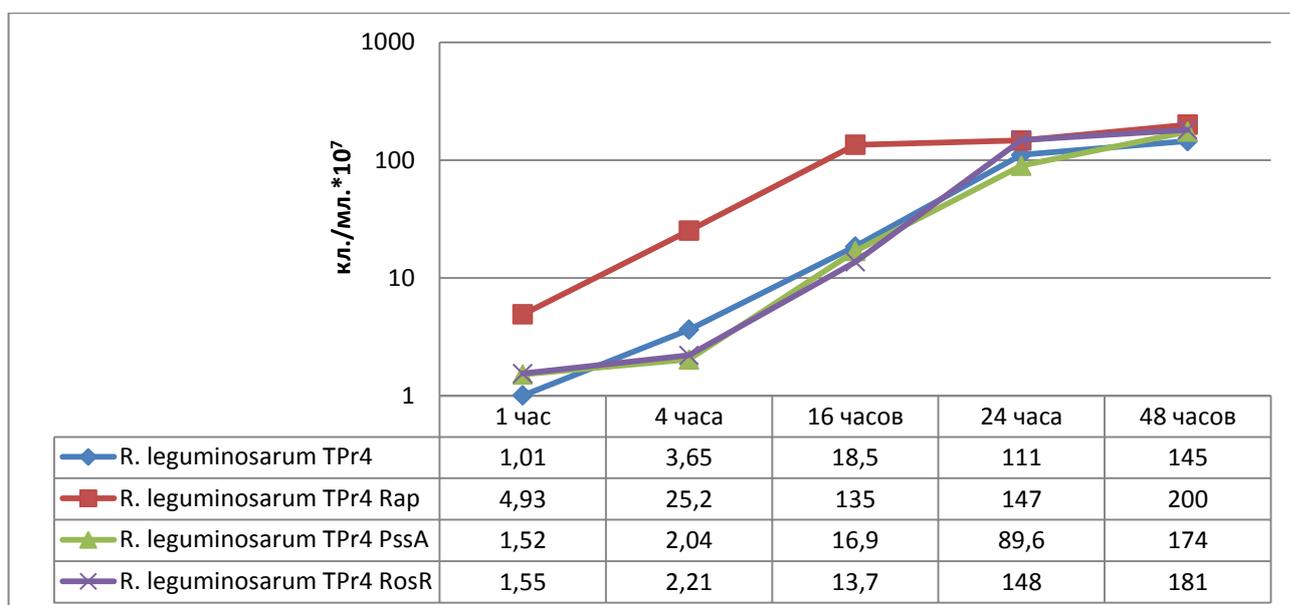


Рисунок 24. Кривая роста и размножения штаммов *R. leguminosarum* TPr4 (дикий тип), *R. leguminosarum* TPr4 RapA1, *R. leguminosarum* TPr4 PssA, *R. leguminosarum* TPr4 RosR, представленная в виде логарифма.

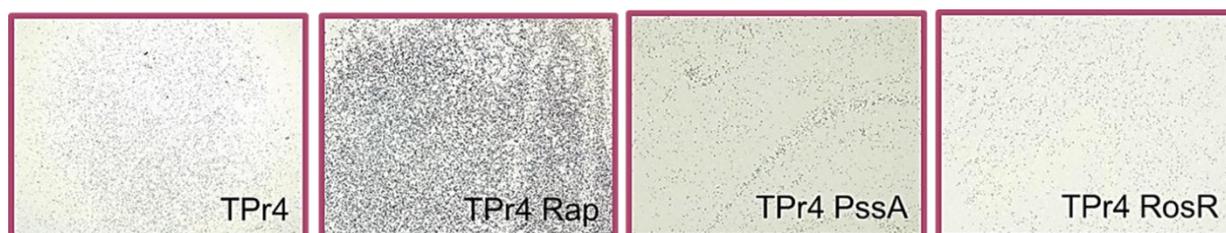


Рисунок 25. Биопленка, образованная, контрольным и рекомбинантными штаммами, за 7 суток: *R. leguminosarum* TPr4, *R. leguminosarum* TPr4 RapA1, *R. leguminosarum* TPr4 PssA, *R. leguminosarum* TPr4 RosR

Далее были проанализированы показатели штамма *R. leguminosarum* VSy12. Несмотря на то, что значения количества клеток данного штамма в лаг-фазе, экспоненциальной фазе и фазе стационарного роста в некоторых случаях оказались выше значений рекомбинантных штаммов (рис. 26), при микрокопировании, данного штамма, встречалось самое большое количество единичных клеток, возможно, это связано с тем, что для образования зрелой биопленки штамму *R. leguminosarum* VSy12 необходимо больше времени (рис. 27). В стационарной фазе наименьшее количество клеток показал штамм *R. leguminosarum* VSy12 RapA1, однако при его микрокопировании, как и в

случае штамма *R. leguminosarum* VSy12 RosR, мы наблюдали биопленку. Самая зрелая биопленка была у штамма *R. leguminosarum* VSy12 PssA.

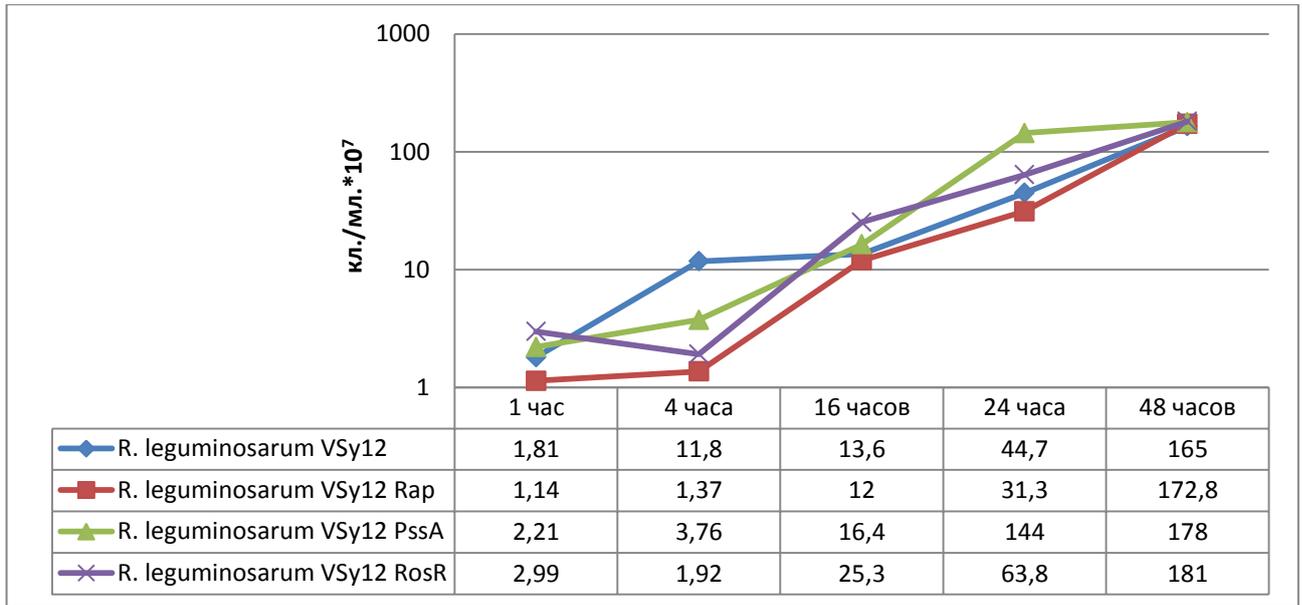


Рисунок 26. Кривая роста и размножения штаммов *R. leguminosarum* VSy12 (дикий тип), *R. leguminosarum* VSy12 RapA1, *R. leguminosarum* VSy12 PssA, *R. leguminosarum* VSy12 RosR, представленная в виде логарифма.

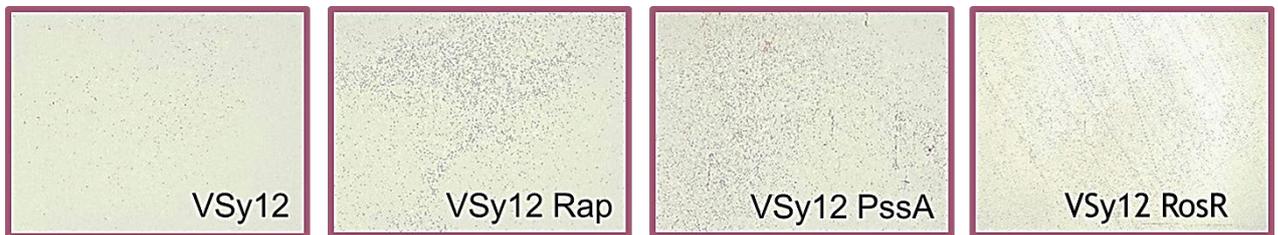


Рисунок 27. Биопленка, образованная, контрольным и рекомбинантными штаммами, за 7 суток: *R. leguminosarum* VSy12, *R. leguminosarum* VSy12 RapA1, *R. leguminosarum* VSy12 PssA, *R. leguminosarum* VSy12 RosR.

Наибольшие показатели числа живых клеток от времени мы отметили в случае штамма *R. galegae* 0702, причем, как у штамма дикого типа, так и у трансформированных штаммов (рис. 28). Такой быстрый рост клеток сказался и на образовании биопленок, так как наиболее зрелые биопленки мы также наблюдали в данном опыте. При этом в случае штамма *R. galegae* 0702, трансформированного конструкцией pJN105TurboRapA1, мы наблюдали зрелую биопленку, более сложной архитектуры по сравнению с биопленкой штамма дикого типа (рис. 29). Несмотря на то, что гены *pssA* и *rosR* участвуют в

биосинтезе экзополисахаридов у штаммов вида *R. leguminosarum*, при микроскопировании биопленок штаммов *R. galegae* 0702 в геноме, которого был ген *pssA* или *rosR*, мы наблюдали зрелую биопленку, более сложной архитектуры по сравнению с биопленкой штамма дикого типа. Возможно, данные гены могут работать у родственных штаммов и положительно влиять на их биопленкообразование и выживаемость в целом.

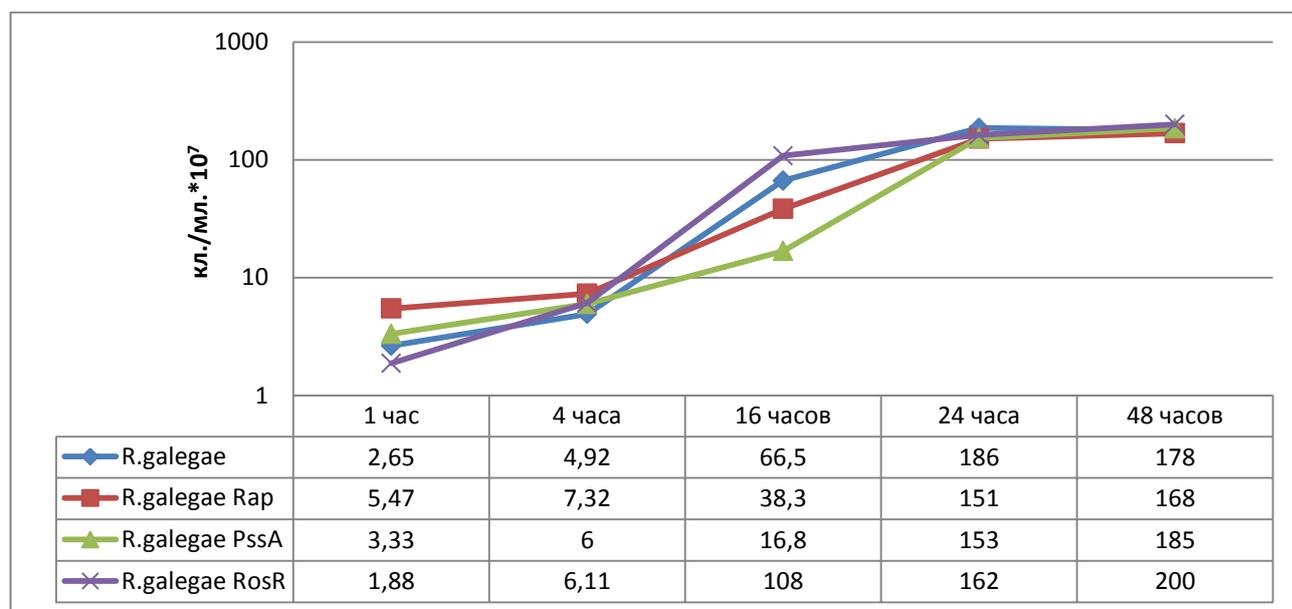


Рисунок 28. Кривая роста и размножения штаммов *R. galegae* 0702 (дикий тип), *R. galegae* 0702 RapA1, *R. galegae* 0702 PssA, *R. galegae* 0702 RosR представленная в виде логарифма.

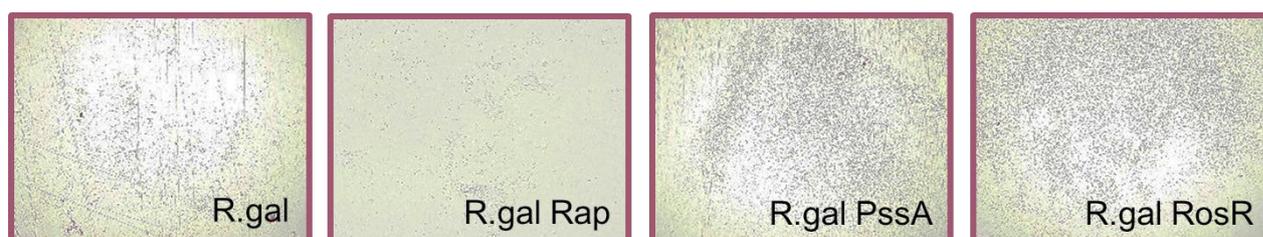


Рисунок 29. Биопленка, образованная, контрольным и рекомбинантными штаммами, за 7 суток: *R. galegae* 0702, *R. galegae* 0702 RapA1, *R. galegae* 0702 PssA, *R. galegae* 0702 RosR

Таким образом, было показано, что полученные рекомбинантные штаммы ризобий формируют более сложные архитектурные структуры биопленок по сравнению с дикими штаммами, а высокие показатели числа живых клеток от времени не всегда указывают на способность штамма к быстрому образованию

зрелой биопленки. При этом экспрессия белка RapA1, который кроме свойств адгезина, имеет также и агглютинирующую способность, оказывает значительное влияние на процессы биопленкообразования на инертных поверхностях (Лавина и др., 2019). В работах Mongiardini и др. (2008) показано, что производство данного белка влияет на прикрепление бактерий к инертным поверхностям (лунки из полистирола, полипропиленовые шарики, песок и вермикулит), и способствует адсорбции ризобий на поверхности корней. В случае штамма *R. galegae* 0702 значимых различий в биопленкообразовании между рекомбинантными и контрольными штаммами мы не выявили.

3.3.3. Флуоресцентная микроскопия биопленок, образованных мечеными штаммами ризобактерий

Благодаря тому, что нами был получен вектор pJB658GFP, меченный флуоресцентным белком GFP, у нас появилась возможность исследования ризобиальных штаммов, трансформированных данной плазмидой с дополнительной копией гена *pssA/rosR* с применением конфокального микроскопа и микроскопа с флуоресцентным фильтром. Проведение данной работы было необходимо для дальнейшего анализа биопленок формируемых на поверхности корней растений флуоресцентно мечеными штаммами ризосферных бактерий. Так были проанализированы структуры биопленок, образуемые рекомбинантными по гену *gfp* штаммами, которые в течение 2-х суток культивировались, непосредственно, на покровных стеклах в жидкой среде в стеклянных колбах на шейкере при 28°C и 50 об./мин. Ввиду наличия в геноме бактерий репортерного гена *gfp*, экспрессия которого проявляется в появлении зелёного свечения, при освещении синим светом, клетки ризобий приобретали характерный зелёный цвет. Контроль – штаммы *R. leguminosarum* VCr7 и *R. leguminosarum* VSy3, трансформированный исходным вектором pJB658GFP. Опытные штаммы – *R. leguminosarum* VCr7, трансформированный вектором pJB658GFP_pssA, а также *R. leguminosarum* VSy3, трансформированный вектором pJB658GFP_rosR.

Изображения биопленок были получены благодаря использованию микроскопа Axio Imager M1 (CarlZeiss, Германия) с флуоресцентным фильтром: для детекции меченых белком GFP ризобий использовали набор светофильтров №10 (полоса возбуждения ВР 450–490, испускания ВР 515–565).

Все исследуемые штаммы обладали способностью формировать высокоорганизованные структуры (микроколонии) в той или иной степени, аналогично результатам, полученным нами при исследовании структуры биопленок на 96-луночных планшетах (рис. 30).

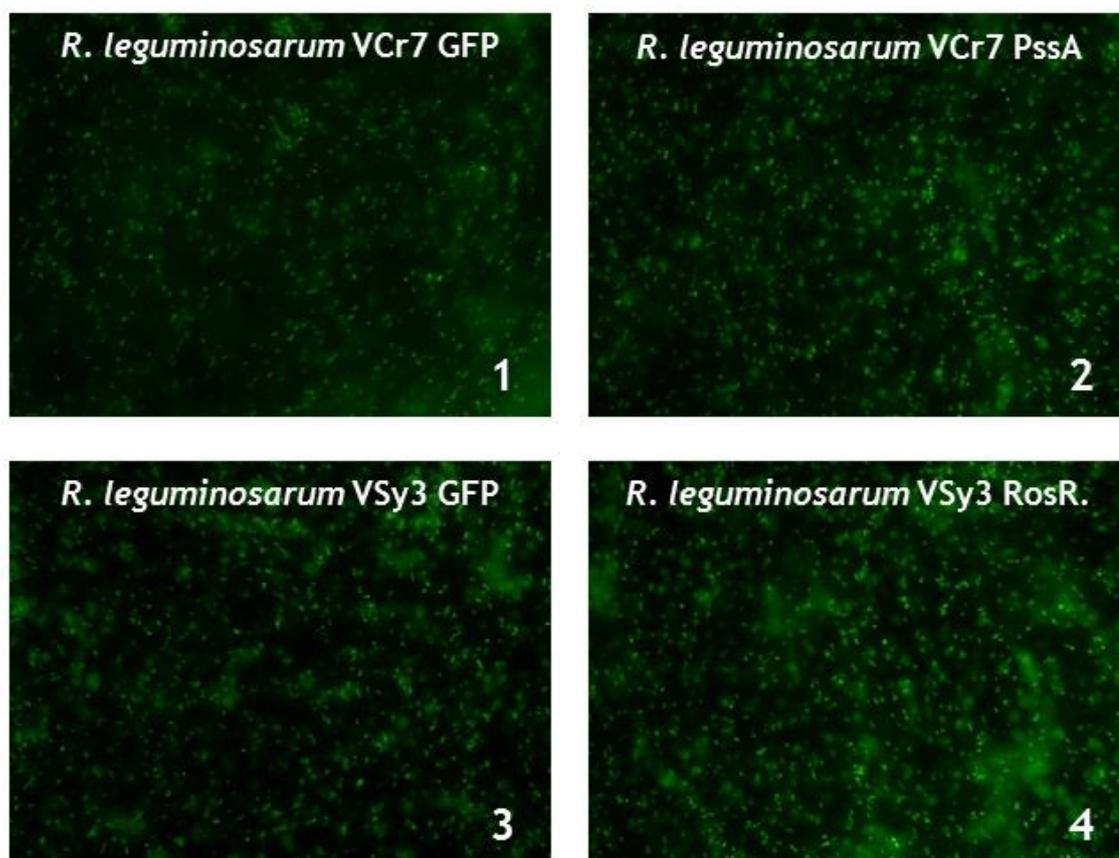


Рисунок 30. Флуоресцентная микроскопия биопленок, образованных ризобиями, мечеными белком GFP, после 2-х суток культивирования при 28°C.

1. *R. leguminosarum* VCr7 + pJB658GFP;
2. *R. leguminosarum* VCr7 + pJB658GFP_pssA;
3. *R. leguminosarum* VSy3 + pJB658GFP;
4. *R. leguminosarum* VSy3 + pJB658GFP_rosR.

Далее нами были проанализированы биопленки, образованные рекомбинантными по генам *pssA* или *rosR* штаммами *R. leguminosarum* PVu5,

R. leguminosarum THy2, *R. leguminosarum* TPr4, *R. leguminosarum* VSy12 и *R. galegae* 0702, которые мы культивировали на покровных стеклах в течение 7-ми суток. С целью получения объемных изображений биопленок, микрофотографирование проводили с применением конфокального микроскопа. Данный опыт подтвердил предыдущие эксперименты, в которых при микрофотографировании трансформированных штаммов с дополнительной копией генов *pssA* или *rosR*, мы наблюдали более зрелую биопленку с большей толщиной относительно исходных штаммов. Ранее, при построении кривой роста и размножения клеток исследуемых штаммов, нами уже было показано, что наибольшее количество клеток у *R. leguminosarum* мы наблюдали в случае штамма *R. leguminosarum* PVu5 RosR, а у *R. galegae* 0702 при измерении количества клеток штамма *R. galegae* 0702 RosR. Было выявлено, что те же штаммы образовывали и самые сложные структуры биопленок, причем наиболее сложные структуры были отмечены нами при микрофотографировании биопленки, сформированная штаммом *R. galegae* 0702 RosR (рис. 31), а среди штаммов *R. leguminosarum* биопленки, образованная *R. leguminosarum* PVu5 RosR (рис. 32)

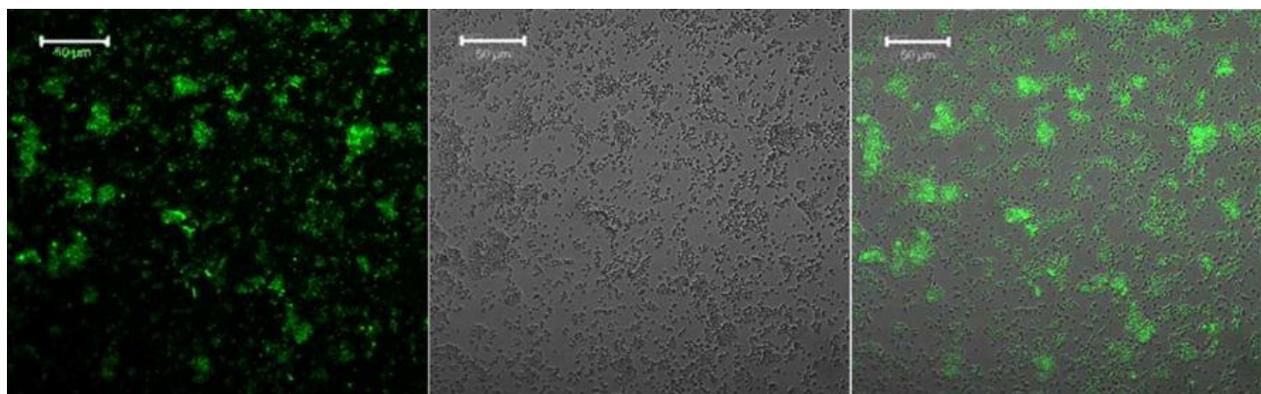


Рисунок 31. Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* Pvu5 RosR после 7 суток культивирования при 28°C (конфокальная микроскопия).

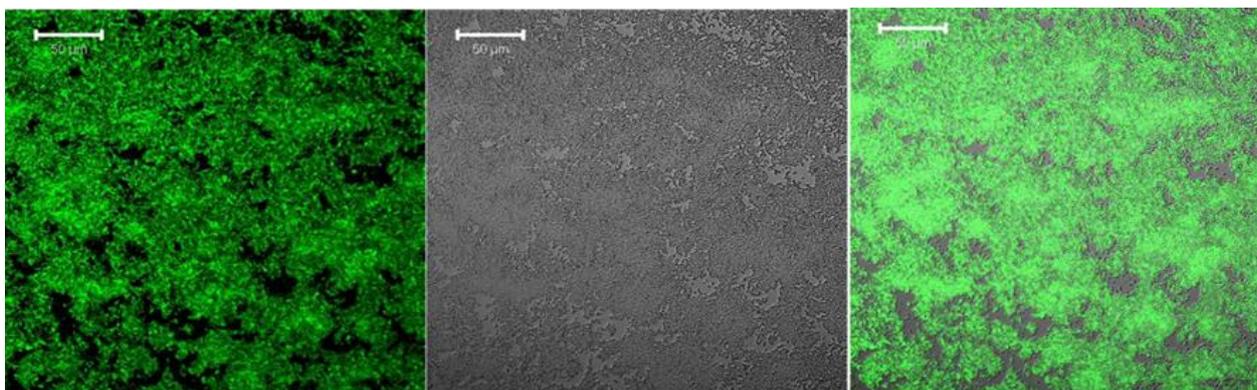


Рисунок 32. Биопленка, образованная штаммом *R. galegae* 0702 RosR после 7 суток культивирования при 28°C (конфокальная микроскопия).

3.3.4. Исследование возможности биопленкообразования рекомбинантными ризобияльными штаммами на поверхности корней

При использовании технологии инокуляции растений ризобактериями, возникает проблема, обусловленная тем, что монокультуры ризобий демонстрируют низкую выживаемость. Одним из возможных решений, в данном случае, является применение биопленочных биоудобрений (ББ), которые могут способствовать развитию симбиотических взаимоотношений между ризобиями и полезными сельскохозяйственными культурами, положительно влияя, при этом на рост и развитие как бобовых, так и небобовых растений. Ввиду этого нами были проведены опыты по оценке стимуляции всхожести семян и длине корней проростков клевера лугового (*Trifolium pratense*), томата (*Solanum lycopersicum*) и рапса (*Brassica napus*), инокулированных контрольными и трансформированными конструкцией pJBGFP658 RosR штаммами. Контрольными штаммами являлись *R. leguminosarum* VSy3, *R. leguminosarum* VSy12, опытные штаммы – *R. leguminosarum* VSy3 RosR, *R. leguminosarum* VSy12 RosR. Кроме того, нами была исследована клубенькообразующая активность ризобий в отношении клевера лугового. Нами были выбраны рекомбинантные по гену *rosR* штаммы, так как было выявлено, что наличие дополнительной копии данного гена в геноме ризобий положительно влияет на процессы биопленкообразования и, при этом, транскрипция нескольких *pss*-генов, в том числе *pssA* и *pssB*, опосредована его работой.

Так было показано, что наличие дополнительной копии гена *rosR* не оказывает существенного влияния на образование клубеньков на корнях симбиотрофного растения клевера (рис. 33). Однако, использование при инокуляции растений контрольного и трансформированного штамма *R. leguminosarum* VSy12 приводит к появлению большего количества клубеньков на корнях клевера по сравнению с растениями, обработанными штаммом *R. leguminosarum* VSy3. При этом в работе Janczarek и соавт. (2007), указано об улучшении эффекта клубенькообразования ризобиями при наличии дополнительных копий гена *rosR*, в нашем же случае мы наблюдали незначительный эффект по сравнению с контрольными штаммами.

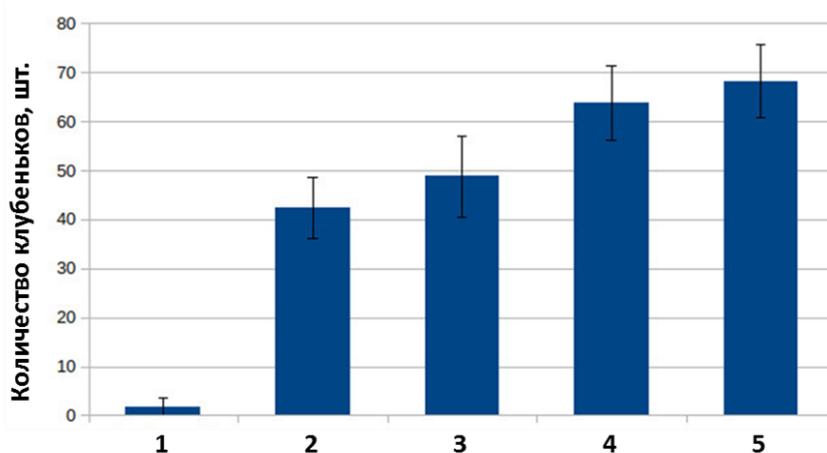


Рисунок 33. Образование клубеньков на растениях клевера лугового после инокуляции исходными и трансформированными штаммами. 1 - контроль без бактерий; 2 - *R. leguminosarum* VSy3; 3 - *R. leguminosarum* VSy3 RosR; 4 - *R. leguminosarum* VSy12; 5 - *R. leguminosarum* VSy12 RosR

Примечательным оказался тот факт, что в опытах по оценке всхожести семян (рис. 34) и измерению длины корней проростков растений клевера, томата и рапса (рис. 35), мы также не обнаружили существенных различий между растениями обработанными контрольными и трансформированными штаммами ризобий. Однако положительное влияние ризобактерий на рост корней и всхожесть семян опытных растений, мы отметили во всех случаях. Этот факт, объясняется тем, что данные штаммы, возможно, выделяют гиббереллин и/или индол-3-уксусную кислоту, а также ЭПС.

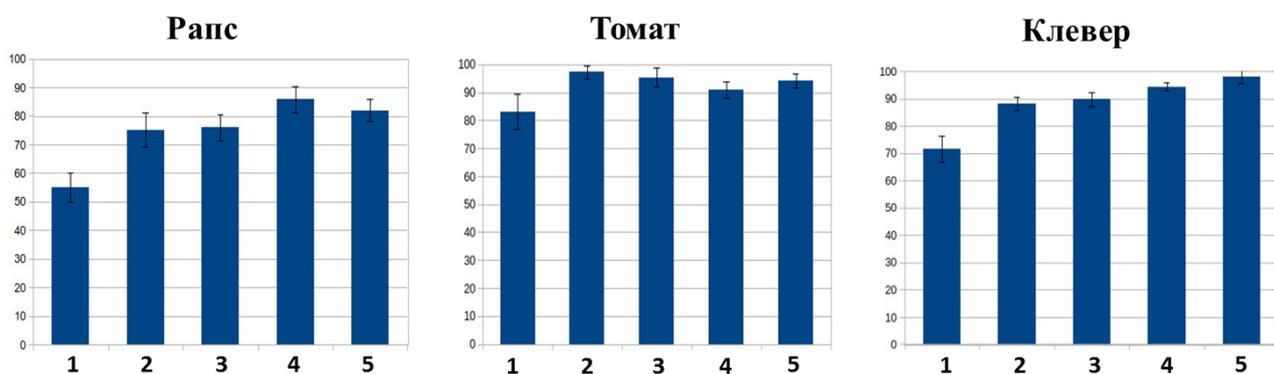


Рисунок 34. Влияние исходных и трансформированных штаммов ризобий на всхожесть семян растений (по оси ординат число проросших семян из 100 шт.). 1 - контроль без бактерий; 2 - *R. leguminosarum* VSy3; 3 - *R. leguminosarum* VSy3 RosR; 4 - *R. leguminosarum* VSy12; 5 - *R. leguminosarum* VSy12 RosR

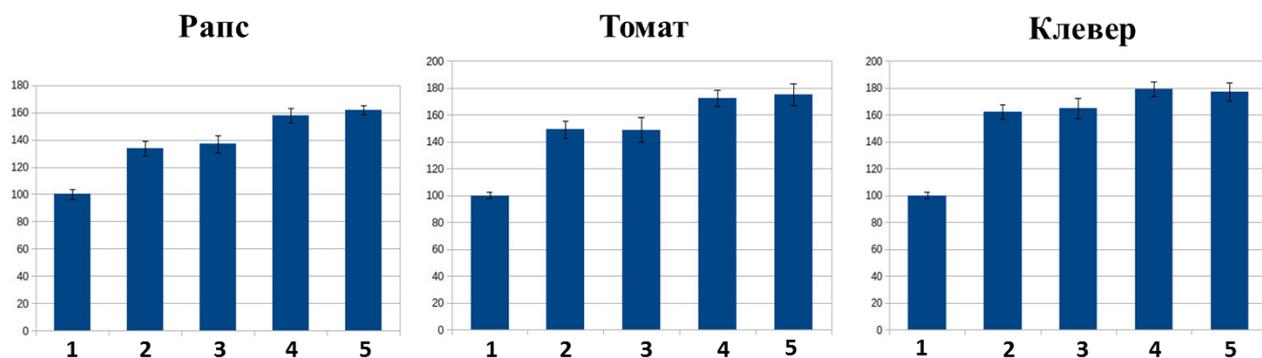


Рисунок 35. Влияние исходных и трансформированных штаммов ризобий на рост корней растений (по оси ординат изменение длины корней в %). 1 - контроль без бактерий; 2 - *R. leguminosarum* VSy3; 3 - *R. leguminosarum* VSy3 RosR; 4 - *R. leguminosarum* VSy12; 5 - *R. leguminosarum* VSy12 RosR

Далее нами было проведено микроскопирование корней томата на предмет наличия на корнях сформированных биопленок. Так нами были микроскопированы срезы корней растения после 4 и после 7 суток совместного культивирования. Так, уже на 4ые сутки мы наблюдали формирование микроколоний, причем в случае трансформированных штаммов, количество таких бактериальных конгломератов было в разы больше (рис. 36).

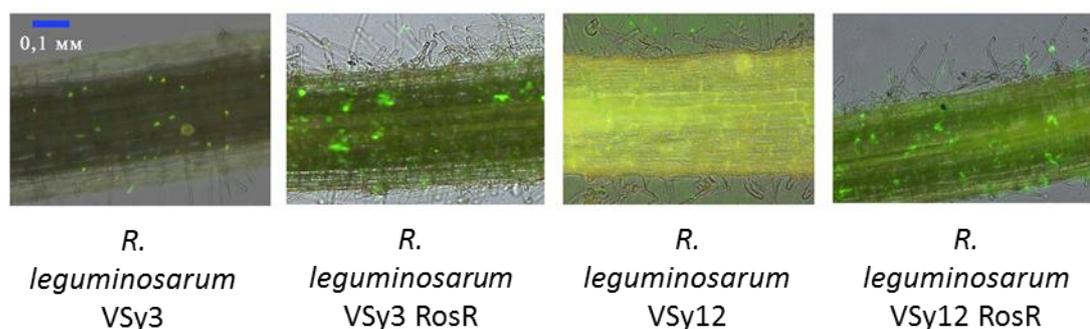


Рисунок 36. Агглютинация штаммов контрольных и трансформированных *R. leguminosarum* на поверхности корней растений томата через 4 дня совместного культивирования.

На 7ые сутки во всех опытах мы отметили образование биопленок на корнях томата (рис. 37). Более того, на корнях растений, которые мы сокультивировали с трансформированными ризобияльными штаммами, сформированная биопленка находилась на более зрелой стадии развития по отношению к биопленкам, образованным дикими штаммами. Причем, при микроскопировании биопленок, образованных диким и рекомбинантным штаммами *R. leguminosarum* VSy3 и *R. leguminosarum* VSy3 RosR, мы наблюдали биопленки, которые находились, главным образом, на поверхности корней растений. В случае же микроскопирования корней растений сокультивируемых со штаммами *R. leguminosarum* VSy12 и *R. leguminosarum* VSy12 RosR, бактерии колонизировали, преимущественно, корневые волоски и биопленки наблюдались именно в этой области.

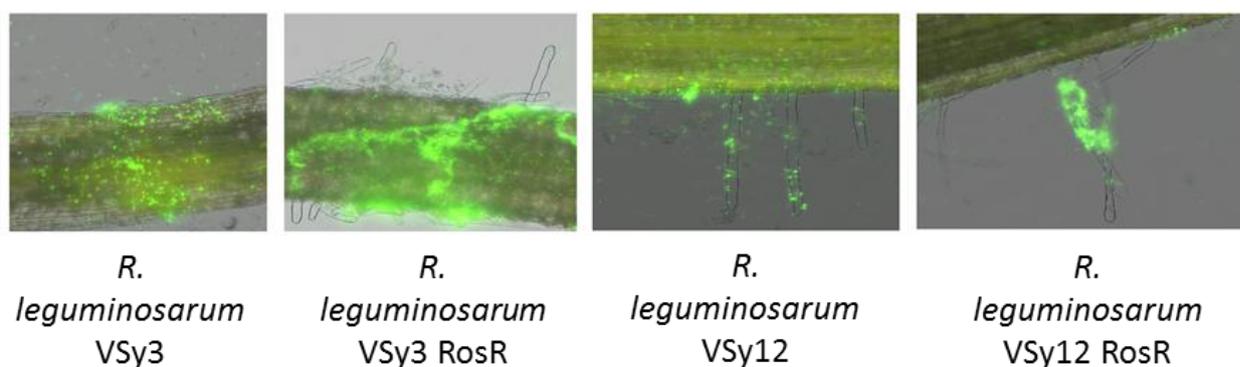


Рисунок 37. Образование биопленок экспериментальными штаммами на поверхности корней растений томата через 7 дней совместного культивирования.

Затем нами была проведена оценка уровня колонизации корней рапса, томата и клевера после 7 суток совместного с ризобиями культивирования. Так, в случае трансформированных штаммов, мы наблюдали увеличение количества адгезированных клеток ризобактерий по сравнению с контрольными штаммами (рис. 38).

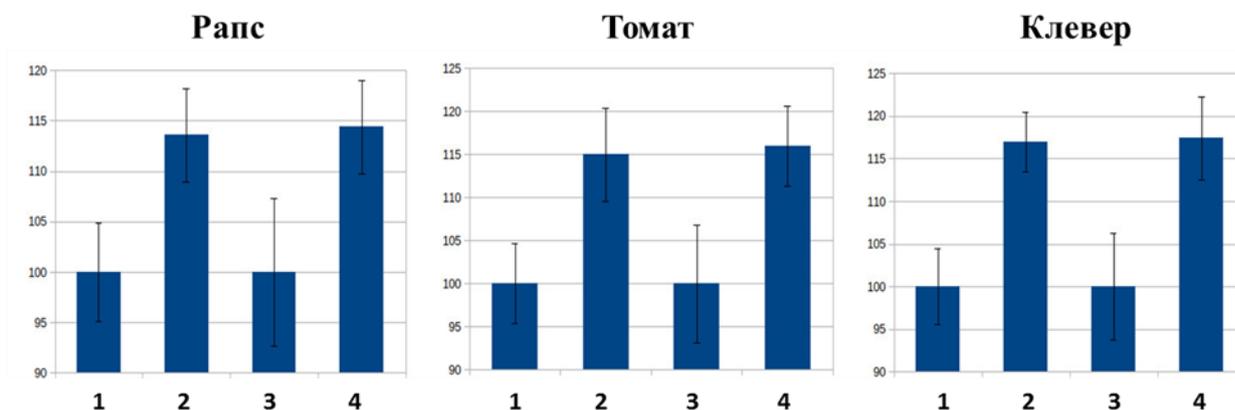


Рисунок 38. Анализ уровня колонизации корней после инокуляции исходными и трансформированными штаммами (по оси ординат изменение числа бактерий в %). 1 - *R. leguminosarum* VSy3; 2 - *R. leguminosarum* VSy3 RosR; 3 - *R. leguminosarum* VSy12; 4 - *R. leguminosarum* VSy12 RosR.

Так нами было выявлено, что применение трансформированных конструкцией pJBGFP658 RosR штаммов при инокуляции растений оказывает незначительный эффект на бобовые и небобовые растения. Данный факт может быть связан с тем, что выбранные нами исходные штаммы способны к синтезу, регулирующих рост и развитие растений метаболитов, в частности ЭПС, гиббереллинов, цитокининов и индол-3-уксусной кислоты, а их значительное перепроизводство в клетке энергетически невыгодно. Также, мы не отметили и существенного влияния штаммов, содержащих в геноме дополнительную копию гена *rosR*, на клубенькообразование на корнях клевера лугового. Однако эксперименты по совместному культивированию трансформированных штаммов и растений рапса, томата и клевера, продемонстрировали, что в случае обработки растений опытными штаммами, наблюдается увеличение количества адгезированных клеток ризобактерий на поверхности корней по сравнению с контрольными штаммами. Более того, на примере корней томата, было выявлено,

что, трансформированные штаммы способны образовывать зрелые биопленки на биотических поверхностях, причем, их локализация зависела от того, каким штаммом инфицирована корневая система

Полученные нами результаты соотносятся с данными представленными в литературе. Так, например, при анализе колонизации и образования биопленок на корнях небобовых растений (арабидопсис и рапс) штаммом *Rhizobium* sp. YAS34 в работах Santaella и соавт. (2008), исследователи указывают на то, что ризобияльные ЭПС способствовали колонизацию определенных зон корневой системы.

Следовательно, наличие дополнительной копии гена *rosR* не оказывает существенного влияния на бобовые и небобовые растения, а также на образование клубеньков на корнях симбиотрофного растения клевера лугового. Однако рекомбинантные по гену *rosR* штаммы способны образовывать биопленки как на абиотических, так и на биотических поверхностях.

Таким образом, штаммы трансформированные конструкцией pJBGFP658 *RosR* не обладают ростостимулирующим эффектом, однако образуют биопленки и эффективнее по сравнению с дикими штаммами колонизируют корневую систему растений, что в свою очередь, может способствовать их выживаемости в ризосфере.

3.4. Анализ влияния факторов окружающей среды на формирование биопленок ризобияльными штаммами

Формирование биопленок представляет собой стратегию выживания ризобий в средах с ограниченным количеством питательных веществ, так как колонизация поверхностей обеспечивает определенные преимущества. Так, в работах Fujishige и соавт. (2005) было показано, что культивирование ризобий на богатой питательными веществами среде приводит к тому, что образованная ими биопленка будет тоньше биопленки сформировавшейся в минимальной среде. Вследствие ранее полученных O'Toole and Kolter (1998b) данных о том, что содержание питательных веществ в среде регулирует развитие биопленок и у

видов *Pseudomonas*, причем их изобилие наоборот способствовало образованию биопленок, в работах Rinaudi и соавт. (2006) было протестировано влияние различных питательных веществ и условий окружающей среды на способность и *S. meliloti* образовывать биопленки. Так, авторами данной работы было выявлено, что концентрация сахарозы, фосфата и кальция положительно коррелирует с образованием биопленок, тогда как экстремальные температуры и значения pH дают отрицательный эффект. Более того, Fujishige и соавт. (2006) показали, что биопленкообразование различных штаммов *R. leguminosarum* может быть усилено ограничением питательных веществ. Ввиду этого, нами была изучена зависимость биомассы биопленок, образованных ризобияльными штаммами, от концентрации Ca^{2+} в культуральной среде, от температуры, а также от наличия питательных веществ в среде.

В экспериментах по оценке биомассы биопленок ризобий, образуемых при различных концентрациях Ca^{2+} в культуральной среде, в качестве контрольных штаммов были выбраны: *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12 (2008), *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4 (2004), *R. galegae* 0702. Опытными штаммами, являлись исходные штаммы, трансформированные конструкциями pJB658GFP PssA, pJB658+pssB, pJB658GFP RosR. Хлорид кальция вносили с шагом 1,5мМ. Оптическую плотность, измеряли при длине волны 590 нм.

В случае проведенного опыта при 0 мМ Ca^{2+} мы наблюдали тонкие биопленки, и, несмотря на то, что толщина биопленок была незначительна как у контрольных, так и трансформированных штаммов, лишь в нескольких случаях биопленка, образованная диким штаммом была толще, образованной трансформированным (рис. 39). Далее, мы наблюдали корреляцию между концентрацией Ca^{2+} в культуральной среде и толщиной биопленок – чем выше была концентрация Ca^{2+} в среде, тем толще становились биопленки. Так, например, добавление в среду 1,5 мМ Ca^{2+} приводило к увеличению толщины биопленок в 2 раза, 3 мМ Ca^{2+} - в 4 раза, 4,5 мМ Ca^{2+} - в 5 раз. Причем, данная закономерность наблюдалась и в отношении штаммов, рекомбинантных по гену *pssA*, а также и *pssB*, и *rosR*. Трансформация штаммов *R. leguminosarum* Pvu 5,

R. leguminosarum VSy12, *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4 геном *pssA* или *rosR* повышает эффективность образования биопленок. В экспериментах со штаммами, рекомбинантными по гену *pssA*, толщина биопленок увеличивалась в среднем в 1,3 раза по сравнению с контрольными штаммами (при 28°C и 4,5 мМ Ca²⁺ в среде); в экспериментах с геном *rosR* – в 1,4 раза. Трансформация геном *pssB*, напротив, уменьшала толщину биопленок, практически, в 2 раза. В случае *R. galegae* 0702 значимых различий в биопленкообразовании между рекомбинантными и контрольными штаммами найдено не было (рис. 39). Также было показано, что трансформация ризобий конструкциями, содержащими гены *pssA* или *rosR*, позволяет некоторым штаммам преодолевать ингибирующее действие низких концентраций кальция в среде и формировать биопленки. Например, в случае *R. leguminosarum* TPr4 (трансформация *pssA* при 1,5 мМ Ca²⁺ в среде) или *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12 (трансформация *rosR* при 1,5 мМ Ca²⁺ в среде) (рис. 39).

Наличие в геноме ризобактерий дополнительной копии генов *pssA* и *rosR*, регулирующих биосинтез ЭПС, положительно влияет на процессы биопленкообразования, так как в случае трансформированных штаммов, мы наблюдали более зрелые биопленки со сложной архитектурой и большей по отношению к соответствующим диким (контрольным) штаммам толщиной. Этот факт согласовывается с данными, представленными в литературе. Так, согласно Russo и соавт. (2006) мутации в гене *pssA*, блокируют биосинтез ЭПС у *R. leguminosarum*, вызывая, тем самым, снижение биопленкообразования. Мутации в гене *pssA*, привели к образованию плоской неструктурированной биопленки и в работах Williams и соавт. (2008), подтверждая, как и результаты Russo и соавт. (2006), что этот ключевой ген, играет важную роль в формировании биопленок. В работах Janczarek и соавт. (2007) указано, что мутации в гене *rosR* у *R. leguminosarum* прямым образом влияют на снижение синтеза ЭПС, а работы 2009 г. показывают, что дополнительные копии этого гена приводят к почти двукратному увеличению синтеза ЭПС. Данные факты указывают на то, что и ген *rosR* функционирует как положительный регулятор

биоупленкообразования. Противоположное же действие на биоупленкообразование, согласно данным полученным Janczarek и соавт. (2001), оказывает наличие дополнительных копий гена *pssB* в штаммах дикого типа. Полученные нами результаты также согласовываются и с этим утверждением. Штаммы, рекомбинантные по гену *pssB*, образовывали более тонкие биоупленки и, несмотря на то, что повышенная концентрация Ca^{2+} в культуральной среде положительно влияла на биоупленкообразование, контрольные штаммы в данном случае всегда образовывали более сложную по структуре биоупленку большей толщины.

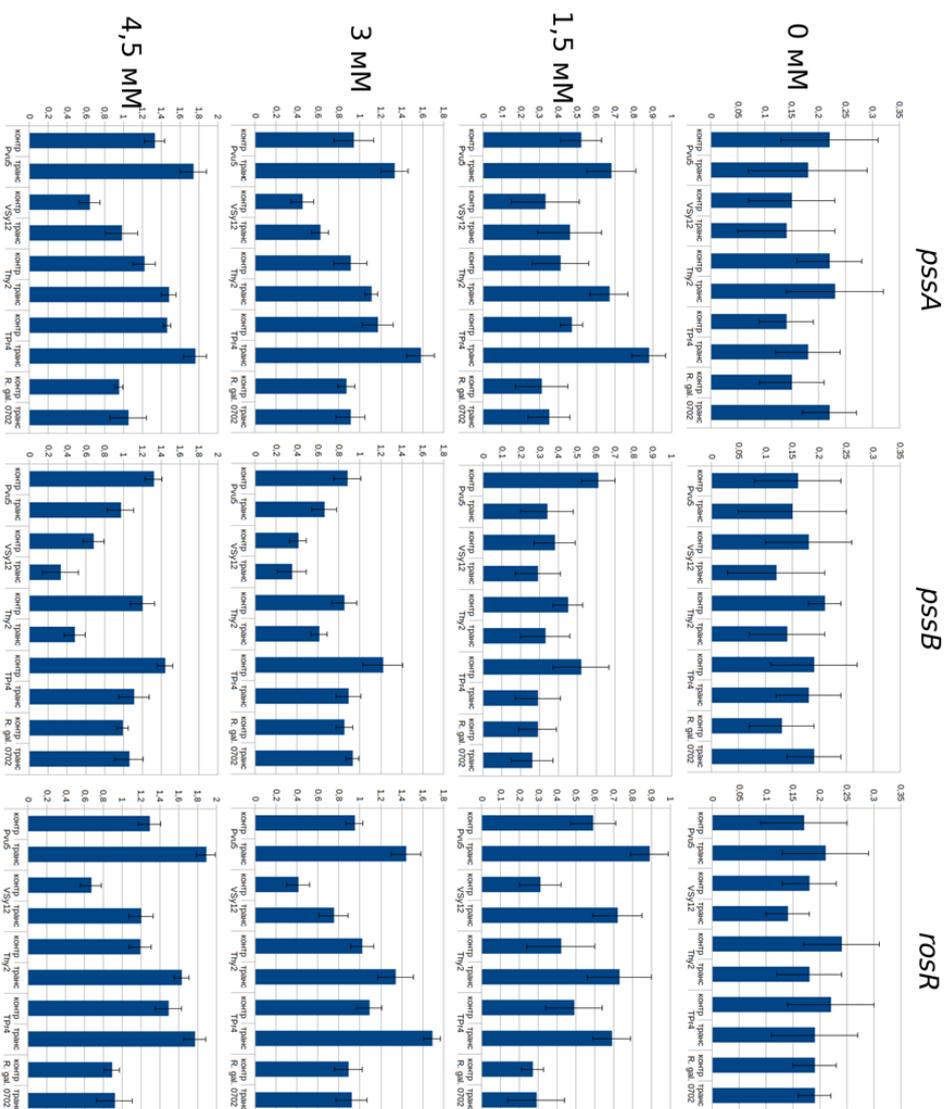


Рисунок 39. Относительная биомасса биоупленок исходных и трансформированных конструкциями rJB658GFP

pSSA, rJB658 pSSB и rJB658GFP RosR штаммов ризобий после 7 суток культивирования при 28 °C в зависимости от содержания Ca²⁺ (мМ) в среде. По оси Y – оптическая плотность кристаллического филолетового, десорбированного после окрашивания биоупленок, образованных на пластиковых планшетах.

Далее нами были проведены эксперименты по оценке воздействия температурного режима на биопленкообразование (рис. 40). В качестве исходной была выбрана концентрация Ca^{2+} 4,5 мМ, так как наибольшая толщина биопленок наблюдалась нами именно в случае добавления 4,5 мМ Ca^{2+} в культуральную среду. Оптимальной температурой для культивирования ризобий, является температура 28°C. Ввиду этого, для того, чтобы оценить биомассу биопленок ризобий при различных температурах, мы выращивали бактерии при температуре на 10°C ниже и на 10°C выше оптимальной.

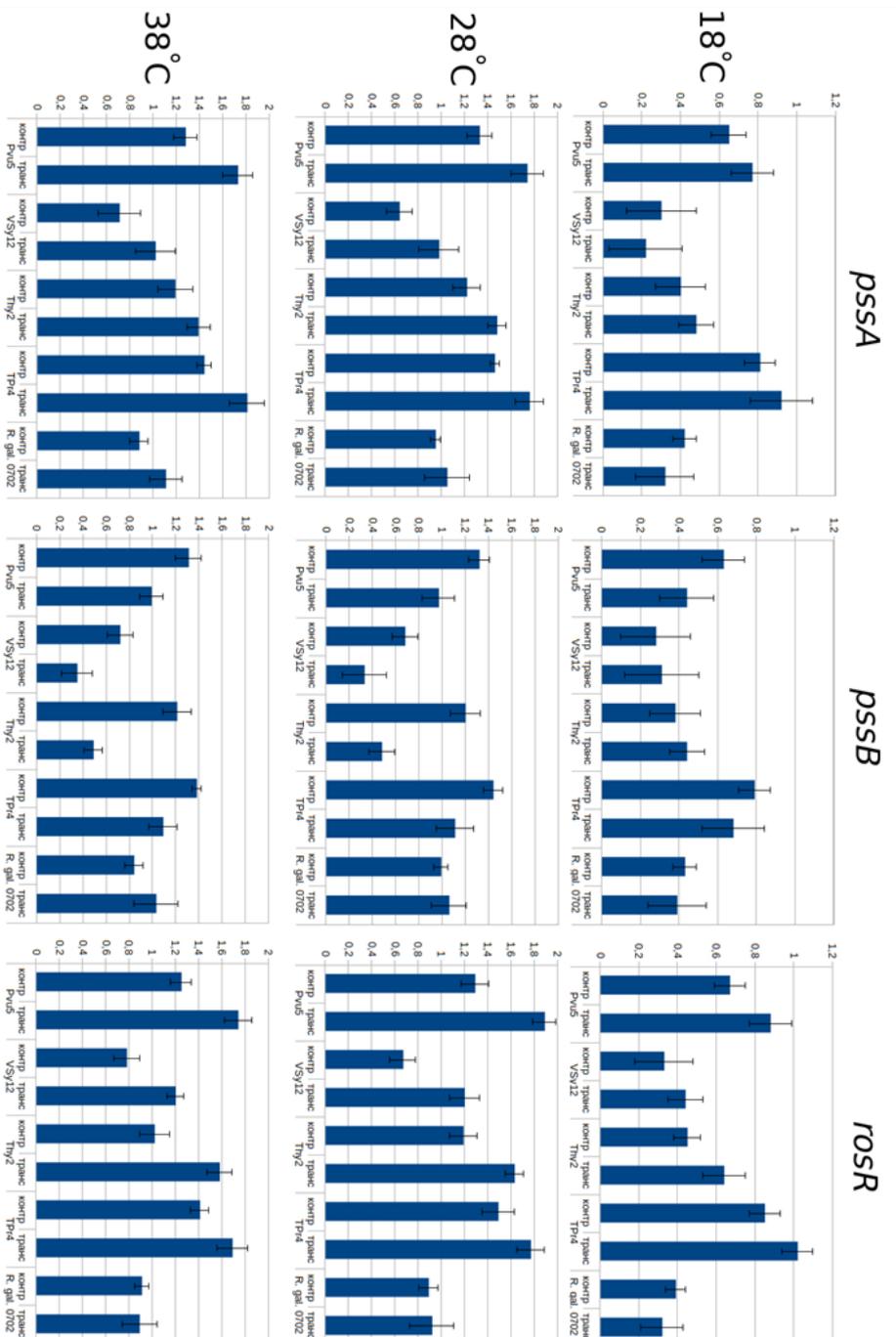


Рисунок 40. Относительная биомасса биопленок исходных и трансформированных штаммов бактерий после 7 суток культивирования при содержании $4,5 \text{ mM Ca}^{2+}$ в культуральной среде в зависимости от температуры. По оси Y – оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок, образованных на пластиковых планшетах.

Проведенные опыты показали зависимость биопленкообразования от температурных условий. Как контрольные, так и трансформированные бактерии эффективно образовывали биопленки при температуре 28°C. При культивировании ризобий при более низкой температуре (18°C), способность штаммов формировать биопленки во всех случаях снижалась более чем в 2 раза. При повышении температуры до 38°C статистически значимых различий в эффективности формирования биопленок по сравнению со штаммами, выращенными при 28°C, найдено не было. Схожие результаты получены и в работе Rinaudi и соавт. (2006), в которой описано влияние температур в диапазоне от 22°C до 45°C на рост и способность *S. meliloti* образовывать биопленки. Авторы показали, что различий между биопленками синоризобий культивированных при 28°C и при 37°C нет. Однако воздействие экстремальных температур (22°C и 45°C) отрицательно влияло как на рост бактерий, так и на образование биопленок. Причем при 45°C образование биопленок наблюдалось на уровне, равном 22°C.

Далее нами было изучена зависимость биомассы биопленок, образованных ризобияльными штаммами от наличия питательных веществ в среде. В качестве исходного, был выбран штамм *R. leguminosarum* VSy3. Экспериментальными штаммами являлись штамм *R. leguminosarum* VSy3 GFP, трансформированный плазмидой pJB658GFP, и *R. leguminosarum* VSy3 RosR, трансформированный конструкцией pJB658GFP RosR. Для формирования биопленок использовались углеводные, безбелковые среды YM и RDM.

Так на примере штамма *R. leguminosarum* VSy3 было обнаружено, что исследуемые штаммы способны образовывать биопленки на инертных поверхностях как в среде YM, так и в среде RDM. Однако рост и размножение клеток, а также толщина биопленки в случае контрольных и трансформированного плазмидой pJB658GFProsR штаммов ризобий при выращивании их на среде RDM была более чем в три раза выше значений, которые мы наблюдали в случае культивирования бактерий на среде YM (рис. 41). Следовательно, полученные данные подтверждают гипотезу Fujishige и соавт. (2005), свидетельствующую о том, что в минимальной среде ризобии формируют

био пленки толще тех, что образованы в богатых питательными веществами средах, т.е. чем богаче питательная среда, тем тоньше будет сформированная ризобактериями био пленка, и наоборот.

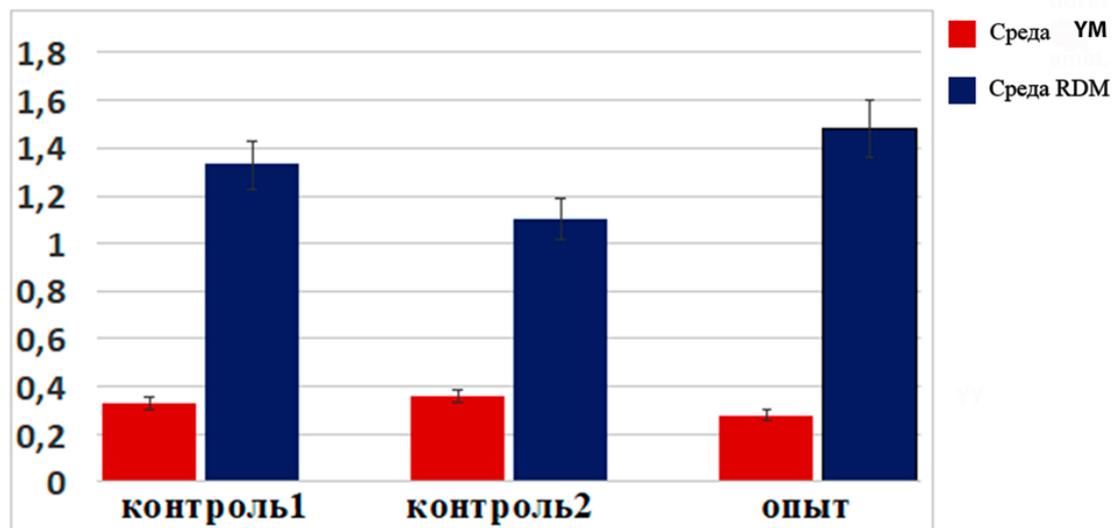


Рисунок 41. Относительная биомасса био пленок исходных и трансформированных штаммов бактерий после 7 суток культивирования при 28°C в зависимости от среды. По оси Y – оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания био пленок, образованных на пластиковых планшетах.

Контроль1 – штамм *R. leguminosarum* VSy3,

Контроль2 – штамм *R. leguminosarum* VSy3 GFP,

Опыт – штамм *R. leguminosarum* VSy3 RosR.

Таким образом, проведенные эксперименты выявили, что эффективность образования био пленок напрямую зависит от концентрации кальция Ca^{2+} в культуральной среде и температурного режима. Немаловажное значение на процессы адгезии клеток на биотических и абиотических поверхностях и формирования микро колоний, имеет и наличие питательных веществ в окружающей среде.

3.5. Определение ростостимулирующего эффекта ризосферных штаммов, синтезирующих модификаторы механизмов формирования био пленок на поверхности корней

Применение ризобий в качестве PGPR в значительной степени связано с использованием суспендированных культур. Процесс формирования биопленок, который напрямую связан с синтезом ризобиями ЭПС, в этом случае имеет большое значение, так как позволяет ризобиям поддерживать плотность клеток до момента взаимодействия с растением-хозяином. Ризобактерии выделяют различное количество ЭПС (Ribeiro and Burkert, 2016; Moretto et al., 2015; Лобанов и Полюдова, 2020), и, соответственно, чем выше этот показатель, тем выше их конкурентоспособность по сравнению с другими штаммами ризосферы. Инокуляция растений штаммами ризобий, синтезирующими экзополисахариды значительно увеличивает всхожесть семян и рост проростков небобовых растений (Лавина и др., 2016а; Хакимова и др., 2017с; Castellane et al., 2015).

В виду того, что проведенные нами ранее опыты по анализу стимуляции всхожести семян и измерению длины корней проростков растений клевера, томата и рапса продемонстрировали, что инокуляция растений ризобияльными штаммами, в геноме которых присутствуют гены, участвующие в биосинтезе ЭПС, ведет к увеличению этих ростовых параметров. А наличие дополнительной копии генов-регуляторов синтеза ЭПС не оказывает существенного влияния на процессы клубенькообразования на корнях клевера лугового и ростовые параметры бобовых и небобовых растений. Нами была создана коллекция генетически охарактеризованных диких ризобияльных штаммов, обладающих ростостимулирующей активностью.

Так, для того чтобы провести исследования ростостимулирующего эффекта ризосферных штаммов, синтезирующих модификаторы механизмов формирования биопленок на поверхности корней, использовались следующие штаммы:

R. leguminosarum Pvu5

R. leguminosarum Pvu5+RapA1

R. leguminosarum VSy12 (2008)

R. leguminosarum LSy10 (D17)

R. leguminosarum THy1

R. galegae 0702

R. leguminosarum TPr3 (2004)

P. aureofaciens ИБ51 «Елена»

P. aureofaciens ИБ51 «Елена»+RapA1

Мы использовали 5 из 10 обнаруженных нами штаммов *R. leguminosarum*, у которых были идентифицированы исследуемые нами гены ответственные за синтез ЭПС и, наблюдалось большее по сравнению с другими штаммами коллекции ослизнение клеточных стенок. А также 1 штамм *R. galegae* 0702, клетки, которого продемонстрировали наибольшее зафиксированное нами ослизнение клеточных стенок. В опытах по микроскопированию структур, образуемых данными штаммами, нами было продемонстрировано, что они способны к формированию биопленок, что, в свою очередь, имеет большое значение для их выживания и конкурентоспособности ризосфере.

В качестве положительного контроля нами были выбраны: штамм *P. aureofaciens* ИБ51 «Елена» - эффективный биопрепарат, стимулирующий рост и развитие растений, а также 2 штамма, трансформированных геном *rapA1* – *P. aureofaciens* ИБ51+RapA1 и *R. leguminosarum* Pvu5+RapA1. Белок, кодируемый этим геном, способствует адсорбции микроорганизмов на поверхности корней. Показано, что конститутивная экспрессия гена *rapA1* в клетках микросимбионта оказывает положительный эффект на ростовые параметры растений (Нигматуллина и др., 2015; Хакимова и др., 2017а; Вершинина и др., 2019а).

Для изучения эффектов оказываемых исследуемыми штаммами на бобовые и небобовые культуры использовали растения: салата латука (*Lactuca sativa*), репы (*Brassica rapa*), козлятника восточного (*Galega orientalis*), огурца обыкновенного (*Cucumis sativus*) и клевера красного (*Trifolium pratense*). Их семена инокулировали суспензией штаммов. Через неделю подсчитывали процент всхожести семян и длину корней и гипокотилей.

Существуют работы, доказывающие, что инокуляция растений высокими концентрациями ризобий может оказывать и пагубное влияние на рост и урожайность небобовых культур (Perrine et al., 2001; Antoun and Prevost, 2006).

Для того чтобы избежать негативного воздействия на исследуемые растения, нами были проведены опыты по инокуляции растений различными концентрациями ризобий (Лавина и соавт., 2014, 2016а, Вершинина и соавт., 2019). Так были выявлены оптимальные концентрации, при которых штаммы *R. leguminosarum*, *R. galegae* и *P. aureofaciens* облают ростостимулирующим эффектом, не оказывая при этом негативного влияния на исследуемые растения – 10^4 КОЕ/мл. и 10^5 КОЕ/мл. Так как наибольшие средние значения мы наблюдали в случае инокуляции растений суспензией бактерий концентрация, которой была 10^5 КОЕ/мл., в дальнейшем, будем описывать именно эти опыты.

3.5.1. Стимуляция всхожести семян

При проведении опытов по изучению ростостимулирующего эффекта 7 ризобиальных и 2 штаммов псевдомонад на семена салата латука, репы, козлятника восточного, огурца обыкновенного и клевера красного, был подсчитан показатель всхожести семян.

Было выявлено, что инокуляция растений клевера красного исследуемыми штаммами, в основном положительно влияет на всхожесть семян (рис. 42), однако в случае штамма *R. leguminosarum* VSy12 (2008) мы наблюдали и обратный эффект. Так, было показано, что использование ризобиальных штаммов *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* Pvu5+RapA1, *R. leguminosarum* THy1, *R. galegae* 0702 и *R. leguminosarum* TPr3 (2004) при обработке клевера красного (*Trifolium pratense*) на 10% увеличивает всхожесть семян по сравнению с контрольными растениями, при этом штамм *R. leguminosarum* TPr3 (2004) является природным симбионтом клевера красного. Штамм *R. leguminosarum* LSy10 (D17) не оказал влияния на показатель всхожести семян, в отличие от штаммов псевдомонад.

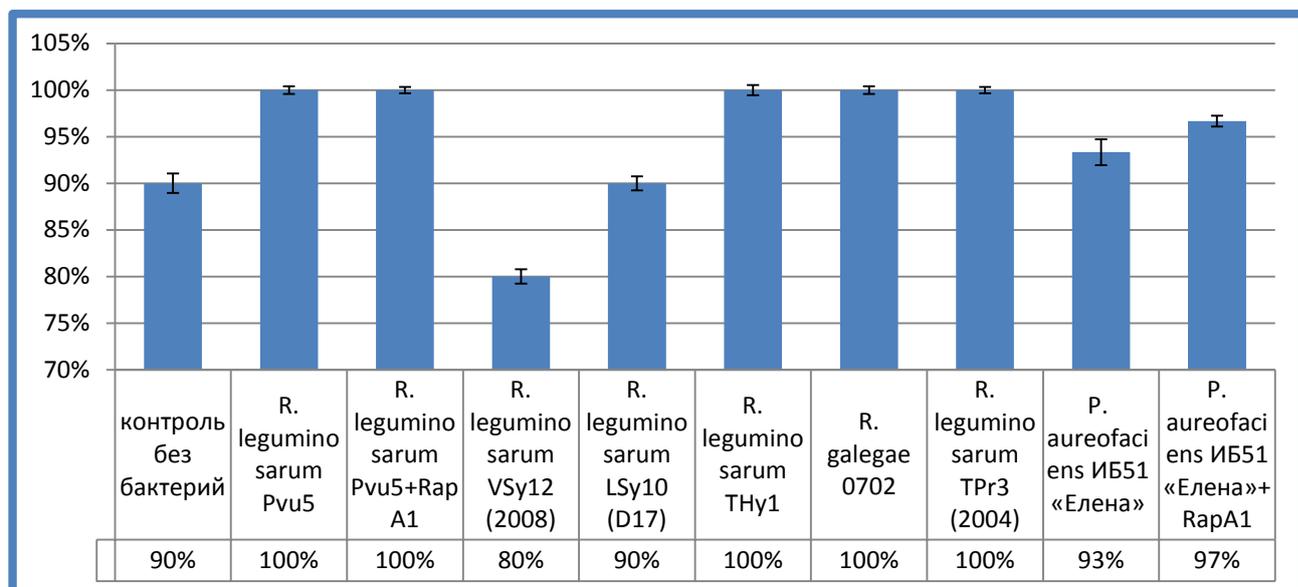


Рисунок 42. Процент всхожести семян клевера красного.

В опытах по инокуляции растений козлятника восточного исследуемыми штаммами, мы использовали штамм, который является природным симбионтом козлятника восточного и при этом был трансформирован геном *rapA1*, что в свою очередь должно было улучшить адсорбцию штамма *R. galegae* 0702+RapA1 на поверхности корней. Данное предположение оказалось верным – применение штамма при обработке семян растений козлятника приводит к значительному увеличению всхожести (на 27% больше по сравнению с контрольными растениями) (рис. 43). На втором месте был штамм *R. galegae* 0702 (на 17% больше по сравнению с контрольными растениями). Также мы использовали и штамм *R. leguminosarum* TPr3 (2004)+RapA1, который, как дикий штамм *R. leguminosarum* TPr3 (2004) оказался на третьем месте по показателям всхожести растений (на 10% больше по сравнению с контрольными растениями). Штаммы *R. leguminosarum* VSy12 (2008) и *R. leguminosarum* THy1, в отличие от других штаммов, показавших положительный эффект на всхожесть семян козлятника восточного, не оказали влияния на растения.

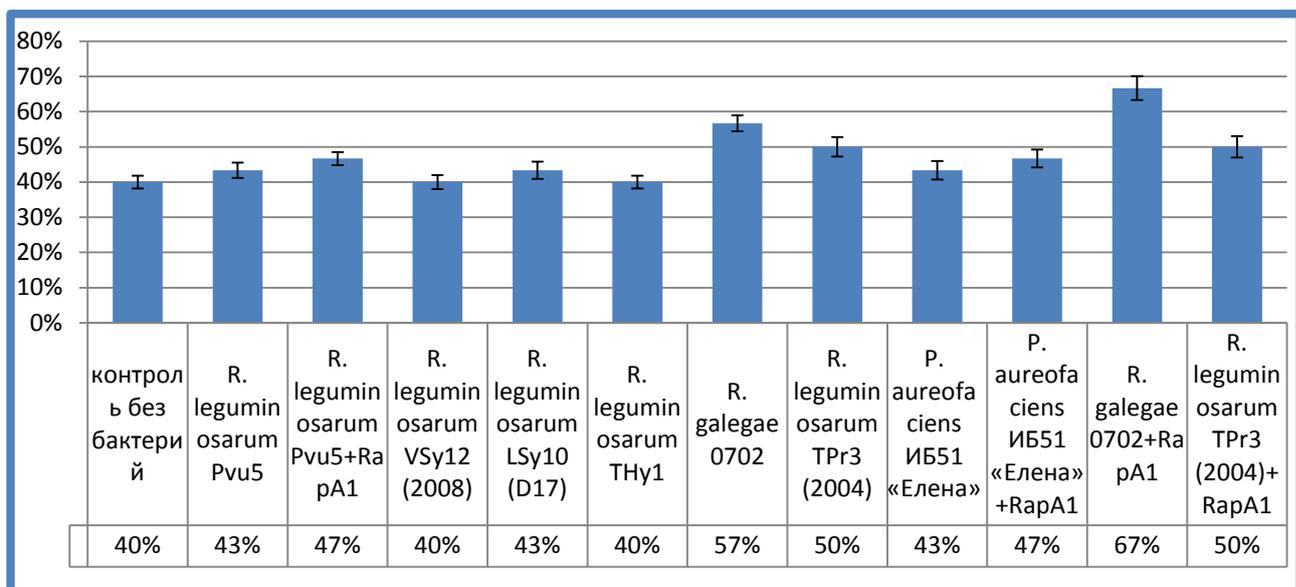


Рисунок 43. Процент всхожести семян козлятника восточного.

Нами было показано что, штамм *R. galegae* 0702 значительно увеличивает всхожесть семян огурца обыкновенного (показатель всхожести семян был на 27% больше по сравнению с контрольными значениями) (рис. 44). Более того, все штаммы оказали положительный эффект на растения. На втором месте были показатели штаммов *R. leguminosarum* Pvu5 и *R. leguminosarum* THy1 (на 17% больше по сравнению с контрольными растениями).

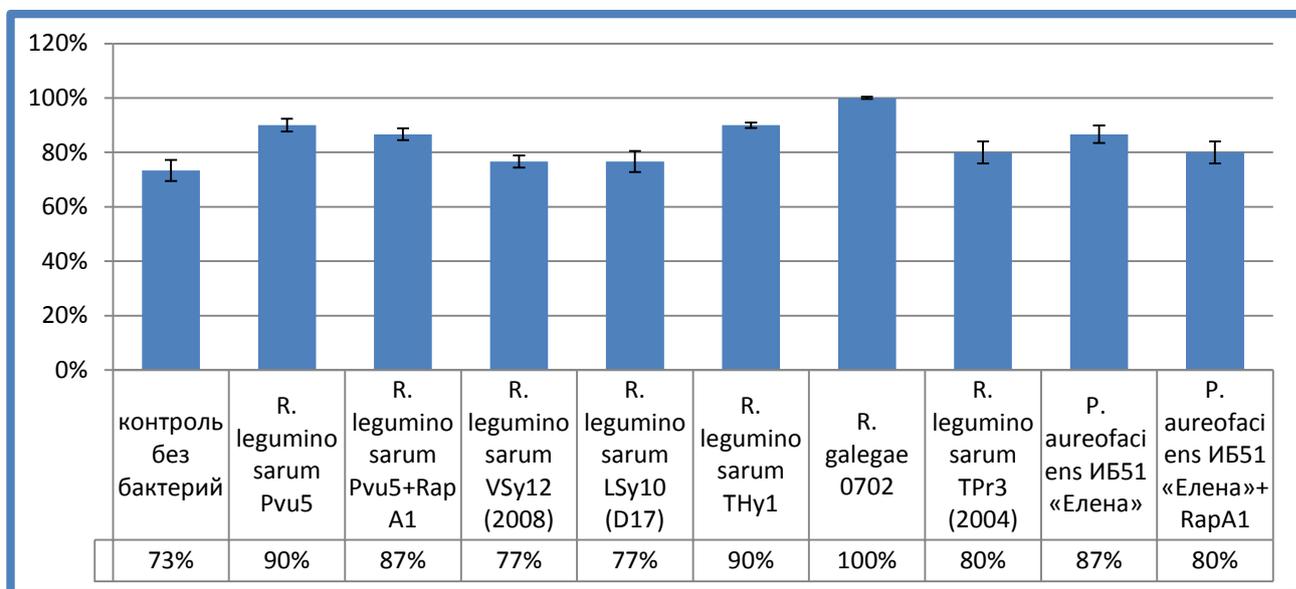


Рисунок 44. Процент всхожести семян огурца обыкновенного.

Наибольший эффект на всхожесть семян растений мы наблюдали в случае обработки семян репы, у которых была очень низкая всхожесть 7% (рис. 45). Так при использовании штамма *R. leguminosarum* Pvu5 при инокуляции растений репы

в 10 раз увеличивается всхожесть семян, а в случае штамма *R. leguminosarum* VSy12 (2008) на 53% больше по сравнению с контрольными растениями.

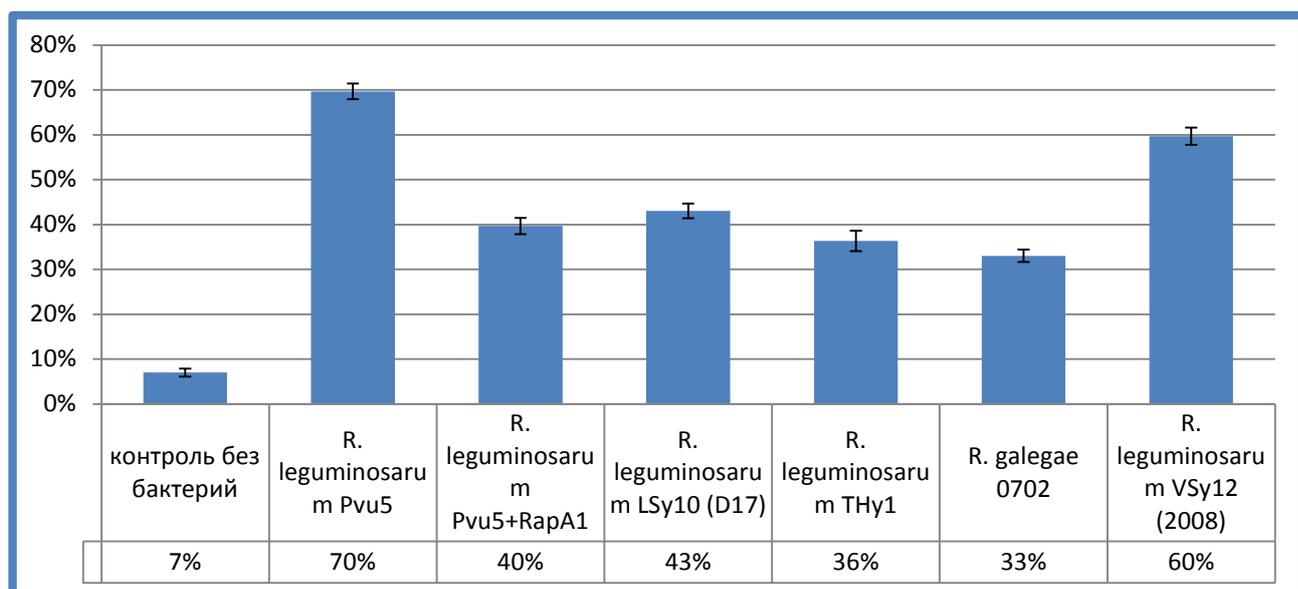


Рисунок 45. Процент всхожести семян репы.

Инокуляция семян салата латука исследуемыми штаммами также приводит к увеличению всхожести семян растений. Наибольшие показатели по сравнению с контрольными растениями салата мы наблюдали в случае штаммов *R. leguminosarum* TPr3 (2004) и *R. leguminosarum* LSy10 (D17), которые были на 19% и 18% выше значений контрольных групп (рис. 46).

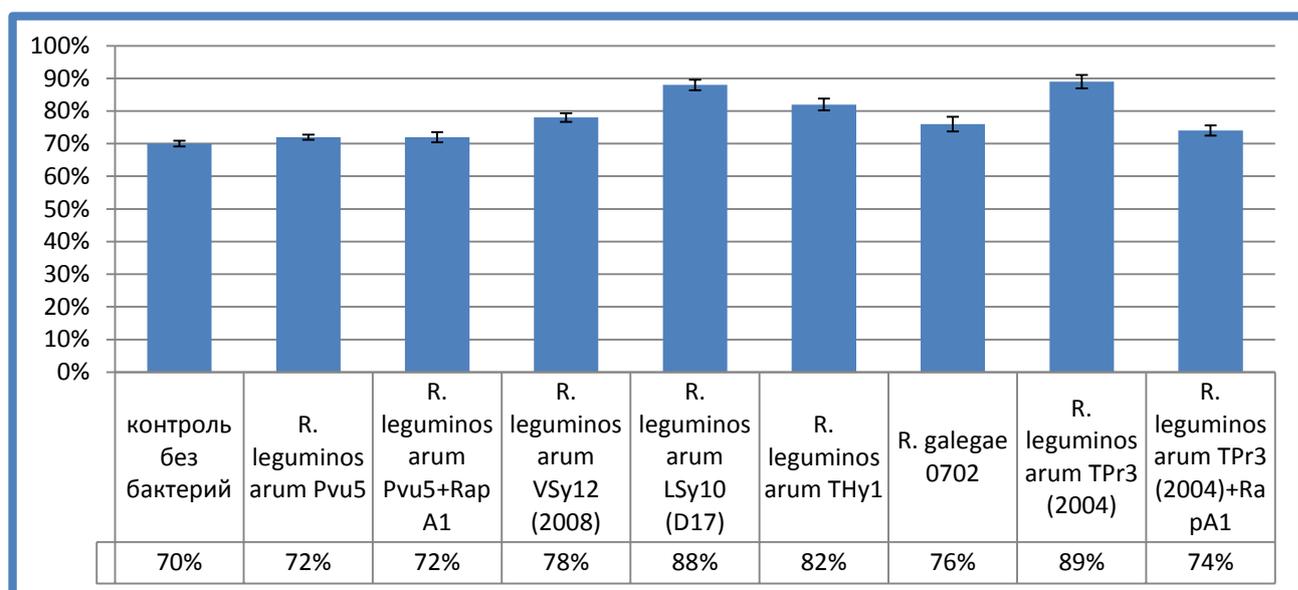


Рисунок 46. Процент всхожести семян салата латука

Следовательно, при проведении опытов по изучению ростостимулирующего эффекта ризобияльных штаммов, а также штаммов

псевдомонад на семена салата латука, репы, козлятника восточного, огурца обыкновенного и клевера красного, было выявлено, что обработка семян этих растений данными штаммами значительно увеличивает их всхожесть. При этом в большинстве случаев значения показателей всхожести семян растений, инокулированных ризобиями было выше значений, которые мы наблюдали в отношении биопрепарата «Елена». Это явление может быть связано с синтезом ризобактериальными штаммами экзополисахаридов и индол-3-уксусной кислоты аналогично результатам, полученным зарубежными авторами при исследовании влияния штаммов ризобий на всхожесть семян различных небобовых растений. Так, например, в работе Alami и соавторов, была отмечена стимуляция всхожести семян подсолнечника при их обработке штаммом *Rhizobium* YAS34, синтезировавшим экзополисахариды. Обработанные штаммом YAS34 семена подсолнечника обладали лучшей всхожестью по сравнению с контрольными растениями (Alami et al., 2000). Схожие результаты получены и при обработке семян салата латука *Rhizobium sp.* штаммы 33 и 45. Инокуляция семян салата данным штаммом показала увеличение количества проросших семян по сравнению с контролем (Pena and Reves, 2007). Влияние на всхожесть семян салата латука авторы объясняют синтезом *Rhizobium sp.* штаммы 33 и 45 индол-3-уксусной кислоты.

3.5.2. Влияние ризобияльных штаммов на длину корней проростков салата латука, репы, козлятника восточного, огурца обыкновенного и клевера красного

При оценке влияния исследуемых штаммов на корневую систему салата латука, репы, козлятника восточного, огурца обыкновенного и клевера красного измеряли длину корня опытных проростков и сравнивали с длиной корня контрольных проростков. В случае клевера красного мы отметили, что все исследуемые штаммы показали значения выше контрольных растений (от 38 до 119% больше контрольных) (рис. 47). Наибольшая длина корней была в случае инокуляции семян растений штаммами псевдомонад, причем штамм,

трансформированный геном *rapA1*, показал значения выше значений нетрансформированного штамма. Среди ризобийных штаммов наибольшие показатели мы наблюдали при измерении корней растений, обработанных штаммом *R. leguminosarum* Pvu5+RapA1, которые оказались на уровне биопрепарата «Елена» - средняя длина корней составляла 5,19 см. и 4,83 см. соответственно, в то время как значение средней длины корней контрольных растений составляло 2,37 см.

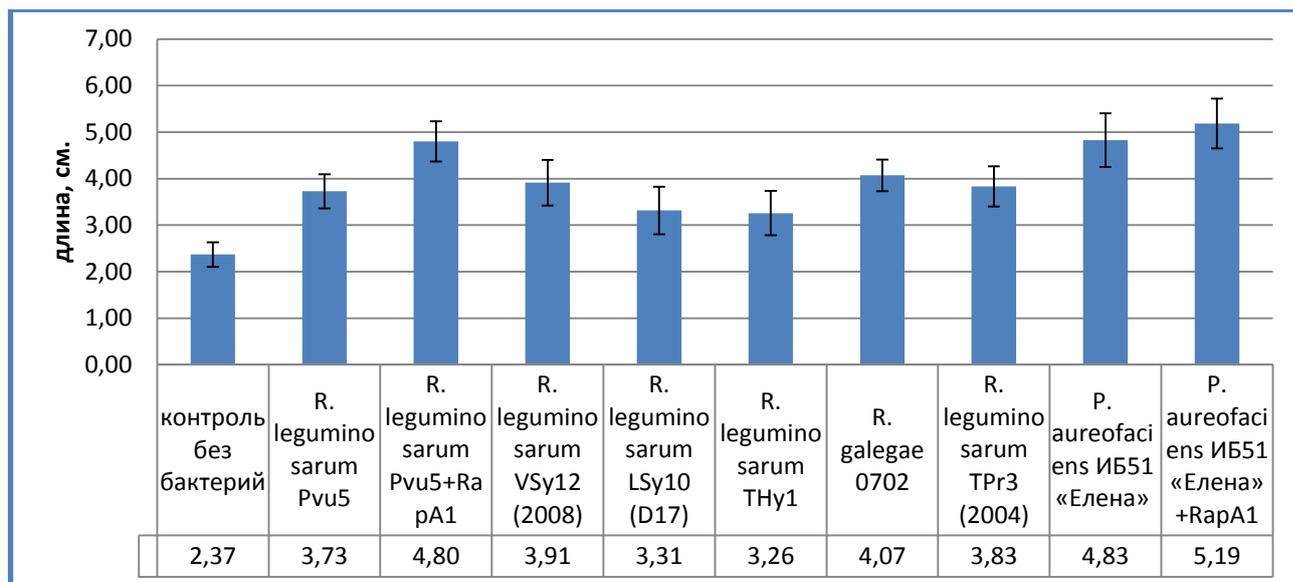


Рисунок 47. Средняя длина корней опытных и контрольных растений клевера красного.

Инокуляция семян козлятника восточного псевдоманадами и ризобиями, у которых были идентифицированы все исследуемые нами гены, участвующие в биосинтезе экзополисахаридов, а также штаммом *R. galegae* 0702, привела к увеличению длины корней проростков (показатели опытных проростков были от 10 до 37% больше контрольных значений) (рис. 48). Однако штаммы *R. leguminosarum* VSy12 (2008) и *R. leguminosarum* LSy10 (D17) не оказали явного эффекта на растения. Максимальные значения мы наблюдали в случае использования псевдомнад, причем трансформированный геном *rapA1* штамм оказал наибольшее ростостимулирующее воздействие (показатель длины корней в этом случае составил 0,54 см., в то время как показатель длины корней контрольных растений был 0,39 см. Природный симбионт козлятника восточного штамм *R. galegae* 0702 также положительно влиял на данное растение, как и в

случае трансформированного по гену *rapA1* штамма *R. galegae* 0702+RapA1. Показатели длины корней проростков козлятника восточного, обработанных *R. leguminosarum* THy1, *R. leguminosarum* TPr3 (2004) и *R. leguminosarum* TPr3 (2004)+RapA1, были больше контрольных на 21%, 20% и 24% соответственно.

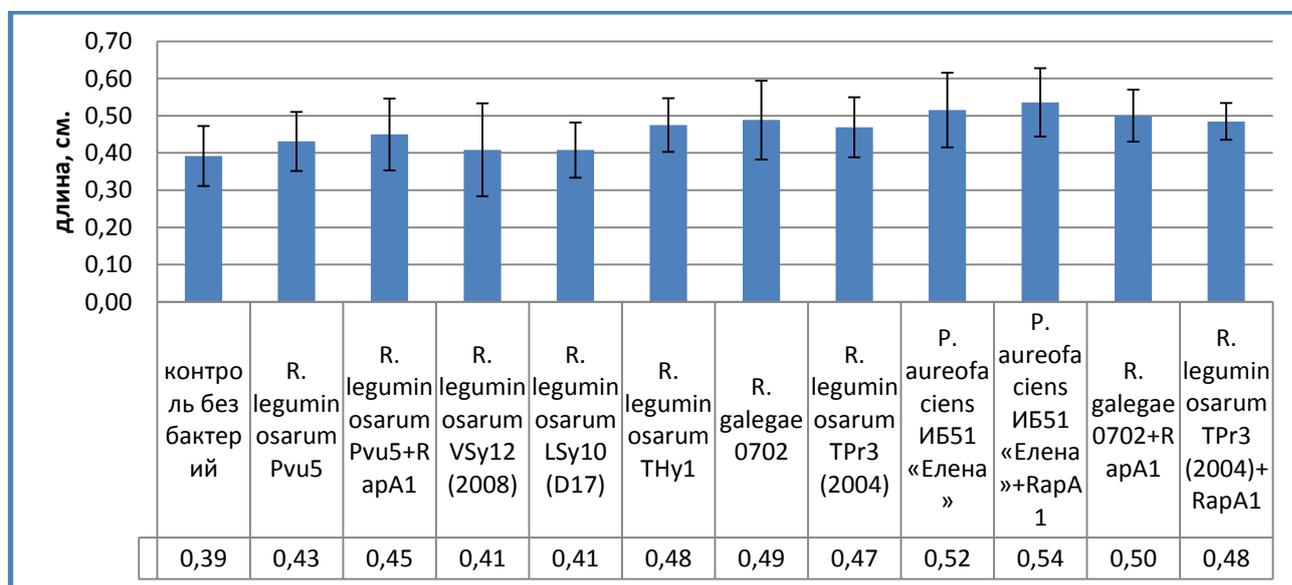


Рисунок 48. Средняя длина корней опытных и контрольных растений козлятника восточного.

В опытах по измерению длины корней огурца обыкновенного ростостимулирующий эффект мы наблюдали в случае 5 штаммов (рис. 49). Максимальное среднее значение длины корней мы вновь отметили у растений обработанных штаммами псевдомонад, особенно в случае трансформированных геном *rapA1* штаммов, показатели которого были более чем в 2 раза выше тех, что у контрольных растений. Корни опытных растений, инокулированных ризобияльными штаммами *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* Pvu5+RapA1 и *R. galegae* 0702 были длиннее контрольных на 67%, 79% и 86% соответственно.

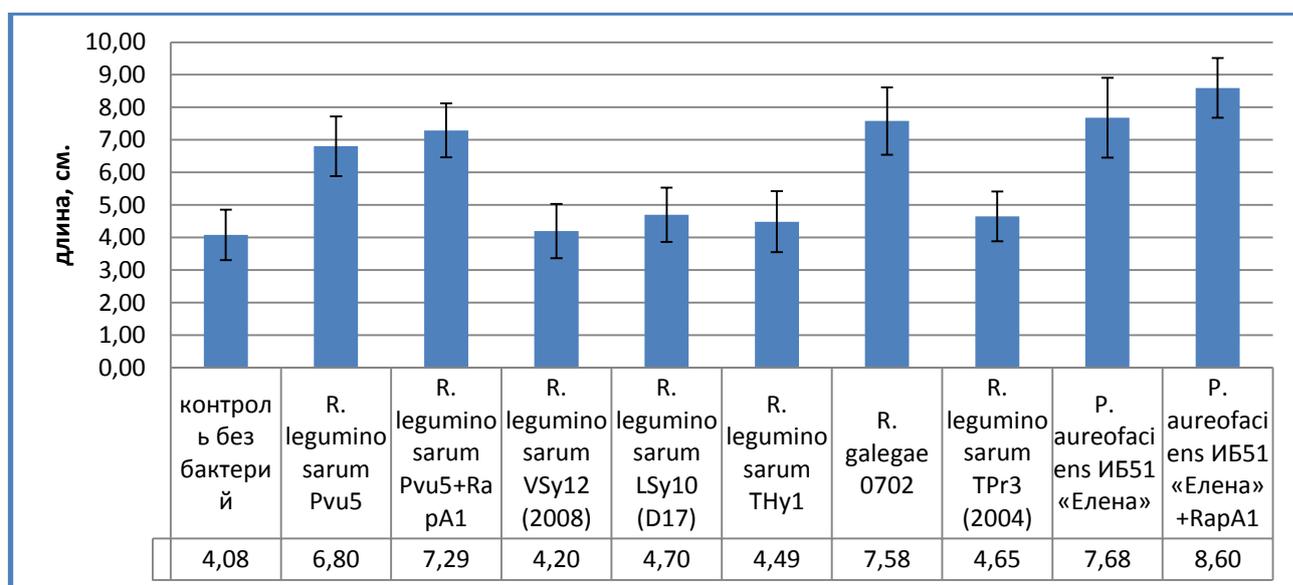


Рисунок 49. Средняя длина корней опытных и контрольных растений огурца обыкновенного.

Как и при изучении всхожести семян, опыты по измерению длины корней проростков репы показали, что инокуляция данных растений ризобиями существенно влияет на их рост и развитие (рис. 50). Все исследуемые штаммы показали высокие значения в сравнении с необработанным бактериями растениям. Максимальный эффект мы отметили у штамма *R. leguminosarum* Pvu5+RapA1 – 4,12 см., показатель контрольных растений репы составил 0,13 см.

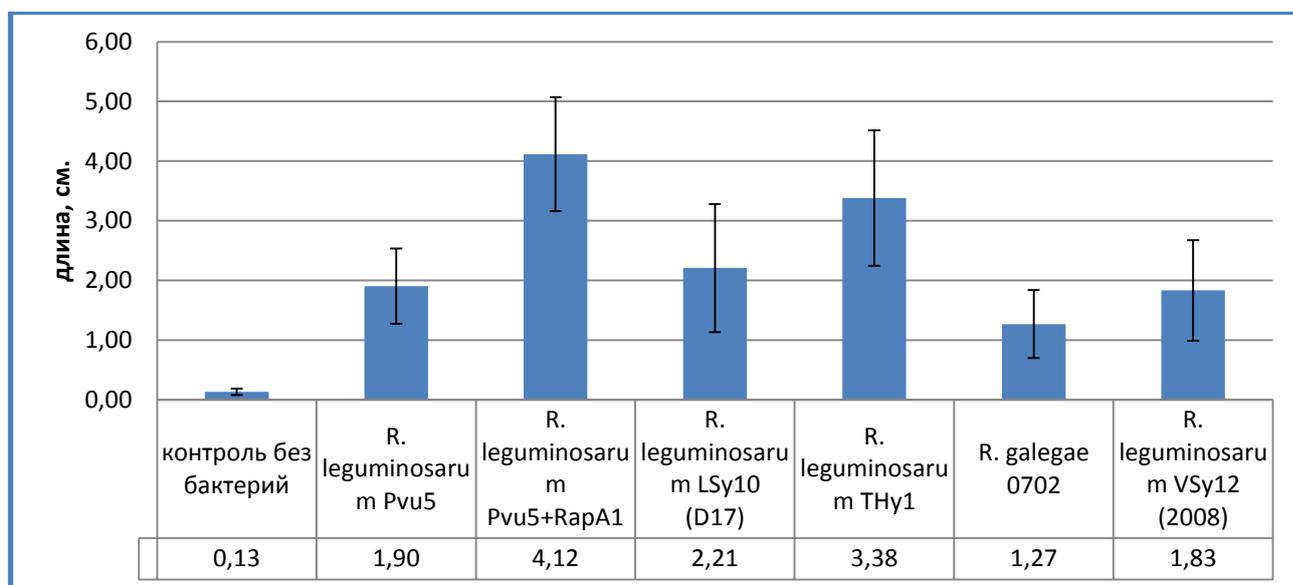


Рисунок 50. Средняя длина корней опытных и контрольных растений репы.

Показатели длины корней проростков салата латука, инокулированных ризобиями, синтезирующими экзополисахариды, были значительно выше по

сравнению с контролем, в том числе и обработанные *R. galegae* 0702 (на 52%) (рис. 51). Опытные проростки были длиннее контрольных на 52–67 процента, в зависимости от того каким штаммом было обработано растение. Однако штаммы *R. leguminosarum* Pvu5 и *R. leguminosarum* Pvu5+RapA1 ростостимулирующего эффекта на растения салата латука не оказали.

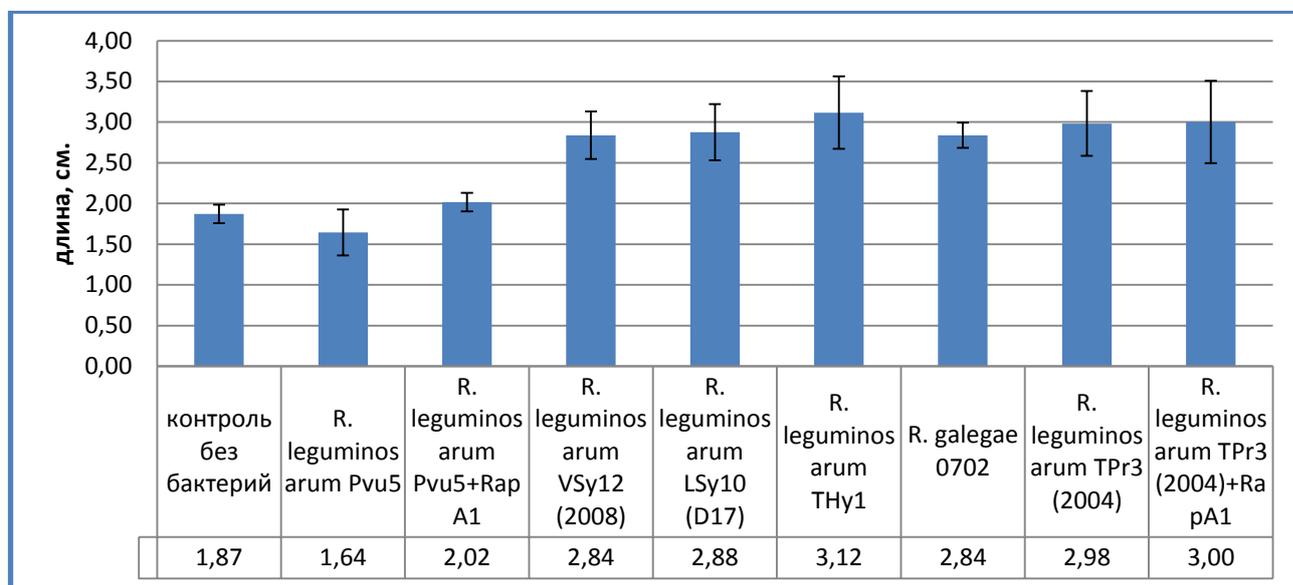


Рисунок 51. Средняя длина корней опытных и контрольных растений салата латука.

Исследуемые нами ризобактериальные штаммы оказали ростостимулирующий эффект на показатели длины корней проростков салата латука, репы, козлятника восточного, огурца обыкновенного и клевера красного, что, согласно литературным источникам, может быть связано с тем, что они синтезируют гиббереллин и/или индол-3-уксусную кислоту (Pathania et al., 2020; Zahir et al., 2004; Khalid et al., 2006). Более того, выделяемые ризобиями ЭПС способствуют плавному росту корневой системы растений, благодаря тому, что выполняют функцию смазочных веществ. Были получены аналогичные результаты и для штаммов *R. leguminosarum*. Так, например, было показано, что инокуляция проростков риса штаммом *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ведет к значительному ростостимулирующему действию данных ризобий на корень проростков риса за счет синтеза ими гиббереллина (Yanni et al., 2001). Обработка проростков салата-латука *R. leguminosarum* привела к увеличению корня опытных растений. Авторами было показано, что ростостимулирующее действие

ризобактерии оказывали, благодаря синтезу ими индол-3-уксусной кислоты (Noel et al., 1996). Она же оказывала схожий эффект и на корни хлопка при инокуляции проростков штаммом *R. leguminosarum* bv. *trifolii* E11 (Hafeez et al., 2005). Таким образом, было показано, что инокуляция растений штаммами: *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* Pvu5+RapA1, *R. leguminosarum* VSy12 (2008), *R. leguminosarum* LSy10 (D17), *R. leguminosarum* THy1, *R. galegae* 0702, *R. leguminosarum* TPr3 (2004), *P. aureofaciens* ИБ51 «Елена», *P. aureofaciens* ИБ51 «Елена»+RapA1 ведет к увеличению длины корней проростков салата латука, репы, козлятника восточного, огурца обыкновенного и клевера красного

3.5.3. Влияние ризобияльных штаммов на длину гипокотилей проростков семян козлятника восточного, огурца обыкновенного и клевера красного

Далее нами был проанализирован ростостимулирующий эффект, который оказывают исследуемые нами штаммы ризобий и псевдомонад на длину гипокотилей растений. Так, было показано, что штаммы оказывают положительное влияние на рост и развитие растений, однако в случае штамма *R. leguminosarum* im VSy12 (2008) такого воздействия мы не наблюдали (рис. 52). Максимальный эффект на длину гипокотилей клевера красного оказали штаммы *R. leguminosarum* Pvu5 (0,88 см.) и *R. leguminosarum* Pvu5+RapA1 (0,9 см.), в то время как, показатель необработанных ризобиями растений – 0,59 см. Гипокотили опытных растений в данных случаях были длиннее контрольных на 50% и 54% соответственно. Применение штаммов *R. galegae* 0702 и *R. leguminosarum* LSy10 (D17) при обработке семян также увеличивало длину гипокотилей растений красного клевера (на 36 и 28 процентов соответственно).

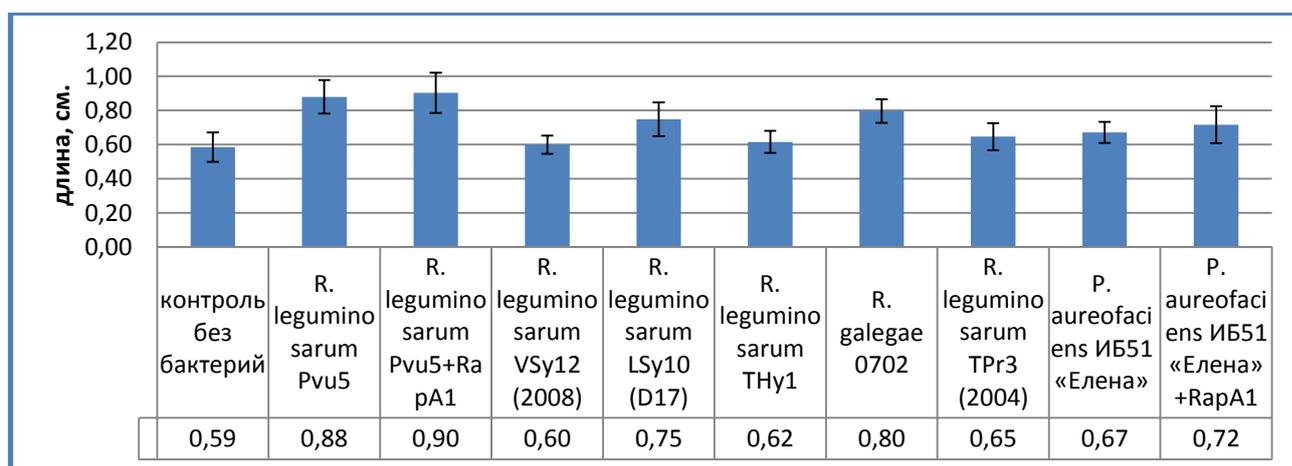


Рисунок 52. Средняя длина hypocotилей опытных и контрольных растений клевера красного.

Опыты, в которых мы измеряли длину hypocotилей козлятника восточного, показали, что все штаммы в большей или меньшей степени оказывают ростостимулирующее действие на растения (длина hypocotилей опытных проростков была на 7-58% больше длины hypocotилей контрольных растений) (рис. 53). Максимальное воздействие оказал штамм *R. leguminosarum* LSy10 (D17) (длина hypocotилей опытных проростков была на 58% больше контрольных значений). На втором и третьем месте были штаммы *R. galegae* 0702+RapA1 и *R. leguminosarum* TPr3 (2004)+RapA1, разница показателей по сравнению с необработанными бактериями растениями составила 49% и 47%.

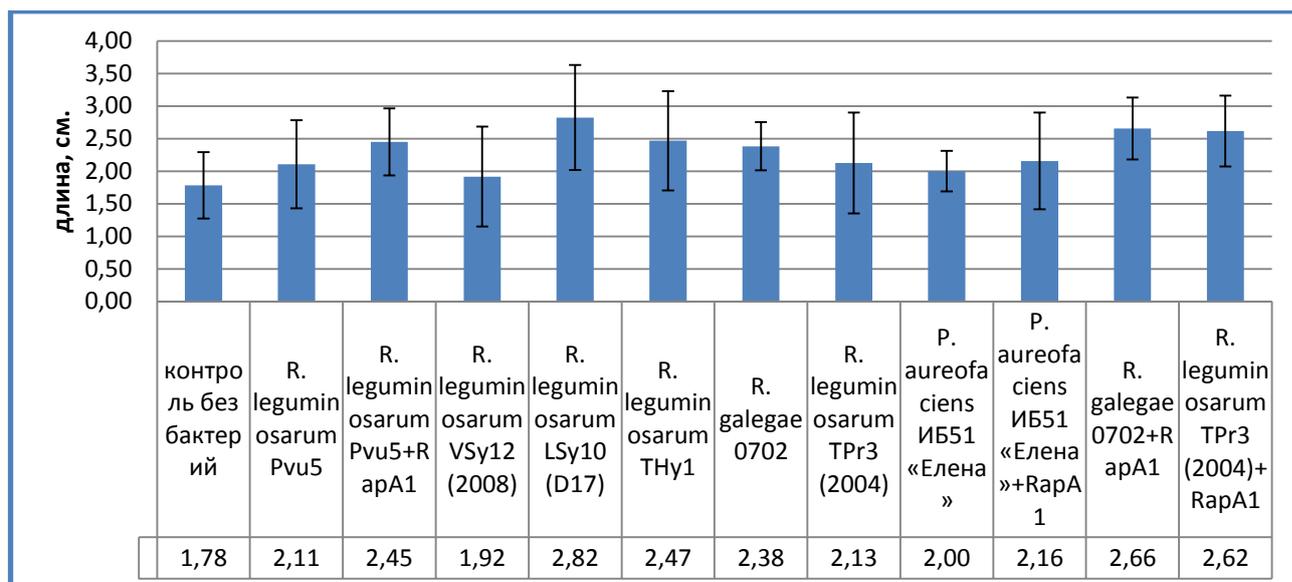


Рисунок 53. Средняя длина hypocotилей опытных и контрольных растений козлятника восточного.

Показатели длины гипокотилей проростков огурца обыкновенного, инокулированных ризобиями, синтезирующими экзополисахариды, были выше по сравнению с контролем, в том числе и обработанные *R. galegae* 0702 (на 19%) (рис. 54). Опытные проростки были длиннее контрольных на 18–75 процента, в зависимости от того каким штаммом было обработано растение. Максимальные значения мы отметили у штаммов *P. aureofaciens* ИБ51 «Елена»+RapA1 (75%) и *R. leguminosarum* Pvu5+RapA1 (70%), а также у *R. leguminosarum* Pvu5 (68%). Однако штамм *R. leguminosarum* THy1 ростостимулирующего эффекта на растения не оказал.

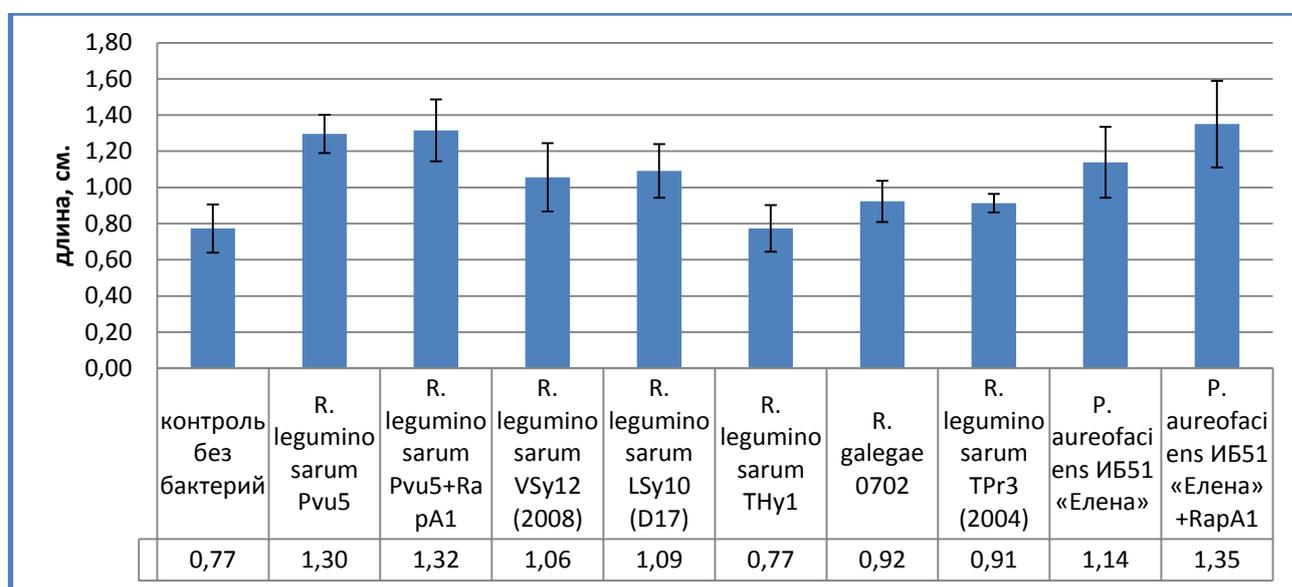


Рисунок 54. Средняя длина гипокотилей опытных и контрольных растений огурца обыкновенного.

Биосинтез исследуемыми штаммами различных активирующих симбиоз химических соединений, в том числе и экзополисахаридов, мог быть причиной того, что ризобиальные штаммы более эффективно взаимодействовали как с бобовыми, так и с небобовыми растениями, способствуя их росту и всхожести.

Существует множество работ, посвященных изучению влияния ризобактерий на длину гипокотилей проростков растений, показывающих, что ризобии способны выделять гормоны стимулирующие рост растений: индол-3-уксусную кислоту, цитокинины и гиббереллины (Pathania et al., 2020, Zahir et al., 2004; Khalid et al., 2006).

3.5.4. Ростостимулирующий эффект ризобияльных штаммов на высоту стебля, а также ширину и длину большего листа на побеге, на примере растений огурца обыкновенного

В данном опыте мы проводили анализ высоты стебля, длины и ширины самого большого листа на побеге по сравнению с контрольными растениями. Спустя неделю после инокуляции растений штаммами псевдомонад и ризобий, оценивали ростостимулирующий эффект. Наивысшие параметры роста показали растения, обработанные штаммом *R. leguminosarum* VSy12, они были выше контрольной группы на 70% (145,3 см. против 85,7 см.), а на 48% выше контрольных были растения, инокулированные штаммом *R. leguminosarum* TPr3 (2004) (127 см.) (рис. 55). В отношении растений обработанных штаммами псевдомонад, мы также отметили высокий рост растений, показатели *P. aureofaciens* ИБ51 «Елена» были больше контрольных на 11%, а *P. aureofaciens* ИБ51 «Елена»+RapA1 на 19%. Остальные штаммы значительного воздействия не оказали, но и отрицательного эффекта в их случае также нет.

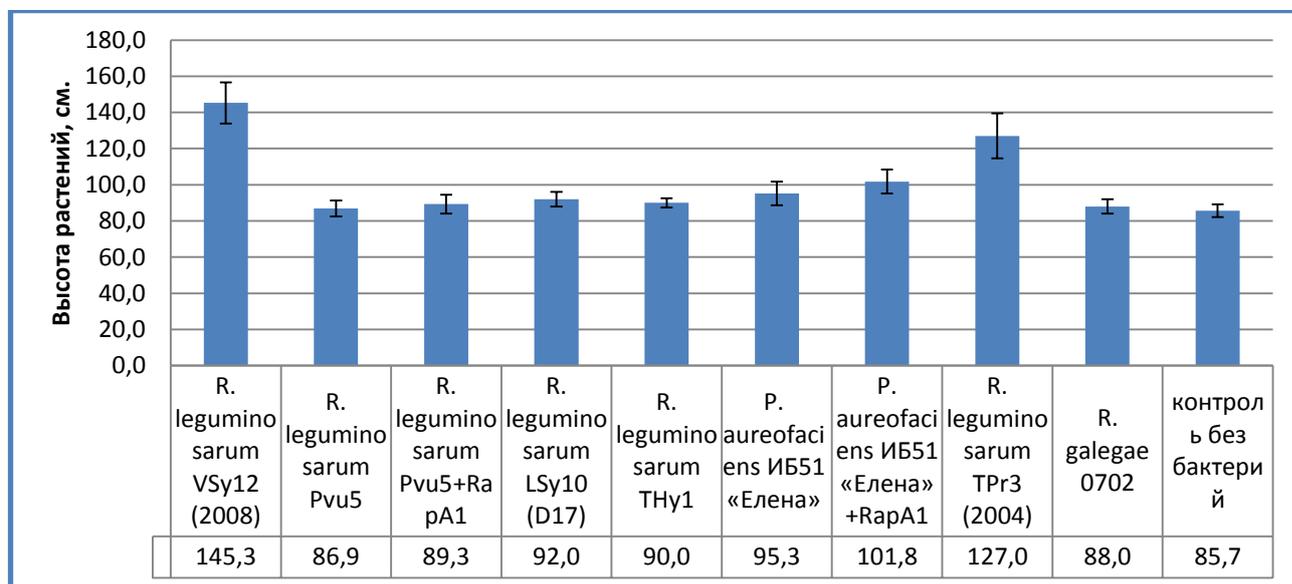


Рисунок 55. Высота стебля экспериментальных и контрольных растений огурца обыкновенного.

Полученные результаты могут быть связаны с тем, что ризобактерии *R. leguminosarum* VSy12 эффективнее прикрепляются к корням огурца обыкновенного и образуют на их поверхности, как уже было показано ранее на

примере растений томата, биопленки. А ростостимулирующий эффект, возможно, обеспечивается за счет синтеза индол-3-уксусной и/или гибберелловой кислот, а также экзополисахаридов, аналогично результатам, полученным в исследованиях, посвященных изучению влияния ризобий на рост стебля в высоту. Например, при измерении высоты стебля риса, инокулированного штаммом *R. leguminosarum* E11 (Dazzo et al., 2000), а также в работе (Yanni et al., 2001), где растения риса, обрабатывали *R. leguminosarum* bv. *trifolii* и наблюдали увеличение побегов растения, ввиду действия индол-3-уксусной кислоты. Также положительный ростостимулирующий эффект мог быть связан и с синтезом гиббереллинов (Chi et al., 2005). Существуют работы доказывающие, что *R. leguminosarum* способны синтезировать одновременно индол-3-уксусную кислоту и гибберелловую кислоту. Так, обработка пшеницы *R. leguminosarum* Thal 8 значительно увеличила рост стебля пшеницы по сравнению с контрольными растениями, авторы доказали, что причиной этому было выделение *R. leguminosarum* Thal 8, индол-3-уксусной и гибберелловой кислот (Afzal et al., 2008). Также на изменение высоты стебля обработанных растений могут оказывать влияние и экзополисахариды. Показано, что после инокуляции *Rhizobium* YAS34 растения подсолнечника значительно выросли по сравнению с контрольными. Данный эффект был вызван тем, что ризобии синтезировали экзополисахариды (Alami et al., 2000).

Оценка ширины наибольшего листа на стебле показала, что лишь в отношении штамма *R. leguminosarum* TPr3 (2004), не наблюдается воздействия на этот ростовой параметр (рис. 56). Значительный эффект на этот показатель вновь оказал штамм *R. leguminosarum* VSy12 (ширина листа опытных растений была 18 см., что на 38% больше показателя контрольной группы – 13 см.), а максимальный показатель, мы отметили у растений, инокулированных штаммом и *R. leguminosarum* Pvu5+RapA1 (18,5 см. – больше контрольного показателя на 42%). Также высокие значения ширины листа наблюдались в случае штамма *R. leguminosarum* LSy10 (D17) (21%), а также у *R. galegae* 0702 (16%).

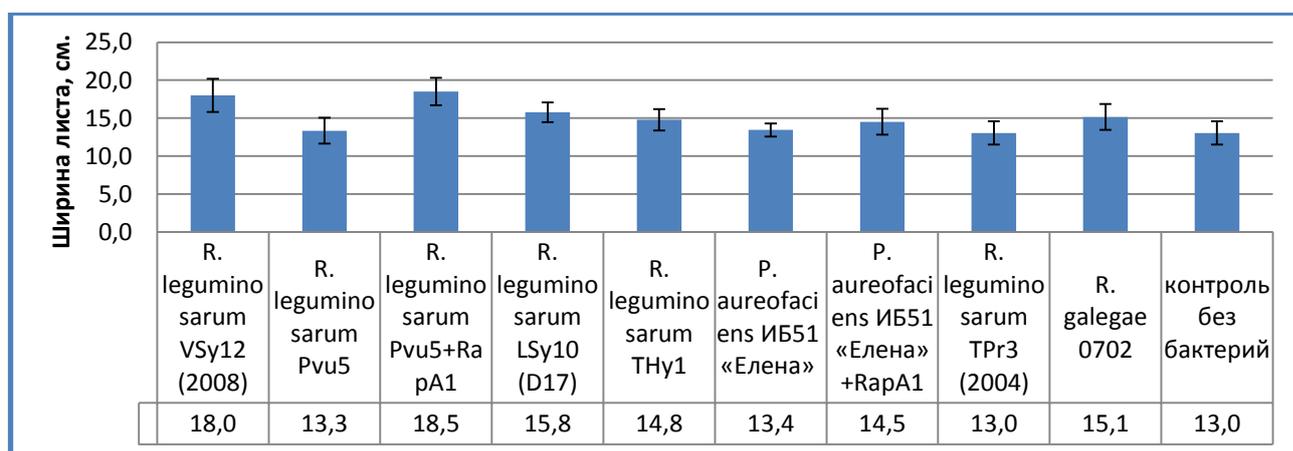


Рисунок 56. Ширина самого большого на стебле листа экспериментальных и контрольных растений огурца обыкновенного.

В опытах по инокуляции контрольных и опытных групп растений огурца исследуемыми штаммами ризобий и дальнейшего измерения длины листа, нами было отмечено, что, как и в случае ширины, штаммы *R. leguminosarum* VSy12 и *R. leguminosarum* Pvu5+RapA1 наибольшим образом увеличивают этот ростовой параметр - 15,2 см. и 15 см., в то время как, в случае контрольных растений длина самого большого листа составила 9,5 см., что на 61% и 59%, соответственно, меньше) (рис. 57). При этом ростостимулирующий эффект (от 9 до 26%) оказали и другие штаммы.

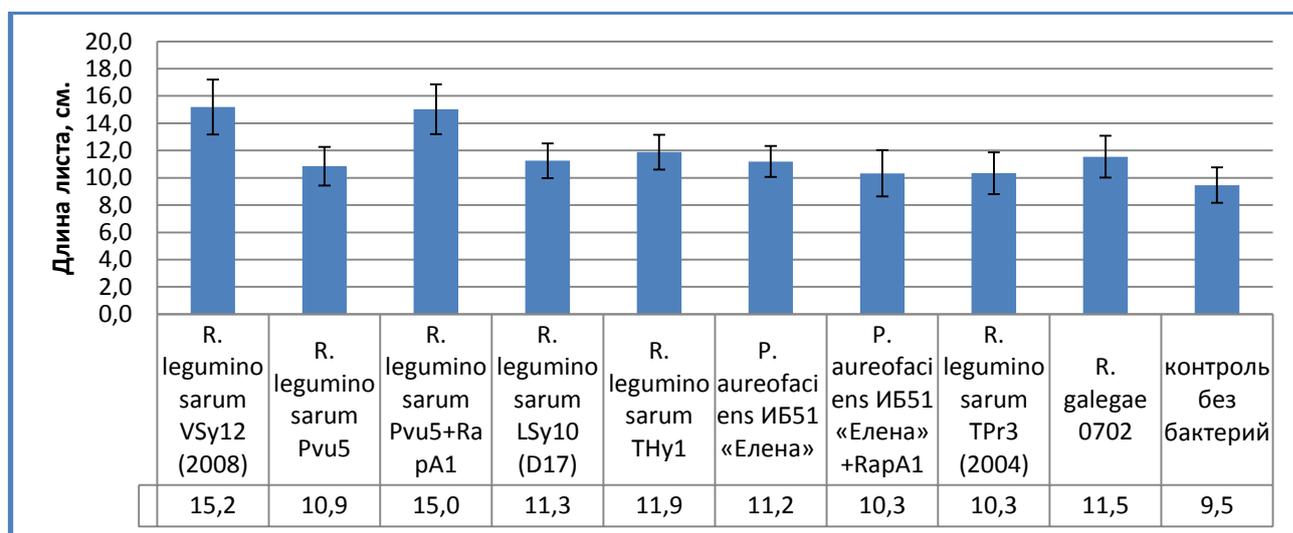


Рисунок 57. Длина самого большого на стебле листа экспериментальных и контрольных растений огурца обыкновенного.

Применение ризобияльных штаммов, синтезирующих экзополисахариды, как и в случае применения биопрепарата «Елена», ведет к увеличению размеров

листа (длины и ширины). Штамм *R. galegae* 0702 также оказывает положительное воздействие на эти параметры.

Следовательно, обработка опытных и контрольных растений огурца обыкновенного штаммами *R. leguminosarum*, у которых были идентифицированы гены, регулирующие биосинтез экзополисахаридов (*pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*) приводит к росту стебля в высоту, а также увеличению размеров листьев. Это указывает на то, что данные штаммы входят в группу PGPR. Кроме того, исследуемые ризобии оказывают положительное влияние и на небобовые растения в ассоциативном симбиозе. Кроме того, на примере штамма *R. leguminosarum* Pvu5+RapA1, нами было показано, что наличие гена *rapA1* в ризобиальном геноме способствует созданию ассоциативных взаимодействий между ризобиями и небобовыми растениями, положительно влияя на рост и развитие таких растений (Лавина и соавт., 2016; Хакимова и соавт. 2016, 2017, Вершинина и соавт., 2019).

Выявленные результаты аналогичны тем, что были получены при изучении влияния ризобий на небобовые растения. В работе Reitz et al. (2000) было показано положительное влияние ризобий на рост картофеля, при обработке его *R. etli* G12. Humphry et al. (2007) при изучении влияния ризобий выявил, что инокуляция ячменя штаммами *R. radiobacter* NCIMB 9042 и NCIMB 13307 усиливала рост побегов растения. Рядом авторов при изучении влияния различных штаммов *R. leguminosarum* на небобовые растения также был показан их ростостимулирующий эффект: Chabot et al. (1996a) при инокуляции кукурузы и салата-латука использовали штамм *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* P31; Dazzo et al. (2000) и Mishra et al. (2006) при обработке риса штаммами *R. leguminosarum* E11, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* RRE6 и *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843; Afzal et al. (2008) при изучении ростостимулирующего эффекта *R. leguminosarum* на растения пшеницы, обработанных штаммом *R. leguminosarum* Thal 8.

Образование биопленок помогает ризобиям поддерживать плотность клеток в течение достаточно длительного времени до момента взаимодействия с растением-хозяином. При этом, в отсутствии макросимбионта, ризобии способны

прикрепляться к корням и других небобовых растений и колонизировать их, позволяя данным клубеньковым бактериям поглощать питательные вещества и выживать в этой защищенной нише. В естественных условиях сложно контролировать такие ассоциативные процессы, так как ризосферные бактерии с полезными признаками часто вытесняются более агрессивными бактериями, зачастую обладающими фитопатогенными свойствами. Однако синтез ризобактериями ЭПС, способствует формированию биопленок, что в свою очередь влияет на колонизацию корней небобовых растений. Так, например, в работах Santaella и соавт. (2008) для изучения функции ЭПС при колонизации и образовании биопленок на корнях небобовых растений (резуховидка Таля и рапс) был использован штамм *Rhizobium* sp. YAS34, ЭПС которого, внесли свой вклад в колонизацию определенных зон, в зависимости от доступности питательных веществ. Проведенные нами опыты по инокуляции растений штаммами ризобий, синтезирующими модификаторы механизмов формирования биопленок на поверхности корней, показали, что использование штаммов, образующих биопленки в качестве биопрепаратов, повышает всхожесть семян и положительно влияет на ростовые параметры как бобовых, так и небобовых растений. Данный факт указывает на целесообразность использования образующих биопленки ризобиальных штаммов в качестве биопрепаратов стимулирующих рост растений и их защиту от фитопатогенов.

Исследуемые ризобиальные штаммы способны к образованию биопленок в ассоциативных симбиотических системах, обладают высокой конкурентоспособностью и ростостимулирующим эффектом на бобовые и небобовые растения, который заключается в синтезе фитогормонов, фиксации атмосферного азота, улучшении минерального питания растений, а также защите растений от патогенов. Таким образом, являясь PGPR, исследуемые штаммы, могут найти широкое применение в сельском хозяйстве в качестве биопрепарата, который повышает всхожесть семян растений, а также способствует их росту и развитию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Новым перспективным направлением в биоинженерии симбиотических систем, является создание искусственных симбиотических ассоциаций важных сельскохозяйственных растений с ризосферными микроорганизмами. В частности, при изучении ассоциативных симбиозов большое внимание уделяется исследованию ризобактерий как представителю группы PGPR. Связано это с ростостимулирующим эффектом, оказываемым ризобиями как на бобовые, так и на небобовые растения, который заключается в синтезе экзополисахаридов и фитогормонов, фиксации атмосферного азота, улучшении минерального питания растений, а также защите их от патогенов. Кроме того, использование ассоциативных симбиотических систем исключает нанесение негативного воздействия на окружающую среду. Однако подобные ассоциативные симбиозы не устойчивы, и нуждаются в улучшении. Так как ассоциативные процессы сложно контролируемы, и в естественных условиях ризобии, из-за их недостаточной выживаемости и низкой конкурентоспособности по сравнению с хорошо адаптированными местными штаммами микроорганизмов, не выдерживают конкуренции и вытесняются более агрессивными бактериями, зачастую обладающими фитопатогенными свойствами. Для решения данной проблемы, применяются различные способы, в том числе и создание эффективных биопленочных биоудобрений, использование которых может служить альтернативой химическим препаратам. Более того, их применение способствует росту и развитию как бобовых, так и небобовых культур экологически безопасным образом, а также обеспечивает устойчивость искусственных симбиотических систем. Потому как биопленки, ассоциированные с растениями, обладают способностью защищать себя от внешнего стресса и микробной конкуренции, характерной для ризосферы. Ввиду этого, целью данного исследования являлось изучение молекулярных механизмов инициации и формирования биопленок ризосферными бактериями на поверхности корней растений в ассоциативных симбиозах путем использования в качестве

модификаторов данных процессов генов-регуляторов путей синтеза экзополисахаридов ризобактерий.

Для изучения влияния экспрессии исследуемых генов на синтез ЭПС и выживаемость ризобий в целом, нами был проведен скрининг 114 штаммов *R. leguminosarum* и 3 штаммов *R. galegae* из коллекции микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН на предмет наличия в их геноме генов регулирующих биосинтез ЭПС (*pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*). Так, были обнаружены 10 штаммов *R. leguminosarum*, у которых были идентифицированы исследуемые нами гены, участвующие в биосинтезе ЭПС. У данных штаммов наблюдалось большее ослизнение клеточных стенок, по сравнению с другими ризобиальными штаммами, что указывает на их большую выработку ЭПС и, как следствие, указывает на повышение конкурентоспособности штаммов в ризосфере.

Для выполнения поставленной цели, были также получены и трансформированные штаммы ризобий. Рекомбинантные штаммы, в геноме которых содержалась дополнительная копия гена *pssA* или *rosR*, в большинстве случаев, характеризовались большей наработкой ЭПС, что выражалось в большем ослизнении клеточных стенок азотфиксирующих бактерий по сравнению с дикими исходными штаммами. В случае рекомбинантных по гену *pssB* штаммов мы наблюдали обратный эффект. Данные штаммы были трансформированы с помощью векторных конструкций на основе плазмид широкого круга хозяев. Полученные нами плазмиды содержали гены, регулирующие биосинтез ЭПС под управлением индуцибельных промоторов, так как интенсивная транскрипция целевых генов в векторных конструкциях под управлением конститутивных промоторов может способствовать утрате данного вектора и останавливать рост бактерий. Для того чтобы изучить работу генов, участвующих в биосинтезе ЭПС в искусственных симбиотических системах, где колонизация корней растений имеет первостепенное значение, и продемонстрировать их действие на образование биопленок ризобактериями, нами также был получен и вектор pJB658GFP, содержащий маркерный ген флуоресцентного белка GFP. Более того, на примере ризобиальных штаммов, трансформированных конструкцией

pJB658GFP *RosR*, нами было выявлено, что показатели уровня экспрессии гена *rosR* в трансформированных штаммах были значительно выше показателей уровня экспрессии исследуемого гена зафиксированных для контрольного штамма. При этом значения показателей уровня экспрессии гена *rosR*, при индукции индуцибельного промотора *Pm*, также становились в несколько раз выше контрольного значения.

Ризобияльные штаммы образуют биопленки со сложной трехмерной архитектурой на абиотических поверхностях, и окрашивание данной биопленки обеспечивает визуализацию ее экзополисахаридной матрицы. Микроскопированные нами рекомбинантные штаммы ризобий не в каждом случае формировали более сложные архитектурные структуры биопленок по сравнению с дикими штаммами. Нами было показано, что наличие в геноме штаммов *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12, *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4 дополнительной копии гена *pssA* или *rosR* положительно влияет на эффективность образования биопленок. Напротив, трансформация геном *pssB*, в 2 раза уменьшала толщину биопленок. В случае штамма *R. galegae* 0702 значимых различий в биопленкообразовании между рекомбинантными и контрольными штаммами мы не выявили. Флуоресцентная микроскопия биопленок, образованных исследуемыми ризобиями, мечеными белком GFP, подтвердила полученные результаты.

При этом проведенный анализ числа живых клеток от времени, при росте культур на несменяемой среде, выявил, что высокие показатели числа живых клеток от времени, не всегда указывали на способность штаммов к быстрому образованию зрелой биопленки. Также мы исследовали на предмет биопленкообразования и штаммы, содержащие в геноме ген *rapA1*. Экспрессия белка RapA1, который кроме свойств адгезина, имеет также и агглютинирующую способность, оказала значительное положительное влияние на процессы биопленкообразования на инертных поверхностях.

Тем не менее, картина, которую мы можем наблюдать на модели образования биопленок на инертных поверхностях, не всегда может быть

перенесена на модель формирования биопленок на поверхности корней, которая представляет собой среду богатую питательными веществами. Ввиду этого, нами были проведены исследования возможности биопленкообразования рекомбинантными ризобияльными штаммами на поверхности корней бобовых и небобовых растений, на примере контрольных и трансформированных конструкцией pJBGFP658 *RosR* штаммов. Так было показано, что наличие дополнительной копии гена *rosR* не оказывает существенного влияния на бобовые и небобовые растения, а также на образование клубеньков на корнях симбиотрофного растения клевера лугового. Однако эксперименты по совместному культивированию трансформированных штаммов и растений рапса, томата и клевера, продемонстрировали, что в случае обработки растений опытными штаммами, наблюдается увеличение количества адгезированных клеток ризобактерий на поверхности корней по сравнению с контрольными штаммами. Более того, на примере корней томата, мы показали, что трансформированные штаммы способны образовывать зрелые биопленки на биотических поверхностях, причем, их локализация зависела от того, каким штаммом была инфицирована корневая система.

Биопленкообразование представляет собой стратегию выживания ризобий и различные факторы окружающей среды в той или иной степени влиянию на эту способность. Нами была выявлена корреляция между концентрацией Ca^{2+} в культуральной среде и толщиной биопленок – чем выше была концентрация Ca^{2+} в среде, тем толще становились биопленки. В нашей работе показано, что на процессы биопленкообразования оказывает воздействие и температурный режим – как контрольные, так и трансформированные бактерии эффективно образовывали биопленки при температуре 28°C. При культивировании ризобий при более низкой температуре (18°C), способность штаммов формировать биопленки снижалась более чем в 2 раза. При повышении температуры до 38°C статистически значимых различий в эффективности формирования биопленок по сравнению со штаммами, культивированными при 28 °C, зафиксировано не было. Кроме того, в минимальной среде ризобии формировали биопленки толще тех,

что были образованы в богатых питательными веществами средах. Таким образом, было показано, что концентрация кальция в культуральной среде положительно коррелирует с образованием биопленок, в то время как низкие температуры и доступность питательных веществ дают отрицательный эффект.

Ризобии способны синтезировать различное количество ЭПС, и, чем выше этот показатель, тем выше их конкурентоспособность по сравнению с другими штаммами ризосферы. Инокуляция растений штаммами ризобий, синтезирующими экзополисахариды значительно увеличивает всхожесть семян и рост проростков небобовых растений. Для того чтобы оценить ростостимулирующий эффект штаммов синтезирующих синтезирующих регуляторы формирования биопленок, нами была создана коллекция генетически охарактеризованных штаммов ризосферных бактерий, обладающих ростостимулирующей активностью. Проведенные нами опыты по изучению ростостимулирующего эффекта штаммов, входящих в созданную коллекцию, на растения: салата латука, репы, козлятника восточного, огурца обыкновенного и клевера красного, показали, что обработка этих растений исследуемыми штаммами, приводит к улучшению ростовых параметров бобовых и небобовых растений. Таким образом, было выявлено, что штаммы, которые входят в коллекцию генетически охарактеризованных штаммов ризосферных бактерий представляют собой PGPR и могут найти широкое применение в сельском хозяйстве в качестве эффективных биопленочных биоудобрений. Применение такого биопрепарата, который повышает всхожесть семян растений, способствует их росту и развитию, а также обладает высокой конкурентоспособностью и выживаемостью в ризосфере, целесообразно использовать и в искусственных симбиотических системах.

Следовательно, полученные результаты подтверждают, что гены-регуляторы биосинтеза ЭПС ризобактерий оказывают влияние на процессы биопленкообразования как на инертных поверхностях, так и на корнях растений.

Таким образом, доказано, что применение подхода, основанного на модификации процессов инициации и формирования биопленок ризобиями,

путем использования генов-регуляторов биосинтеза ЭПС ризобий – является перспективным направлением создания стабильных ассоциаций экономически ценных видов растений с ризобиями.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенного скрининга штаммов *R. leguminosarum* было выявлено 10 штаммов, в которых идентифицировались гены *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*, участвующие в биосинтезе экзополисахаридов и 19 штаммов, в которых не было обнаружено ни одного исследуемого гена. Штаммы *R. leguminosarum*, в геноме которых отсутствовали исследуемые гены характеризовались скудным ослизнением клеточных стенок по сравнению со штаммами с идентифицированными генами.

2. С использованием векторных конструкций pJB658GFP PssA, pJB658GFP RosR и pJB658+pssB, содержащих гены, регулирующие биосинтез ЭПС (*pssA*, *pssB* и *rosR*) под управлением индуцибельного промотора Pm, были получены 12 рекомбинантных по генам *pssA* и *rosR* ризобияльных штаммов, меченных флуоресцентным белком GFP, а также 5 штаммов рекомбинантных по гену *pssB*.

3. Микроскопические исследования структур, образованных ризобияльными штаммами на инертных поверхностях и корнях растений, показали, что наличие в геноме штаммов *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12, *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4 дополнительной копии гена *pssA* или *rosR* положительно влияет на эффективность образования биопленок. Напротив, трансформация исследуемых штаммов генно-инженерной конструкцией pJB658+pssB уменьшает толщину биопленок.

4. Обнаружено, что инокуляция растений ризобияльными штаммами трансформированными конструкцией pJBGFP658 RosR приводит к увеличению количества адгезированных клеток ризобактерий на поверхности корней томата по сравнению с контрольными штаммами.

5. Выявлена корреляция между концентрацией Ca^{2+} , питательных веществ в культуральной среде, а также температурным режимом и толщиной биопленок.

6. Показано, что инокуляция растений салата латука, репы, козлятника восточного, огурца обыкновенного и клевера красного ризосферными штаммами, трансформированными генами-модификаторами механизмов формирования биопленок на поверхности корней, приводит к увеличению показателя всхожести семян, длины корней и гипокотилей проростков этих растений. Кроме того, на примере растений огурца обыкновенного, обнаружено, что применение ризобиальных штаммов, синтезирующих ЭПС, при обработке растений, положительно влияет на параметры высоты стебля, а также длины и ширины большего листа на побеге.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белимов, А.А. АЦК-деаминаза и растительно-микробные взаимодействия (Обзор) / А.А. Белимов, В.И. Сафронова // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 3. – С. 23-29.
2. Благова, Д.К. Создание новых ассоциативных симбиозов между томатом и ризобиями / Д.К. Благова, З.Р. Вершинина, А.М. Оркодашвили, Ал.Х. Баймиев // Вестник БГАУ. – 2013. – Т. 26. – № 2. – С. 7-10.
3. Вершинина, З.Р. Взаимодействие томатов (*Solanum lycopersicum* L.), трансформированных *rapA* 1, с бактериями *Pseudomonas* sp. 102, устойчивыми к высоким концентрациям кадмия, как основа эффективной симбиотической системы для фиторемедиации / З.Р. Вершинина, Л.Р. Хакимова, А.М. Лавина, Л.Р. Каримова, В.В. Федяев, Ан.Х. Баймиев, А.Х. Баймиев // Биотехнология. – 2019b. – Т. 35. – № 2. – С. 38-48.
4. Вершинина, З.Р. Влияние конститутивной экспрессии гена *garA1* на образование бактериальных биопленок и ростостимулирующую активность ризобий / З.Р. Вершинина, Л.Р. Хакимова, А.М. Лавина, Л.Р. Каримова, Э.Р. Сербаева, В.И. Сафронова, А.Х. Баймиев // Микробиология. – 2019a. – Т. 88. – № 1. – С. 62-71.
5. Вершинина, З.Р. Влияние сверхэкспрессии гена *rosR* на образование биопленок бактериями *Rhizobium leguminosarum* / З.Р. Вершинина, О.В. Чубукова, Ю.М. Никоноров, Л.Р. Хакимова, А.М. Лавина, Л.Р. Каримова, Ан.Х. Баймиев, А.Х. Баймиев // Микробиология. – 2021. – Т. 90. – № 2. – С. 191-203.
6. Вершинина, З.Р. Клубеньковые бактерии в искусственных симбиозах / З.Р. Вершинина, Э.Р. Сербаева, Л.Р. Садыкова Л.Р. Хакимова, А.М. Лавина, З.Р. Вершинина, А.Х. Баймиев // Биомика. – 2017b. – Т. 9. – № 4. – С. 356-363.
7. Вершинина, З.Р. Ризобии в фиторемедиации / З.Р. Вершинина, Л.Р. Хакимова, Э.Р. Сербаева, А.Х. Баймиев // Актуальная биотехнология. – 2017. – № 2(21). – С. 111a-112.

8. Вершинина, З.Р. Участие генов PSSA, PSSB и ROSR в образовании биопленок ризобиями / З.Р. Вершинина, Л.Р. Хакимова, А.М. Лавина, Л.Р. Каримова, А.Х. Баймиев // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии: Сборник тезисов докладов 19-ой Всероссийской конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева, Москва, 15–16 апреля 2019 года / Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии». – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 2019с. – С. 205.

9. Вершинина, З.Р. Экзополисахариды *Rhizobium leguminosarum* - краткий обзор / З.Р. Вершинина, А.М. Лавина, О.В. Чубукова // Биомика. – 2020. – Т. 12. – № 1. – С. 27-49.

10. Гончар, Ю.О. Новий бактеріальний препарат ризобразин для підвищення врожайності шовковиці / Ю.О. Гончар, О.В. Надкернична, Н. О. Олексійченко // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2007. – № 5. – С. 86-95.

11. Ковальская, Н.Ю. Формирование искусственного азотфиксирующего симбиоза у растений рапса (*Brassica napus var. napus*) в нестерильной почве / Н.Ю. Ковальская, Е.С. Лобакова, М.М. Умаров // Микробиология. – 2001. – Т. 50. – № 5. – С. 701-708.

12. Коць, С.Я. Фізіолого-біохімічні особливості живлення рослин біологічним азотом / С.Я. Коць, С.М. Маліченко, О.Д. Кругова та ін. – К.: Логос, 2001. – 271 с.

13. Ксензенко В.Н. и др. ген *pssA* кодирует udp-глюкоза: полипренилфосфат глюкозилфосфотрансферазу, иницирующую процесс биосинтеза экзополисахарида у *Rhizobium leguminosarum* / В.Н. Ксензенко, Т.В. Ивашина, З.А. Дубейковская, С.Г. Иванов, М.Б. Наназашвили, Т.Н. Дружинина, В.Н. Шibaев // Биоорганическая химия. – 2007. – Т. 33. – №. 1. – С. 160-166.

14. Лавина, А.М. Создание ассоциативных симбиотических систем огурца с ризобиями / А.М. Лавина, Л.Р. Нигматуллина, З.Р. Вершинина, А.Х. Баймиев // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. – 2014. – № 3. – С. 8.

15. Лавина, А.М. Анализ влияния ризобиальных экзополисахаридов на семена и проростки клевера красного (*Trifolium pratense*) / А.М. Лавина, Л.Р. Нигматуллина, З.Р. Вершинина, А.Х. Баймиев // Вестник защиты растений. – 2016а. – № 3(89). – С. 91-93.

16. Лавина, А.М. Создание векторной конструкции, содержащей ген *pssB*, участвующий в синтезе экзополисахаридов в *Rhizobium leguminosarum* / А.М. Лавина, Л.Р. Нигматуллина, Э.Р. Сербаетова, З.Р. Вершинина, А.Х. Баймиев // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой : материалы VIII Всероссийской конференции молодых ученых, Саратов, 26–30 сентября 2016 года / ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Учебно-научный центр физико-химической биологии СГУ и ИБФРМ РАН. – Саратов: ООО "Ракурс", 2016б. – С. 24.

17. Лавина, А.М. Получение рекомбинантных по генам *pssA* и *rosR* ризобиальных штаммов, меченных флуоресцентным белком GFP / А.М. Лавина, Л.Р. Хакимова, Р.Т. Матниязов, З.Р. Вершинина, А.Х. Баймиев // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2017. – № 9(209). – С. 76-81.

18. Лавина, А.М. Влияние повышенной экспрессии генов *rapA1*, *pssA* и *rosR* на формирование биопленок ризобиями / А.М. Лавина, О.В. Чубукова, З.Р. Вершинина // VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы : Сборник тезисов Международного Конгресса, Санкт-Петербург, 18–22 июня 2019 года. – Санкт-Петербург: ООО "Издательство ВВМ", 2019. – С. 1097.

19. Лобанов А.Н., Полюдова Т. В. Продукция экзополисахаридов бактериями *Rhizobium leguminosarum* при периодическом культивировании //Биомика. – 2020. – Т. 12. – №. 2. – С. 224-231.

20. Нигматуллина, Л.Р. Вклад бактериального адгезина *rapA1* в эффективность формирования симбиоза *Rhizobium leguminosarum* с растениями фасоли / Л.Р. Нигматуллина, А.М. Лавина, З.Р. Вершинина, А.Х. Баймиев // Микробиология. – 2015. – Т. 84. – № 6. – С. 705.
21. Тец, В.В. Микробные биопленки проблемы антибиотикотерапии / В.В. Тец, Г.В. Тец // Практическая пульмонология. – 2013. – № 4.
22. Тихонович, И.А. Микробиологические аспекты плодородия почвы и проблемы устойчивого земледелия / И.А. Тихонович, Ю.В. Круглов // Плодородие. – 2006. – № 5. – С. 9-12.
23. Хакимова, Л.Р. Использование штаммов-продуцентов адгезина *RapA1* из *Rhizobium leguminosarum* для создания бинарных биоудобрений / Л.Р. Хакимова, А.М. Лавина, З.Р. Вершинина, А.Х. Баймиев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017а. – Т. 53. – № 4. – С. 400-405.
24. Хакимова, Л. Р. Оценка влияния конститутивной экспрессии гена *rapA1* в клетках микросимбионта *R. leguminosarum* PVu5 на эффективность образования клубеньков, нитрогеназную активность, биомассу и ростовые параметры растений фасоли обыкновенной / Л.Р. Нигматуллина, А.М. Лавина, Э.Р. Сербаева, Вершинина, А.Х. Баймиев // Вестник защиты растений. – 2016. – № 3(89). – С. 118-119.
25. Хакимова, Л.Р. Роль бактериальных адгезинов и других компонентов клеток на начальных этапах растительно-микробных взаимодействий / Л.Р. Хакимова, А.М. Лавина, Э.Р. Сербаева, Л.Р. Садыкова, З.Р. Вершинина, А.Х. Баймиев // Биомика. – 2017d. – Т. 9. – № 4. – С. 325-339.
26. Хакимова, Л.Р. Ростостимулирующая активность клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum*, выделенных из бобовых растений Южного Урала / Л.Р. Хакимова, Э.Р. Сербаева, А.М. Лавина, З.Р. Вершинина, А.Х. Баймиев // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2017с. – № 9(209). – С. 96-99.
27. Хакимова, Л.Р. Ростостимулирующие бактерии для экологически ориентированного растениеводства / Л.Р. Хакимова, Э.Р. Сербаева, А.М. Лавина,

З.Р. Вершинина, А.Х. Баймиев //Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты : Научная конференция и школа молодых ученых, Крым, Судак, 18–24 сентября 2017 года / Ответственный редактор В.В. Кузнецов. – Крым, Судак: АНО "Центр содействия научной, образовательной и просветительской деятельности "Соцветие", 2017б. – С. 344.

28. Цыганова, А.В. Роль поверхностных компонентов ризобий в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями / А.В. Цыганова, В.Е. Цыганов //Успехи современной биологии. – 2012. – Т. 132. – №2. – С. 211-222.

29. Adesemoye, A. Evaluating *Pseudomonas aeruginosa* as plant growth-promoting rhizobacteria in West Africa / A. Adesemoye, E. Ugoji // Arch Phytopathol Plant Prot. – 2009. – V.42. – P. 188-200.

30. Afzal, A.J. Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense / A.J. Afzal, A.J. Wood, D.A. Lightfoot //Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2008. – Т. 21. – №. 5. – С. 507-517.

31. Ahmad, F. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities / F. Ahmad, I. Ahmad, M.S. Khan //Microbiological research. – 2008. – Т. 163. – №. 2. – С. 173-181.

32. Ahemad, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective / M. Ahemad, M. Kibret //Journal of King saud University-science. – 2014. – Т. 26. – №. 1. – С. 1-20.

33. Alami, Y. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots / Y. Alami, W. Achouak, C. Marol, T. Heulin //Applied and environmental microbiology. – 2000. – Т. 66. – №. 8. – С. 3393-3398.

34. Alikhani, M. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways / M. Alikhani, Z. Alikhani, C. Boyd, C.M. MacLellan, M. Raptis, R. Liu, D.T. Graves //Bone. – 2007. – Т. 40. – №. 2. – С. 345-353.

35. Ankati, S. Understanding plant-beneficial microbe interactions for sustainable agriculture / S. Ankati, A.R. Podile //Journal of Spices & Aromatic Crops. – 2018. – T. 27. – №. 2.
36. Araújo, R.A. Enhanced proteolytic and cellulolytic activity in insecticide-resistant strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais* / R.A. Araújo, R.N.C. Guedes, M.G.A. Oliveira, G.H. Ferreira //Journal of Stored Products Research. – 2008. – T. 44. – №. 4. – C. 354-359.
37. Asante, M. Growth, Nodulation, and Yield Responses of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) as influenced by combined application of rhizobium inoculant and phosphorus in the Guinea Savanna zone of Ghana / M. Asante, B.D.K. Ahiabor, W.K. Atakora //International Journal of Agronomy. – 2020. – T. 2020.
38. Ashraf, M.A. Plant growth promoting rhizobacteria and sustainable agriculture: A review / M.A. Ashraf, M. Asif, A. Zaheer, A. Malik, Q. Ali, M. Rasool // African Journal of Microbiology Research. – 2013. – V. 7. – № 9. – P. 704-709.
39. Ausmees, N. A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin RapA belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* / N. Ausmees, K. Jacobsson, M. Lindberg // Microbiology. – 2001. – V. 147. – P. 549-559.
40. Baigonussova, Z.A. Creating a biological product using Nitrogen-fixing bacteria before sowing wheat (north Kazakhstan) / Z.A. Baigonussova, S.A. Tulkubaeva, Y.V. Tulaev, O.S. Safronova, A. A. Kurmanbaev //Journal of Advanced Pharmacy Education & Research| Jan-Mar. – 2021. – T. 11. – №. 1.
41. Basu, A. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects /, A. Basu, P. Prasad, S.N. Das, S.Kalam, R.Z. Sayyed, M.S. Reddy, H. El Enshasy /Sustainability. – 2021. – T. 13. – №. 3. – C. 1140.
42. Becker, S.J. Soil digestive system: functions and benefits of plant growth-promoting rhizobacteria© //Proceedings of the 2017 Annual Meeting of the International Plant Propagators' Society 1212. – 2017. – C. 225-228.

43. Berg, G. Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends / G. Berg, M. Köberl, D. Rybakova, H. Müller, R. Grosch, K. Smalla //FEMS microbiology ecology. – 2017. – T. 93. – №. 5.
44. Bianciotto, V. Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures / V. Bianciotto, S. Andreotti, R. Balestrini, P. Bonfante, S. Perotto //European journal of histochemistry. – 2001a. – T. 45. – №. 1. – C. 39-50.
45. Bianciotto, V. Mucoid mutants of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and nonmycorrhizal carrot roots / V. Bianciotto, S. Andreotti, R. Balestrini, P. Bonfante, S. Perotto //Molecular plant-microbe interactions. – 2001b. – T. 14. – №. 2. – C. 255-260.
46. Biswas, J.C. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice / J.C. Biswas, J.K. Ladha, F.B. Dazzo // Soil Sci. Soc. Am. – 2000a. – V. 64. – P.1644-1650.
47. Biswas, J.C. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice J.C. Biswas et al. // Agronomy Journal. – 2000b. – V. 92. – № 5. – P. 880-886.
48. Bittinger, M. A. *Rhizobium etli* CE3 carries vir gene homologs on a self-transmissible plasmid /, M.A. Bittinger, J.A. Gross, J. Widom, J. Clardy, J. Handelsman //Molecular plant-microbe interactions. – 2000. – T. 13. – №. 9. – C. 1019-1021.
49. Bloemberg G. V., Lugtenberg B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria //Current opinion in plant biology. – 2001. – T. 4. – №. 4. – C. 343-350.
50. Bogino, P.C. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations / P.C. Bogino, M.M. Oliva, F. G.Sorroche, W. Giordano // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – V.14. – P. 15838-15859.
51. Boiero, L. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications / L. Boiero, D. Perrig, O. Masciarelli, C. Penna, F. Cassán, V. Luna // Applied microbiology and biotechnology. – 2007. – V.74. – №. 4. – P. 874-880.

52. Bonomi, H.R. Light regulates attachment, exopolysaccharide production, and nodulation in *Rhizobium leguminosarum* through a LOV-histidine kinase photoreceptor / H.R. Bonomi, D.M. Posadas, G. Paris, F.A. Goldbaum // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012. V. 109(30). P. 12135-12140.
53. Bottomley, P. JBiological N inputs / P.J. Bottomley, D.D. Myrold // Soil microbiology, ecology and biochemistry. – Academic Press, 2007. – C. 365-387.
54. Branda, S.S. Biofilms: The matrix revisited / S.S. Branda, S. Vik, L. Friedman, R. Kolter // Trends Microbiol. – 2005. – V.13. – P. 20-26.
55. Brown, D. B. Characterization of galacturonosyl transferase genes *rgtA*, *rgtB*, *rgtC*, *rgtD*, and *rgtE* responsible for lipopolysaccharide synthesis in nitrogen-fixing endosymbiont *Rhizobium leguminosarum*: lipopolysaccharide core and lipid galacturonosyl residues confer membrane stability /, D.B. Brown, L.S. Forsberg, E.L. Kannenberg, R.W. Carlson // Journal of Biological Chemistry. – 2012. – T. 287. – №. 2. – C. 935-949.
56. Bullied, W.J. Bacillus cereus UW85 inoculation effects on growth, nodulation and N accumulation in grain legumes / W.J. Bullied, T.J. Buss, J.K. Vessey // J. Plant Sci. – 2002. – V.82. – P. 291-298.
57. Carlson, R. W. Lipopolysaccharides in Rhizobium-legume symbioses / R.W. Carlson, L.S. Forsberg, E.L. Kannenberg // Endotoxins: structure, function and recognition. – Springer, Dordrecht, 2010. – C. 339-386.
58. Castellane, T. C. L. Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications / T. C. L. Castellane, M. R. Persona, J. C. Campanharo, E. G. de Macedo Lemos // International journal of biological macromolecules. – 2015. – T. 74. – C. 515-522.
59. Chabot, R. Antoun H., Kloepper J., Beauchamp C. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* / R. Chabot, H. Antoun, J. Kloepper, C. Beauchamp // Applied and Environmental Microbiology. – 1996. – T. 62. – №. 8. – C. 2767-2772.
60. Chaintreuil, C. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the african wild rice *Oryza breviligulata* / C. Chaintreuil, E. Giraud, Y. Prin, J. Lorquin, A.

Ba, M. Gillis, P. Lajudie, B. Dreyfus // *Appl Envir Microbiol.* – 2000. – V. 66. – P. 5437-5447.

61. Chalk, P. M. The role of arbuscular mycorrhiza in legume symbiotic performance / P.M. Chalk, R.D.F. Souza, S. Urquiaga, B.J.R. Alves, R. M. Boddey // *Soil Biology and Biochemistry.* – 2006. – T. 38. – №. 9. – C. 2944-2951.

62. Chandra, S. Rhizosphere competent *Mesorhizobium loti* MP6 induces root hair curling, inhibits *Sclerotinia sclerotiorum* and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*) / S. Chandra et al. // *Brazilian Journal of Microbiology.* – 2007. – V. 38. – №. 1. – P. 124-130.

63. Chen, Y. P. Functional groups characteristics of ЭПС in biofilm growing on different carriers / Y.P. Chen, P. Zhang, J.S. Guo, F. Fang, X. Gao, C Li // *Chemosphere.* – 2013. – T. 92. – №. 6. – C. 633-638.

64. Chi, F. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology / F. Chi, S. H. Shen, H.P. Cheng, Y.X. Jing, Y.G. Yanni, , F.B. Dazzo // *Applied and environmental microbiology.* – 2005. – T. 71. – №. 11. – C. 7271-7278.

65. Chiwocha, S.D.A. A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa L.*) seeds / S.D.S. Chiwocha et al. // *The Plant Journal.* – 2003. – V. 35. – №. 3. – P. 405-417.

66. Choma, D.P. Integrin $\alpha 3\beta 1$ directs the stabilization of a polarized lamellipodium in epithelial cells through activation of Rac1 / D.P. Choma, K. Pumiglia, C.M. DiPersio // *Journal of cell science.* – 2004. – T. 117. – №. 17. – C. 3947-3959. // *Journal of cell science.* – 2004. – T. 117. – №. 17. – C. 3947-3959.

67. Chou, A.Y. Agrobacterium transcriptional regulator Ros is a prokaryotic zinc finger protein that regulates the plant oncogene ipt / A.Y. Chou, J. Archdeacon, C.I. Kado // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1998. V. 95(9). P. 5293-5298.

68. Ciesla, J. Surface properties of wild-type *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain 24.2 and its derivatives with different extracellular polysaccharide content / J. Ciesla, M. Kopycinska, M. Lukowska, A. Bieganowski, M. Janczarek // PloS one. 2016. V. 11(10).

69. Contesto C., Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on Arabidopsis indicate that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria / C. Contesto, G. Desbrosses, C. Lefoulon, G. Béna, F. Borel, M. Galland, L. Gamet, F. Varoquaux, B. Touraine // Plant Science. – 2008. – V. 175. – P. 178-189. Dakora et al., 2002

70. Daniels, R. The cin quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation / R. Daniels, D.E. De Vos, J. Desair, G. Raedschelders, E. Luyten, V. Rosemeyer, J. Michiels // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – T. 277. – №. 1. – C. 462-468.

71. Dardanelli, M. A calcium-dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots / M. Dardanelli, J. Angelini, A. Fabra // Canadian journal of microbiology. – 2003. – T. 49. – №. 6. – C. 399-405.

72. Dazzo, F.B. The natural rhizobium-cereal crop association as an example of plant-bacterial interaction / F.B. Dazzo, Y.G. Yanni // Biological approaches to sustainable soil systems. – 2006. – P. 109-127.

73. Dazzo, F. B. Progress in multinational collaborative studies on the beneficial association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice / F.B. Dazzo, Y.G. Yanni, R. Rizk, , F.J. De Bruijn, J. Rademaker, A. Squartini M.L. Izaguirre-Mayoral // The quest for nitrogen fixation in rice. – 2000. – C. 167-189.

74. De Hoff, P. L. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense / P.L. De Hoff, L.M. Brill, A.M Hirsch. // Molecular genetics and genomics. – 2009. – T. 282. – №. 1. – C. 1-15.

75. De Ruijter, M.J. Droplet spreading: partial wetting regime revisited / M.J. De Ruijter, J. De Coninck, G. Oshanin // Langmuir. – 1999. – T. 15. – №. 6. – C. 2209-2216.

76. De Silva, A. Growth promotion of highbush blueberry by fungal and bacterial inoculants / A. De Silva, K. Patterson, C. Rothrock, J. Moore // Hort. Sci. – 2000. – V. 35. – P. 1228-1230.
77. Dimkpa, C. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions / C. Dimkpa, T. Weinand, F. Asch // Plant Cell Environ. – 2009. – V. 32. – P. 1682-1694.
78. Downie, J. A. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots //FEMS microbiology reviews. – 2010. – T. 34. – №. 2. – C. 150-170.
79. Dutta, S. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone / S. Dutta, A.R. Podile //Critical reviews in microbiology. – 2010. – T. 36. – №. 3. – C. 232-244.
80. Edwards, A. The *cin* and *rai* quorum-sensing regulatory systems in *Rhizobium leguminosarum* are coordinated by ExpR and CinS, a small regulatory protein coexpressed with CinI / A. Edwards, M. Frederix, F. Wisniewski-Dyé, J. Jones, A. Zorreguieta, J. A. Downie (//Journal of bacteriology. – 2009. – T. 191. – №. 9. – C. 3059-3067.
81. Elasri, M. Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp / M. Elasri, S. Delorme, P. Lemanceau, G. Stewart, B. Laue, E. Glickmann, Y. Dessaux //Applied and environmental microbiology. – 2001. – T. 67. – №. 3. – C. 1198-1209.
82. Ferguson, L. Plant growth regulators / L. Ferguson, J.E. Lessenger // Agricultural medicine Springer. New York, 2006. – P. 156-166.
83. Finan, T. M. The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti* / T.M. Finan, S. Weidner, K. Wong, J. Buhrmester, P. Chain, F. J. Vorhölter, A. Pühler //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. – T. 98. – №. 17. – C. 9889-9894.
84. Finnie, C. The *Rhizobium leguminosarum* *prsDE* genes are required for secretion of several proteins, some of which influence nodulation, symbiotic nitrogen

fixation and exopolysaccharide modification /, C. Finnie, N.M. Hartley, K.C. Findlay, J.A. Downie //Molecular microbiology. – 1997. – T. 25. – №. 1. – C. 135-146.

85. Finnie, C. Characterization of *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide glycanases that are secreted via a type I exporter and have a novel heptapeptide repeat motif / C. Finnie, A. Zorreguieta, N. M. Hartley, J. A. Downie // J Bacteriol. – 1998. – V. 180. – P. 1691-1699.

86. Flemming, H.C. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (ЭПКС)-Part I: Structural and ecological aspects / H.C. Flemming, J. Wingender // Water Science and Technology. 2011. V. 43(6). P. 1-8.

87. Flemming, H.C. The biofilm matrix / H.C. Flemming, J. Wingender // Nature Rev. Microbiol. – 2010. – V. 8. – P. 623-633.

88. Forsberg, L.S. Structural characterization of the primary O-antigenic polysaccharide of the *Rhizobium leguminosarum* 3841 lipopolysaccharide and identification of a new 3-acetimidoylamino-3-deoxyhexuronic acid glycosyl component: a unique O-methylated glycan of uniform size, containing 6-deoxy-3-O-methyl-D-talose, N-acetylquinovosamine, and rhizoaminuronic acid (3-acetimidoylamino-3-deoxy-D-gluco-hexuronic acid) / L.S. Forsberg, R.W. Carlson //Journal of Biological Chemistry. – 2008. – T. 283. – №. 23. – C. 16037-16050.

89. Foster, K.R. A general model for the evolution of mutualisms / K.R. Foster, T. Wenseleers //Journal of evolutionary biology. – 2006. – T. 19. – №. 4. – C. 1283-1293.

90. Fraysse, N. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis / N. Fraysse, F. Couderc, V. Poinsoot // Eur. J. Biochem. – 2003. – V. 270. – № 7. – P. 1365-1380.

91. Frugier, F. Cytokinin: secret agent of symbiosis / F. Frugier, S. Kosuta, J.D. Murray, M. Crespi, K. Szczyglowski // Trends Plant Sci. – 2008. – V. 13. – P. 115-120.

92. Fujishige, N.A Molecular analysis of biofilm formation by *Rhizobium* species. – University of California, Los Angeles, 2005.

93. Fujishige, N.A. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation / N.A. Fujishige N.N. Kapadia, P.L. De Hoff, A.M. Hirsch // FEMS Microbiol. Ecol. – 2006a. – V. – V.
94. Fujishige, N.A. A feeling for the micro-organism: structure on a small scale. Biofilms on plant roots / N.A. Fujishige N.N. Kapadia, A.M. Hirsch // Botanical Journal of the Linnean Society. – 2006b. – T. 150. – №. 1. – C. 79-88.
95. Fujishige, N.A. *Rhizobium* common *nod* genes are required for biofilm formation / N.A. Fujishige, M.R. Lum, P.L. De Hoff, J.P. Whitelegge, K.F. Faull, A.M. Hirsch // Mol. Microbiol. – 2008. – V. 67. – № 3. – P. 504.
96. Fuqua, C. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling / C. Fuqua, E.P. Greenberg // Nature reviews Molecular cell biology. – 2002. – T. 3. – №. 9. – C. 685-695.
97. Gage, D.J. Infection and invasion of roots by symbiotic nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes / D.J. Gage // Microbiol. and Molecular Biol. Rev. – 2004. – V. 68. – № 2. – P. 280-300.
98. Gharzouli, R. Relevance of fucose-rich extracellular polysaccharides produced by *Rhizobium sultae* strains nodulating *Hedysarum coronarium* L. legumes / R. Gharzouli // Applied and environmental microbiology. – 2013. – T. 79. – №. 6. – C. 1764-1776.
99. García-Fraile, P. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry / P. García-Fraile, E. Menéndez, R. Rivas // AIMS Bioengineering. – 2015. – T. 2. – №. 3. – C. 183-205.
100. Gibson, K.E. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection / K.E. Gibson, H. Kobayashi, G.C. Walker // Annual Review of Genetics. 2008. V. 42. P.413-441.
101. Gonzalez, V. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons / V. Gonzalez, R.I. Santamaria, P. Bustos et al. // Proc Natl Acad Sci. – 2006. – V. 103. – P. 3834–3839.

102. Goswami, D. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review / D. Goswami, J.N. Thakker, P.C. Dhandhukia //Cogent Food & Agriculture. – 2016. – T. 2. – №. 1.

103. Gouda, S. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture / S. Gouda, R.G. Kerry, G. Das, S. Paramithiotis, H.S. Shin, J.K. Patra //Microbiological research. – 2018. – T. 206. – C. 131-140.

104. Graham, D.E. The Isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses / D. E. Graham // Anal. Biochem. – 1978. – V. 85. – № 2. – P. 609-613

105. Greenfield, L.K. Synthesis of lipopolysaccharide O-antigens by ABC transporter-dependent pathways / L.K. Greenfield, C. Whitfield //Carbohydrate research. – 2012. – T. 356. – C. 12-24.

106. Guerreiro, N. Elevated levels of synthesis of over 20 proteins results after mutation of the *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide synthesis gene *pssA* / N. Guerreiro, V.N. Ksenzenko, M.A. Djordjevic, T.V. Ivashina, B.G. Rolfe // Journal of Bacteriology. 2000. V. 182(16). P. 4521-4532.

107. Guerrero, G. Evolutionary, structural and functional relationships revealed by comparative analysis of syntenic genes in Rhizobiales/ N. Guerreiro, H. Peralta, A. Aguilar, R. Díaz, M.A. Villalobos, A. Medrano-Soto, J. Mora //BMC evolutionary biology. – 2005. – T. 5. – №. 1. – C. 1-19. Gutierrez-Manero et al., 1996

108. Gutiérrez-Zamora, M. T. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.) / M. L. Gutiérrez-Zamora, E. Martinez-Romero //Journal of biotechnology. – 2001. – T. 91. – №. 2-3. – C. 117-126.

109. Hafeez, F.Y. Symbiotic effectiveness and bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from agriculture soils in Faisalabad / F.Y. Hafeez, F.I. Naeem, R. Naeem, A.H. Zaidi, K.A. Malik //Environmental and experimental botany. – 2005. – T. 54. – №. 2. – C. 142-147.

110. Hartmann, A. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research / A. Hartmann, M. Rothballer, M. Schmid // Plant Soil. – 2008. – V. 312. – P. 7-14.

111. Hirsch, A.M. Microbial encounters of a symbiotic kind-attaching to roots and other surfaces / A.M. Hirsch, M.R. Lum, N.A. Fujishige // In root hairs: Plant Cell Monographs; Eds.; Springer-Verlag. – 2009. – V. 12. – P. 295-314.
112. Hoang, H. H. The LuxR homolog ExpR, in combination with the Sin quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression / H.H. Hoang, A. Becker, J.E. González //Journal of bacteriology. – 2004. – T. 186. – №. 16. – C. 5460-5472.
113. Hoang, H. H. Regulation of motility by the ExpR/Sin quorum-sensing system in *Sinorhizobium meliloti* / H.H. Hoang, N. Gurich, J.E. González //Journal of bacteriology. – 2008. – T. 190. – №. 3. – C. 861-871.
114. Hooshangi, S. From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications / S. Hooshangi, W. E. Bentley //Current Opinion in Biotechnology. – 2008. – T. 19. – №. 6. – C. 550-555. Humphry et al., 2007
115. Hussain, H. Iron-dependent transcription of the regulatory gene *ros* of *Agrobacterium radiobacter*/ H. Hussain, A.W.B. Johnston //Molecular plant-microbe interactions. – 1997. – T. 10. – №. 9. – C. 1087-1093.
116. Islam, S. Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway / S.T. Islam, J.S. Lam//Canadian journal of microbiology. – 2014. – T. 60. – №. 11. – C. 697-716.
117. Islam, S. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression / S. Islam, A.M. Akanda, A. Prova, M.T. Islam, M.M. Hossain //Frontiers in microbiology. – 2016. – T. 6. – C. 1360.
118. Janczarek, M. Modulation of *rosR* expression and exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* by phosphate and clover root exudates / M. Janczarek, A. Skorupska //International journal of molecular sciences. – 2011. – T. 12. – №. 6. – C. 4132-4155.
119. Janczarek, M. The *pssB* gene product of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is homologous to a family of inositol monophosphatases / M. Janczarek, Król J.,

A. Skorupska //FEMS microbiology letters. – 1999. – T. 173. – №. 2. – C. 319-325. Janczarek et al., 2001

120. Janczarek, M. Exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is related to various metabolic pathways / M. Janczarek, A. Skorupska // Research in microbiology. – 2003. – T. 154. – №. 6. – C. 433-442.

121. Janczarek, M. Regulation of *pssA* and *pssB* gene expression in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in response to environmental factors / M. Janczarek, A. Skorupska // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2004. – T. 85. – №. 3. – C. 217-227.

122. Janczarek, M. The *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* RosR: transcriptional regulator involved in exopolysaccharide production/ M. Janczarek, A. Skorupska // Molecular plant-microbe interactions. – 2007. – T. 20. – №. 7. – C. 867-881.

123. Janczarek, M. Multiple copies of *rosR* and *pssA* genes enhance exopolysaccharide production, symbiotic competitiveness and clover nodulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* / M. Janczarek, J. Jaroszuk-Ściseł, A. Skorupska // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2009. – T. 96. – №. 4. – C. 471-486.

124. Janczarek, M. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* is required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment/ M. Janczarek, J. Kutkowska, T. Piersiak, A. Skorupska // BMC microbiology. – 2010. – T. 10. – №. 1. – C. 1-23.

125. Janczarek M. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia //International journal of molecular sciences. – 2011. – T. 12. – №. 11. – C. 7898-7933.

126. Janczarek, M. Mutation in the *pssA* gene involved in exopolysaccharide synthesis leads to several physiological and symbiotic defects in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* / M. Janczarek, M. Rachwał, K. Rachwał// International journal of molecular sciences. – 2013. – T. 14. – №. 12. – C. 23711-23735.

127. Janczarek, M. Production of exopolysaccharide by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in bacterial attachment and surface properties /

M. Janczarek, M. Rachwał, J. Cieśla, G. Ginalska, A. Bieganowski // Plant and soil. – 2015. – T. 388. – №. 1. – C. 211-227.

128. Janczarek, M. A mutation in *pssE* affects exopolysaccharide synthesis by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, its surface properties, and symbiosis with clover / M. Janczarek, K. Rachwał, A. Turska-Szewczuk // Plant and Soil. – 2017. – T. 417. – №. 1. – C. 331-347.

129. Jayasinghearachchi, H.S. A *bradyrhizobial*-*Penicillium* spp. biofilm with nitrogenase activity improves N₂ fixing symbiosis of soybean / H.S. Jayasinghearachchi, G. Seneviratne // Biology and fertility of soils. – 2004a. – V. 40. – № 6. – P. 432-434.

130. Jayasinghearachchi, H.S. Can mushrooms fix atmospheric nitrogen? / H.S. Jayasinghearachchi, G. Seneviratne // Journal of biosciences. – 2004b. – T. 29. – №. 3. – C. 293-296.

131. Jayasinghearachchi, H.S. Phenolic acids: Possible agents of modifying N₂-fixing symbiosis through rhizobial alteration? / H.S. Jayasinghearachchi, G. Seneviratne // Plant and Soil. – 2003. – T. 252. – №. 2. – C. 385-395.

132. Jayasinghearachchi, H.S. A rhizobial biofilm with nitrogenase activity alters nutrient availability in a soil / H.S. Jayasinghearachchi, G. Seneviratne // Soil Biology and Biochemistry. – 2005. – T. 37. – №. 10. – C. 1975-1978.

133. Jayasinghearachchi, H.S. Fungal solubilization of rock phosphate is enhanced by forming fungal–rhizobial biofilms / H.S. Jayasinghearachchi, G. Seneviratne // Soil Biology and Biochemistry. – 2006. – T. 38. – №. 2. – C. 405-408.

134. Johnston, A. W. B. Living without Fur: the subtlety and complexity of iron-responsive gene regulation in the symbiotic bacterium *Rhizobium* and other α -proteobacteria / A.W. Johnston, J.D. Todd, A.R. Curson, S. Lei, N. Nikolaidou-Katsaridou, M. S. Gelfand, D.A. Rodionov // Biometals. – 2007. – T. 20. – №. 3. – C. 501-511.

135. Jones, K.M. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium*–*Medicago* model / K.M. Jones, H. Kobayashi, B.W. Davies, M.E. Taga, G.C. Walker // Nature Reviews Microbiology. 2007. V. 5(8). P. 619.

136. Jones, K.M. Features of *Sinorhizobium meliloti* exopolysaccharide succinoglycan required for successful invasion of *Medicago truncatula* nodules / K.M. Jones // *The Model Legume Medicago truncatula*. – 2019. – C. 571-578.

137. Joo, G.J. *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium / G.J. Joo, S.M. Kang, M. Hamayun, S.K. Kim, C.I. Na, D.H. Shin, I.J. Lee // *J Microbiol*. – 2009. – V. 47. – P. 167-171.

138. Kaci, Y. Isolation and identification of an ЭПC -producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its ЭПC and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure / Y. Kaci, A. Heyraud, M. Barakat, T. Heulin // *Research in Microbiology*. – 2005. – T. 156. – №. 4. – C. 522-531.

139. Kalam, S. Functional and molecular characterization of plant growth promoting *Bacillus* isolates from tomato rhizosphere / S. Kalam, A. Basu, A.R. Podile // *Heliyon*. – 2020. – T. 6. – №. 8. – C. e04734.

140. Kaschuk, G. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? / G. Kaschuk, T.W. Kuyper, P.A. Leffelaar, M. Hungria, K.E. Giller // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2009. – T. 41. – №. 6. – C. 1233-1244.

141. Kawaharada, Y. Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection / Y. Kawaharada, S. Kelly, M.W. Nielsen, C. T. Hjuler, K. Gysel, A. Muszyński, J. Stougaard // *Nature*. – 2015. – T. 523. – №. 7560. – C. 308-312.

142. Kawaharada, Y. Differential regulation of the Epr3 receptor coordinates membrane-restricted rhizobial colonization of root nodule primordia / Y. Kawaharada, M.W. Nielsen, S. Kelly, E.K. James, K.R. Andersen, S.R. Rasmussen, J. Stougaard // *Nature communications*. – 2017. – T. 8. – №. 1. – C. 1-11.

143. Kelly, S.J. Conditional requirement for exopolysaccharide in the *Mesorhizobium*–*Lotus* symbiosis / S.J. Kelly, A. Muszyński, Y. Kawaharada, A.M. Hubber, J.T. Sullivan, N. Sandal, C. W. Ronson // *Molecular plant-microbe interactions*. – 2013. – T. 26. – №. 3. – C. 319-329.

144. Kelly, S. Legume LysM receptors mediate symbiotic and pathogenic signalling / S.J. Kelly, S. Radutoiu, J. Stougaard // *Current opinion in plant biology*. – 2017. – T. 39. – C. 152-158.
145. Khalid, A. Phytohormones: microbial production and applications / A. Khalid, M. Arshad, Z.A. Zahir // *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*. – 2006. – P. 207-220.
146. Khan, W. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development / W. Khan, U.P. Rayirath, S. Subramanian, B. Prithiviraj // *Journal of Plant Growth Regulation*. – 2009. – T. 28. – №. 4. – C. 386-399.
147. Khoshru, B. Current scenario and future prospects of plant growth-promoting rhizobacteria: An economic valuable resource for the agriculture revival under stressful conditions / B. Khoshru, D. Mitra, E. Khoshmanzar, E.M. Myo, N. Uniyal, B. Mahakur, A. Rani // *Journal of Plant Nutrition*. – 2020. – T. 43. – №. 20. – C. 3062-3092.
148. Kloepper, J.W. A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR / J.W. Kloepper // In: *Sixth International PGPR Workshop*. Calicut. India. – 2003.
149. Krehenbrink, M. Identification of protein secretion systems and novel secreted proteins in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* / M. Krehenbrink, J.A. Downie // *BMC Genomics*. 2008. V. 9(1). P. 55.
150. Król J. E. et al. Syntenic arrangements of the surface polysaccharide biosynthesis genes in *Rhizobium leguminosarum* / J.E. Król, A. Mazur, M. Marczak, A. Skorupska // *Genomics*. – 2007. – T. 89. – №. 2. – C. 237-247.
151. Kutkowska, J. Effects of *pssb* mutation on surface polysaccharides and symbiotic phenotype of *Rhizobium leguminosarum* / J. Kutkowska, M. Janczarek, J. Kopcińska, T. Urbanik-Sypniewska, A. Skorupska // *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. – 2007. – T. 49. – №. 2. – C. 81-89.
152. Laus, M.C. Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs / M.C. Laus,

A.A.N. van Brussel, J.W. Kijne // *Mol Plant. Microbe Interact.* – 2005. – V. 18. – P. 533-538.

153. Laus, M.C. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin / M.C. Laus, T.J. Logman, G.E. Lamers, A.A.N. van Brussel, R. Carlson, J.W. Kijne // *Mol Microbiol.* – 2006. – V. 59. – P. 1704–1713.

154. Le Quéré, J.L. Nosespace with an ion trap mass spectrometer-quantitative aspects / J.L. Le Quéré, I. Gierczynski, D. Langlois, E. Sémon // *Developments in Food Science.* – Elsevier, 2006. – T. 43. – C. 589-592.

155. Lee, Y.W. Lack of *O*-polysaccharide enhances biofilm formation by *Bradyrhizobium japonicum*. / Y.W. Lee S.Y. Jeong, Y.H. In, K.Y. Kim, J.S. So, W.S. Chang // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2010. – V. 50. – P. 452-456.

156. Lehman, A. P. OxyR-dependent transcription response of *Sinorhizobium meliloti* to oxidative stress / A.P. Lehman, S.R. Long // *Journal of bacteriology.* – 2018. – T. 200. – №. 7. – C. e00622-17.

157. Lombard, V. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 / V. Lombard, H. Golaconda Ramulu, E. Drula, P.M. Coutinho, B. Henrissat // *Nucleic Acids Research.* 2014. V. 42(D1). P. D490-D495.

158. Long S. R. Genes and signals in the Rhizobium-legume symbiosis // *Plant physiology.* – 2001. – T. 125. – №. 1. – C. 69-72.

159. López-Baena, F.J. Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii*-soybean symbiosis / F.J. López-Baena, J.E. Ruiz-Sainz, M. A. Rodríguez-Carvajal, J.M. Vinardell // *International journal of molecular sciences.* – 2016. – T. 17. – №. 5. – C. 755.

160. Lucy, M. Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria / M. Lucy, E. Reed, B.R. Glick // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 2004. – V. 86. – P. 1-25.

161. Lum, M. R. Molecular methods for the authentication of botanicals and detection of potential contaminants and adulterants / M. R. Lum, A. M. Hirsch // *IV International Conference on Quality and Safety Issues Related to Botanicals* 720. – 2005. – C. 59-72.

162. Marczak, M. Homo- and heterotypic interactions between Pss proteins involved in the exopolysaccharide transport system in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* / M. Marczak, M. Dźwierzyńska, A. Skorupska // *Biological chemistry*. – 2013. – T. 394. – №. 4. – C. 541-559.

163. Marczak, M. PssP2 is a polysaccharide co-polymerase involved in exopolysaccharide chain-length determination in *Rhizobium leguminosarum* / M. Marczak, P. Matysiak, J. Kutkowska, A. Skorupska // *PLoS One*. – 2014. – T. 9. – №. 9. – C. e109106. Marczak et al., 2017

164. Maillet, F. *Sinorhizobium meliloti* succinylated high-molecular-weight succinoglycan and the *Medicago truncatula* LysM receptor-like kinase MtLYK10 participate independently in symbiotic infection / F. Maillet, J. Fournier, H. C. Mendis, M. Tadege, J. Wen, P. Ratet, K. M. Jones // *The Plant Journal*. – 2020. – T. 102. – №. 2. – C. 311-326.

165. Martinuz, A. Systemically induced resistance and microbial competitive exclusion: implications on biological control / A. Martinuz, A. Schouten, R. A. Sikora // *Phytopathology*. – 2012. – T. 102. – №. 3. – C. 260-266. Matiru et al. 2005a;

166. Maturi, V.N. Rhizobial infection of African landraces of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and finger millet (*Eleusine coracana* L.) promotes plant growth and alters tissue nutrient concentration under axenic conditions / V.N. Maturi, M.A. Jaffer, F.D. Dakora // *Symbiosis*. – 2005a. – V. 40. – №. 1. – P. 7-15.

167. Maturi, V.N. Xylem transport and shoot accumulation of lumichrome, a newly recognized rhizobial signal, alters root respiration, stomatal conductance, leaf transpiration and photosynthetic rates in legumes and cereals / V.N. Maturi, F.D. Dakora // *New phytologist*. – 2005b. – V. 165. – №. 3. – P. 847-855.

168. Matthyse, A.G. The effect of cellulose overproduction on binding and biofilm formation on roots by *Agrobacterium tumefaciens* / A.G. Matthyse, M. Marry, L. Krall, M. Kaye, B.E. Ramey, C. Fuqua, A.R. White // *Molecular plant-microbe interactions*. – 2005. – T. 18. – №. 9. – C. 1002-1010.

169. Mazur, A. Membrane topology of PssT, the transmembrane protein component of the type I exopolysaccharide transport system in *Rhizobium*

leguminosarum bv. *trifolii* strain TA1 / A. Mazur, J. Król, M. Marczak, A. Skorupska //Journal of bacteriology. – 2003. – T. 185. – №. 8. – C. 2503-2511.

170. Mazur, A. Phenotype profiling of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* clover nodule isolates reveal their both versatile and specialized metabolic capabilities / A. Mazur, G. Stasiak, J. Wielbo, P. Koper, A. Kubik-Komar, A. Skorupska //Archives of microbiology. – 2013. – T. 195. – №. 4. – C. 255-267. Mendis et al., 2016

171. Mishra, S. Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic exposed rice seedlings: role of proline as enzyme protectant / S. Mishra, R.S. Dubey //Journal of plant physiology. – 2006. – T. 163. – №. 9. – C. 927-936.

172. Mongiardini, E.J. The rhizobial adhesion protein RapA1 is involved in adsorption of rhizobia to plant roots but not in nodulation / E.J. Mongiardini, N. Ausmees, J. Perez-Gimenez // FEMS Microbiol Ecol. – 2008. – V. 65. – P. 279-288.

173. Moretto, C. Chemical and rheological properties of exopolysaccharides produced by four isolates of rhizobia /, C. Moretto, T.C.L. Castellane, E.M. Lopes, , E.G. de Macedo Lemos //International journal of biological macromolecules. – 2015. – T. 81. – C. 291-298.

174. Morris, C.E. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria / C.E. Morris, J.M. Monier //Annual review of phytopathology. – 2003. – T. 41. – №. 1. – C. 429-453.

175. Muszyński, A. Structures of exopolysaccharides involved in receptor-mediated perception of *Mesorhizobium loti* by *Lotus japonicus* / A. Muszyński, C. Heiss, C.T. Hjuler, J.T. Sullivan, S.J. Kelly, M.B. Thygesen, C.W. Ronson//Journal of Biological Chemistry. – 2016. – T. 291. – №. 40. – C. 20946-20961.

176. Naidu, V.S.G.R. Effect of synthetic auxins and Azorhizobium caulinodans on growth and yield of rice / V.S.G.R. Naidu, J.D.S. Panwar, K. Annapurna // Indian J Microbiol. – 2004. – V. 44. – P. 211-213.

177. Nicholson, W.L. Roles of *Bacillus* endospores in the environment / W.L. Nicholson // Cell. Mol. Life Sci. – 2002. – V. 59. – P. 410-416

178. Noel, T.C. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce / T.C. Noel, C. Sheng, C.

K. Yost, R.P. Pharis, M.F. Hynes //Canadian Journal of Microbiology. – 1996. – T. 42. – №. 3. – C. 279-283.

179. Ongena, M. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol / M. Ongena, P. Jacques //Trends in microbiology. – 2008. – T. 16. – №. 3. – C. 115-125.

180. O'Toole, G. A. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development / G.A. O'Toole, R. Kolter //Molecular microbiology. – 1998a. – T. 30. – №. 2. – C. 295-304.

181. O'Toole, G. A. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis / G.A. O'Toole, R. Kolter //Molecular microbiology. – 1998b. – T. 28. – №. 3. – C. 449-461.

182. Palai, J. B. Role of Rhizobium on Growth and Development of Groundnut: A Review /, J.B. Palai, G.C. Malik, S. Maitra, M. Banerjee //International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology. – 2021. – T. 14. – №. 1. – C. 63-73.

183. Parada, M. *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan* /M. Parada, J.M. Vinardell, F.J. Ollero, Á. Hidalgo, R. Gutiérrez, A.M. Buendía-Clavería, J.E. Ruiz-Sainz //Molecular plant-microbe interactions. – 2006. – T. 19. – №. 1. – C. 43-52.

184. Parray, J. A. Current perspectives on plant growth-promoting rhizobacteria / J.A. Parray, S.Jan, A.N. Kamili, R.A. Qadri, D. Egamberdieva, P. Ahmad//Journal of Plant growth regulation. – 2016. – T. 35. – №. 3. – C. 877-902.

185. Parsek, M.R. Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life / M.R. Parsek, C. Fuqua //Journal of bacteriology. – 2004. – T. 186. – №. 14. – C. 4427-4440.

186. Pathania, A. S. Utilization of waste frying oil for rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa*: Improvement through co-substrate optimization / A. S. Pathania, A. K. Jana //Journal of Environmental Chemical Engineering. – 2020. – T. 8. – №. 5. – C. 104304.

187. Pearce, D. The rhizosphere as a biofilm / D. Pearce, M.J. Bazin, J.M. Lynch, H.M. Lappin-Scott, J.W. Costerton // *Microbial biofilms*. – 1995. – C. 207-220.
188. Pellock, B.J. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides / B.J. Pellock, H.P. Cheng, G.C. Walker // *Journal of bacteriology*. – 2000. – T. 182. – №. 15. – C. 4310-4318.
189. Pellock, B.J. A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti* / B.J. Pellock, M. Teplitski, R. Boinay, G.C. Walker // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – T. 184. – №. 18. – C. 5067-5076.
190. Pena, H.B. Nitrogen fixing bacteria and phosphate solubilizers isolated in lettuce (*Lactuca sativa L.*) and evaluated as plant growth promoters / H.B. Pena, I. Reyes // *Interciencia*. – 2007. – V. 32. – № 8. – P. 560-565.
191. Pérez-Giménez J. et al. Soybean lectin enhances biofilm formation by *Bradyrhizobium japonicum* in the absence of plants / J. Pérez-Giménez, E.J. Mongiardini, M.J. Althabegoiti, J. Covelli, J.I. Quelas, S.L. López-García, A.R. Lodeiro // *International journal of microbiology*. – 2009. – T. 2009.
192. Perrine, F. M. *Rhizobium* plasmids are involved in the inhibition or stimulation of rice growth and development / F.M. Perrine, J. Prayito, J.J. Frank, B. Dazzo, B.G. Rolfe // *J. Plant Physiol.* – 2001. – V. 28. – P. 923-937.
193. Perrine-Walker, F. M. Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia / F.M. Perrine-Walker, J. Prayitno, B. G. Rolfe, J.J. Weinman, C. H. Hocart // *Journal of experimental botany*. – 2007. – T. 58. – №. 12. – C. 3343-3350.
194. Pieterse, C.M.J. Signaling in rhizobacteria -induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* / C.M.J. Pieterse, S.C.M. Van Wees, J. Ton, J.A. Van Pelt, L.C. Van Loon // *Plant Biol.* – 2002. – V. 4. – P. 535-544.
195. Pollock, T.J. Assignment of biochemical functions to glycosyl transferase genes which are essential for biosynthesis of exopolysaccharides in *Sphingomonas* strain S88 and *Rhizobium leguminosarum* / T.J. Pollock, W.A. van Workum, L. Thorne, M.J. Mikolajczak, M. Yamazaki, J.W. Kijne, & R.W. Armentrout // *Journal of Bacteriology*. 1998. V. 180(3). P. 586-593.

196. Purins, L. Coiled-coil regions play a role in the function of the *Shigella flexneri* O-antigen chain length regulator WzzpHS2 / L. Purins, L. Van Den Bosch, V. Richardson, R. Morona //Microbiology. – 2008. – T. 154. – №. 4. – C. 1104-1116.
197. Purwaningsih, S. Diversity, activity, and effectiveness of Rhizobium bacteria as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from Dieng, central Java / S. Purwaningsih, D. Agustiyani, S. Antonius //Iranian Journal of Microbiology. – 2021. – T. 13. – №. 1. – C. 130.
198. Ramey, C.T. Early learning and school readiness: Can early intervention make a difference? / C.T. Ramey, S.L. Ramey //Merrill-Palmer Quarterly (1982-). – 2004. – C. 471-491.
199. Reitz, M. Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida* / M. Reitz, K. Rudolph, I. Schroder, S. Hoffmann-Hergarten, J. Hallmann, R.A. Sikora //Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – T. 66. – №. 8. – C. 3515-3518.
200. Rekadwad, B. Fungi imperfecti laccase: Biotechnological potential and perspectives / B. Rekadwad, C. Khobragade //Microbial Applications Vol. 2. – Springer, Cham, 2017. – C. 203-212.
201. Ribeiro, VA R. Exopolysaccharides produced by *Rhizobium*: production, composition and rheological properties / VA R. Ribeiro, C.A.V. Burkert //Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry. – 2016. – T. 4. – №. 1. – C. 1-6.
202. Rinaudi, L.V. Analysis of the mucR gene regulating biosynthesis of exopolysaccharides: implications for biofilm formation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 / L.V. Rinaudi, W. Giordano / FEMS Microbial. Lett. – 2010. – V. 304. – № 1. – P.1.
203. Rinaudi, L.V. The low-molecular-weight fraction of exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* is a crucial determinant of biofilm formation / L.V. Rinaudi, W. Giordano // Journal of bacteriology. – 2009. – T. 191. – №. 23. – C. 7216-7224.

204. Rinaudi, L. V. Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation / L.Rinaudi, N.A. Fujishige, A.M. Hirsch, E. Banchio, A. Zorreguieta, W. Giordano //Research in microbiology. – 2006. – T. 157. – №. 9. – C. 867-875.Rodelas et al., 1999;
205. Rodríguez, H. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria / H. Rodríguez, R. Fraga, T. Gonzalez, Y. Bashan //Plant and soil. – 2006. – T. 287. – №. 1. – C. 15-21.
206. Rodriguez-Navarro, D.N. Attachment of bacteria to the roots of higher plants / D.N. Rodriguez-Navarro, M.S. Dardanelli, J.E. Ruiz-Sainz // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – V. 272. – P. 127-131.
207. Rudrappa, T. The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* / T. Rudrappa, M.L. Biedrzycki, S.G. Kunjeti, N. M. Donofrio, K. J. Czymmek, W.P. Paul, H.P. Bais //Communicative & Integrative Biology. – 2010. – T. 3. – №. 2. – C. 130-138.
208. Rudrappa, T. Causes and consequences of plant-associated biofilms / T. Rudrappa, M.L. Biedrzycki, H.P. Bais // FEMS Microbiol. Ecol. – 2008. – V. 64. – P. 153-166.
209. Russo, D. M. Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum* / D.M. Russo, A. Williams, A. Edwards, D.M. Posadas, C.Finnie, M. Dankert, A. Zorreguieta //Journal of bacteriology. – 2006. – T. 188. – №. 12. – C. 4474-4486.Russo et al. 2015;
210. Russo, D. M. Lipopolysaccharide O-chain core region required for cellular cohesion and compaction of in vitro and root biofilms developed by *Rhizobium leguminosarum* / D.M. Russo, P.L. Abdian, D.M. Posadas A. Williams, N. Vozza, W. Giordano, A. Zorreguieta // Applied and environmental microbiology. – 2015. – T. 81. – №. 3. – C. 1013-1023.
211. Sabry, S.R.S. Endophytic establishment of Azorhizobium caulinodans in wheat / S.R.S.Sabry, S.A. Saleh, C.A. Batchelor, J. Jones, J. Jotham, G. Webster, S.L. Kothari, M.R. Davey, E.C. Cocking // Proc R Soc Lond. – 1997. – V. 264. – P. 341-346.

212. Sanchez-Contreras, M. Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes / M. Sanchez-Contreras, W.D. Bauer, M. Gao, J. B. Robinson, J. Allan Downie //Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2007. – T. 362. – №. 1483. – C. 1149-1163.

213. Santaella C., The exopolysaccharide of *Rhizobium* sp. YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots but contributes to root colonization / C. Santaella, M. Schue, O. Berge, T. Heulin, W. Achouak // Environ Microbiol. – 2008. – V. 10. – P. 2150-2163.

214. Sayyed, R.Z. Siderophore production in groundnut rhizosphere isolate, *Achromobacter* sp. RZS2 influenced by physicochemical factors and metal ions / R.Z. Sayyed, S. Seifi, P.R. Patel, S. S. Shaikh, H.P. Jadhav, H. El Enshasy //Environmental Sustainability. – 2019. – T. 2. – №. 2. – C. 117-124.

215. Schmid, J. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies / J. Schmid, V. Sieber, B. Rehm //Frontiers in microbiology. – 2015. – T. 6. – C. 496.

216. Sekar, C. Enhancement of polygalac-turonase activity during auxing induced paranodulation and endorhizosphere colonization of *Azospirillum* in rice roots/ C. Sekar, N.N. Prasad, M.D. Sundaran // Indian J. Exp. Biol. – 2000. – V. 38. – P. 80-83.

217. Seneviratne, G. Mycelial colonization by bradyrhizobia and azorhizobia / G. Seneviratne, H.S. Jayasinghearachchi //Journal of biosciences. – 2003. – T. 28. – №. 2. – C. 243-247.

218. Seneviratne, G. A rhizobial biofilm with nitrogenase activity alters nutrient availability in a soil. / G. Seneviratne, H.S. Jayasinghearachchi // Soil Biology and Biochemistry. – 2005. – T. 37. – №. 10. – C. 1975-1978.

219. Seneviratne, G. Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications / G. Seneviratne, J.S. Zavahir, W. M. M. S. Bandara, M. L. M. A. W. Weerasekara //World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2008a. – T. 24. – №. 6. – C. 739-743.

220. Seneviratne, G. Biofilmed biofertilisers: novel inoculants for efficient nutrient use in plants / G. Seneviratne, M.L. Kecskés, I.R. Kennedy// ACIAR Proc. – 2008b. – T. 130. – C. 126-130.
221. Seneviratne, G. Developing beneficial microbial biofilms on roots of non-legumes: A novel biofertilizing technique / G. Seneviratne, R.M.M.S. Thilakaratne, A.P.D.A. Jayasekara, K.A.C.N. Seneviratne, K.R.E. Padmathilake, M. S. D. L. de Silva // Microbial strategies for crop improvement. Springer Berlin Heidelberg, 2009. –51-62p.
222. Seneviratne, G. Developed microbial biofilms can restore deteriorated conventional agricultural soils / G. Seneviratne, A.P.D.A. Jayasekara, M. S. D. L. 015de Silva, U. P. Abeysekera // Soil Biology 47and Biochemistry. – 2011. – T. 43. – №. 5. – C. 1059-1062.
223. Simsek, S. Structural analysis of succinoglycan oligosaccharides from *Sinorhizobium meliloti* strains with different host compatibility phenotypes / S. Simsek, K. Wood, B.L. Reuhs //Journal of bacteriology. – 2013. – T. 195. – №. 9. – C. 2032-2038.
224. Singh, A.K. Changes in Actinomycetes community structure under the influence of Bt transgenic brinjal crop in a tropical agroecosystem / A. K. Singh, M. Singh, S.K. Dubey //BMC microbiology. – 2013. – T. 13. – №. 1. – C. 1-12.
225. Singhalage, I.D. Functional heterogeneity of metabolites excreted by fungal and bacterial biofilms and their effects on seedling growth / I. D. Singhalage, G. Seneviratne, H. Madawala //Ceylon Journal of Science. – 2020. – T. 49. – №. 1. – C. 13-19.
226. Skorupska, A. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions /, A. Skorupska, M. Janczarek, M. Marczak, A. Mazur, J. Król //Microbial cell factories. – 2006. – T. 5. – №. 1. – C. 1-19.
227. Skorupska, A. Flavonoids and Nod Factors: Importance in Legume-Microbe Interactions and Legume Improvement / A. Skorupska, D. Kidaj, J. Wielbo //Microbes for Legume Improvement. – Springer, Cham, 2017. – C. 75-94.

228. Smith, D. L. Rhizobial signals and control of plant growth / D. L. Smith, B. Prithiviraj, F. Zhang // Nitrogen fixation: global perspectives. – 2002. – C. 327-330.
229. Sorroche, F.G. A positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native *Sinorhizobium meliloti* isolates from Argentina / F.G. Sorroche, M.B. Spesia, A. Zorreguieta, W. Giordano // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – V. 78. – P. 4092-4101.
230. Spiers, A.J. The *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader biofilm requires attachment factor, cellulose fibre and LPS interactions to maintain strength and integrity / A.J. Spiers, P.B. Rainey // Microbiology. – 2005. – V. 151. – P. 2829-2839.
231. Stanley, N.R. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation / N.R. Stanley, B.A. Lazazzera // Molecular microbiology. – 2004. – T. 52. – №. 4. – C. 917-924.
232. Stasiak, G. Functional relationships between plasmids and their significance for metabolism and symbiotic performance of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* / G. Stasiak, A. Mazur, J. Wielbo, M. Marczak, K. Żebracki, P. Koper, A. Skorupska // Journal of applied genetics. – 2014. – T. 55. – №. 4. – C. 515-527.
233. Sutherland, I.W. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework / I.W. Sutherland // Microbiology. – 2001. – V. 147. – P. 3–9.
234. Swarnalakshmi, K. Significance of plant growth promoting rhizobacteria in grain legumes: Growth promotion and crop production / K. Swarnalakshmi, V. Yadav, D. Tyagi, D.W. Dhar, A. Kannepalli, S. Kumar // Plants. – 2020. – T. 9. – №. 11. – C. 1596.
235. Turnbull, J. Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator / J. Turnbull, A. Powell, S. Guimond // Trends in cell biology. – 2001. – T. 11. – №. 2. – C. 75-82.
236. Vacheron, J. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning / J. Vacheron, G. Desbrosses, M. L. Bouffaud, B. Touraine, Y. Moënne-Loccoz, D. Muller, C. Prigent-Combaret // Frontiers in plant science. – 2013. – T. 4. – C. 356.

237. Vacheron, J. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning / J. Vacheron, G. Desbrosses, M.L. Bouffaud, B. Touraine, Y. Moënne-Loccoz, D. Muller, C. Prigent-Combaret //Frontiers in plant science. – 2013. – T. 4. – C. 356.
238. Vance, C.P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources / C.P. Vance //Plant physiology. – 2001. – T. 127. – №. 2. – C. 390-397.
239. Van de Broek, A. Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense* / A. Van de Broek, M. Lambrecht, J. Vanderleyden Bacterial //Microbiology. – 1998. – T. 144. – №. 9. – C. 2599-2606.
240. Vanderlinde, E.M. *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 3841, deficient in 27-hydroxyoctacosanoate-modified lipopolysaccharide, is impaired in desiccation tolerance, biofilm formation and motility / E.M. Vanderlinde, A. Muszynski, J.J. Harrison, S.F. Koval, D.L. Foreman, H. Ceri, E.L. Kannenberg, R.W. Carlson, C.K. Yost // Microbiology. – 2009. – V. 155. – P. 3055-3069. Vargas et al., 2009
241. Vejan, P. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review / P. Vejan, R. Abdullah, T. Khadiran, S. Ismail, A. Nasrulhaq Boyce //Molecules. – 2016. – T. 21. – №. 5. – C. 573.
242. Verstraeten, N. Living on a surface: swarming and biofilm formation / N. Verstraeten, K. Braeken, B. Debkumari, M. Fauvart, J. Fransaer, J. Vermant, J. Michiels //Trends in microbiology. – 2008. – T. 16. – №. 10. – C. 496-506.
243. Wang, H. Heterologous overexpression of quorum-sensing regulators to study cell-density-dependent phenotypes in a symbiotic plant bacterium *Mesorhizobium huakuii* / P. Wang, Z. Zhong, T. Cai, J. Zhu //Archives of microbiology. – 2004. – T. 182. – №. 6. – C. 520-525.
244. Wang, P. Exopolysaccharide biosynthesis is important for *Mesorhizobium tianshanense*: plant host interaction / P. Wang, Z. Zhong, J. Zhou, T. Cai, J. Zhu // Arch. Microbiol. – 2008. – V. 189. – № 5. – P. 525.

245. Wang, F. *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species / F. Wang, E.T. Wang, L.J. Wu, X.H. Sui, Y. Li, W.X. Chen, //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2011. – T. 61. – №. 11. – C. 2582-2588.

246. Wells, D. H. ExoR is genetically coupled to the ExoS–ChvI two-component system and located in the periplasm of *Sinorhizobium meliloti* / D.H. Wells, E.J. Chen, R.F. Fisher, S.R. Long //Molecular microbiology. – 2007. – T. 64. – №. 3. – C. 647-664.

247. Whitney, J.C. Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria / J.C. Whitney, P.L. Howell //Trends in microbiology. – 2013. – T. 21. – №. 2. – C. 63-72.

248. Wielbo, J. Complexity of phenotypes and symbiotic behaviour of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* exopolysaccharide mutants / J. Wielbo, A. Mazur, J. Krol, M. Marczak, J. Kutkowska, A. Skorupska //Archives of microbiology. – 2004. – T. 182. – №. 4. – C. 331-336.

249. Williams, A. Glucomannan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection / A. Williams, A. Wilkinson, M. Krehenbrink, D. Russo, A. Zorreguieta, J.A. Downie // J. Bacteriol. – 2008. – V. 190. – № 13. – P. 4706.

250. Wu, L. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa* // L. Wu, O. Estrada, O. Zaborina, M. Bains, L. Shen et.al. // Science. – 2005. – V. 309 – P. 774-777.

251. Yanni, Y.G. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots / Y.G. Yanni et al. // Functional Plant Biology. – 2001. – V. 28. – № 9. – P. 845-870.

252. Yaryura, P.M. Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for colonization of roots and seeds of soybean plants by *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339 / P.M. Yaryura, M. León, , O.S. Correa, N.L. Kerber, N.L. Pucheu, A.F. García //Current microbiology. – 2008. – T. 56. – №. 6. – C. 625-632.

253. Young, J.P.W. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components / J.P.W. Young, L.C. Crossman, A.W. Johnston, N.R. Thomson, Z.F. Ghazoui, K. H. Hull, J. Parkhill // *Genome biology*. – 2006. – T. 7. – №. 4. – C. 1-20.
254. Zahir, Z. A. Perspectives in agriculture / Z. A. Zahir, M. Arshad // *Advances in agronomy*. – 2004. – T. 81. – C. 97.
255. Zatakia, H.M. ExpR coordinates the expression of symbiotically important, bundle-forming Flp pili with quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti* / H.M. Zatakia, C.E. Nelson, U.J. Syed, B.E. Scharf // *Applied and environmental microbiology*. – 2014. – T. 80. – №. 8. – C. 2429-2439.
256. Zheng H. et al. A LuxR/LuxI-type quorum-sensing system in a plant bacterium, *Mesorhizobium tianshanense*, controls symbiotic nodulation / H. Zheng, Z. Zhong, X. Lai, W.X. Chen, S. Li, J. Zhu // *Journal of bacteriology*. – 2006. – T. 188. – №. 5. – C. 1943-1949.
257. Zorreguieta, A.. Extracellular glycanases of *Rhizobium leguminosarum* are activated on the cell surface by an exopolysaccharide-related component / A. Zorreguieta, C. Finnie, J.A. Downie // *Journal of Bacteriology*. 2000. V. 182(5). P. 1304-1312.