

*На правах рукописи*

**ЛАВИНА АННА МИХАЙЛОВНА**

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

03.02.03 Микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Уфа – 2021

Работа выполнена в лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов «Института биохимии и генетики – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук», Уфа

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН  
**Баймиев Алексей Ханифович**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии ФГБУН Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН  
**Гоголев Юрий Викторович**

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией микробиологического мониторинга и биоремедиации почв ФГБНУ «Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии»  
**Андронов Евгений Евгеньевич**

**Ведущая организация:** ФГБУН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» РАН (410049, г. Саратов, просп. Энтузиастов, 13)

Защита диссертации состоится «    » апреля 2022 г. в    :    часов на заседании диссертационного совета Д 999.219.02 на базе Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук и Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: +7 (342) 280 92 11.  
E-mail: info@iegm.ru.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии Министерства науки и высшего образования РФ (<http://vak.minobrnauki.gov.ru>) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «ИЭГМ УрО РАН» и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

Автореферат разослан " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования и состояние вопроса

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 биопленки на поверхности корней растений (Вершинина и др., 2017а; Pathania et al., 2020; Palai et al., 2021; Purwaningsih et al., 2021). Формирование биопленок ризобактериями позволяет им защищать себя от внешнего стресса и микробной конкуренции характерной для ризосферы (Ashraf, 2013; Rekadwad and Khobragade, 2017; Baigonussova et al., 2021).

Экзополисахариды (ЭПС), бактериальные поверхностные полисахариды, которые играют важную роль в биопленкообразовании ризобий, влияют на процессы адгезии ризобактерий к корням растений, а также образование клубеньков (Skorupska et al., 2006; Rinaudi and Giordano, 2010; Janczarek et al., 2011). Кроме того, ростостимулирующий эффект азотфиксирующих бактерий также связан с биосинтезом ЭПС (Лавина и др., 2014; 2016а; Хакимова и др., 2017b; Castellane et al., 2015).

Ранее проведен ряд важных исследований, посвященных роли ЭПС в бобово-ризобиальном симбиозе (Williams et al., 2008; Ongena and Jacques, 2008; Rudrappa et al., 2008). Существенный вклад в изучение роли генов-регуляторов путей биосинтеза ЭПС у *R. leguminosarum* в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями внесли работы Skorupska и соавт. (2006), а также Janczarek и соавт. (2003, 2004, 2009, 2010). Известно, что гены-регуляторы биосинтеза ЭПС ризобактерий расположены на хромосоме и большинство из них сгруппированы в кластере Pss-I (Król et al., 2007). Наиболее важные среди них: *pssA* – ключевой ген, кодирует трансферазу, участвующую в начальной стадии биосинтеза ЭПС, мутации в этом гене приводят к прекращению синтеза (Janczarek et al., 2009); *pssB* – отрицательный регулятор (Kutkowska et al., 2007; Janczarek et al., 2001); *rosR* –

кодирует регулятор транскрипции синтеза ЭПС и влияет на экспрессию генов кластера Pss-I, в том числе на *pssA* и *pssB*, в ответ на сигналы окружающей среды (Janczarek et al., 2010); *prsD*, *prsE* – кодируют компоненты системы секреции белка типа I, которая экспортирует белки, связанные с поверхностным прикреплением и созреванием биопленки бактерий рода *Rhizobium* (Long et al., 2001). Исследованию роли ризобияльных ЭПС в процессах биопленкообразования, в значительной мере, способствовали и работы Fujishige и соавт. (2005, 2006). Тем не менее, многие механизмы формирования биопленок ризосферными бактериями и их адгезии на корнях растений недостаточно изучены. Выяснение процессов образования биопленок ризобактериями позволит регулировать их формирование и в искусственных симбиотических системах, где большую роль играет колонизация корней растений.

**Цель настоящего исследования** – 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.

**Задачи исследования:**

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 на основе плазмид широкого круга хозяев векторные конструкции, 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, трансформированных генами-модификаторами 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* ризобиальных 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  $\text{Ca}^{2+}$  и питательных веществ в культуральной среде, а также температурным режимом. Проведены микроскопические исследования структур, образованных ризобиальными штаммами на инертных поверхностях и корнях растений. Собрана коллекция ризобиальных штаммов, обладающих ростостимулирующей активностью.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Полученные результаты расширяют представление о процессах биопленкообразования ризобиями. Исследованная коллекция штаммов ризобактерий может быть рекомендована к созданию биопрепарата с ростостимулирующими свойствами. Показано, 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.

### **Основные 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  $\text{Ca}^{2+}$  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.

### **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 рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, из них 6 статей – индексируемые в базах Web of Science или Scopus.

### **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. Список литературы включает 257 наименований работ, в том числе 28 отечественных и 229 зарубежных авторов.

### **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%.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Объекты и методы исследования

**Объектами исследования** в данной работе являлись: гены: *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*, которые участвуют в биосинтезе ЭПС у *R. leguminosarum*; 114 штаммов *R. leguminosarum* и 3 штамма *R. galegae* из коллекции микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН «Симбионт». В опытах по определению ростостимулирующего эффекта ризосферных штаммов использовались следующие 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.). Штамм *E. coli* XL1 Blue был выбран для проведения экспериментов по клонированию. В исследованиях, посвященных изучению биопленкообразования ризосферными бактериями на биотических и абиотических поверхностях, применяли дикие и рекомбинантные по генам *pssA*, *pssB*, и *rosR* штаммы ризобактерий. Трансформацию штаммов проводили путем использования плазмид pJB658 PssB, pJB658GFP, pJB658GFP PSSA и pJB658GFP RosR.

**Методы исследования.** В работе использовались современные молекулярно-биологические и микробиологические методы: выделение бактериальной ДНК (Graham, 1978), ПЦР и электрофоретический анализ ее продуктов (Sambrook et al., 1989), трансформация компетентных клеток плазмидной ДНК, определение нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК и их компьютерный анализ, а также автоматическое секвенирование ДНК ферментативным методом, анализ биопленкообразования ризосферными штаммами и их дальнейшее микроскопирование (световая и флуоресцентная микроскопия), оценка зависимости биопленкообразования от логарифма числа живых клеток при росте культур на несменяемой среде, определение количества адгезированных на корнях растений ризобактерий. Статистическую обработку

полученных результатов проводили с использованием стандартных пакетов программы Microsoft Excel 2010. При статистической обработке определяли 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. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Идентификация генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR* в геноме *R. leguminosarum* и *R. galegae*.

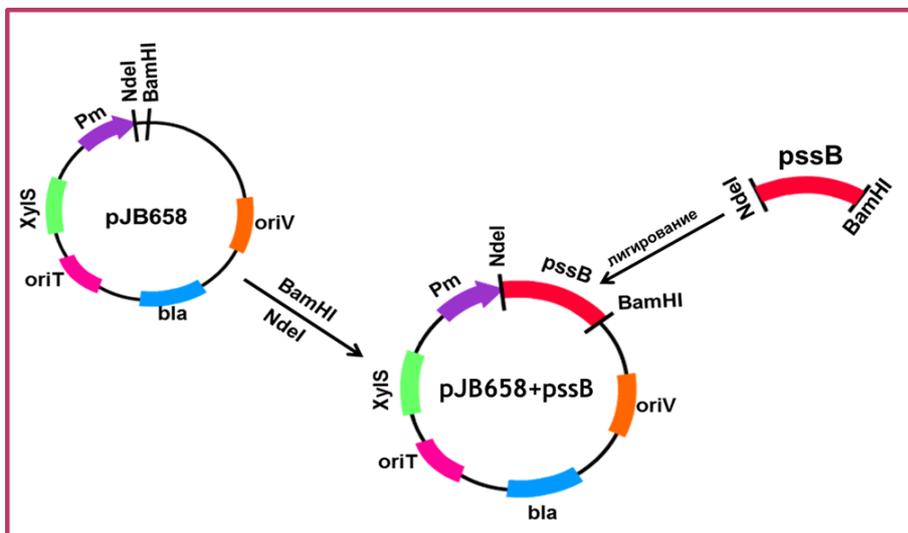
Для изучения влияния экспрессии исследуемых генов на синтез ЭПС и выживаемость ризобий в целом, был проведен скрининг 114 штаммов *R. leguminosarum* и 3 штаммов *R. galegae* из коллекции микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН на предмет наличия в их геноме генов регулирующих биосинтез ЭПС (*pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*). Для амплификации использовали олигонуклеотидные праймеры, подобранные к кодирующей части генов. Были обнаружены 10 штаммов (8,8% от общего количества исследуемых нами штаммов *R. leguminosarum*), в геноме которых были идентифицированы все исследуемые нами гены. Выявлено, что в некоторых случаях гены *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE* могут не идентифицироваться. В 19 штаммах (16,7% от общего количества исследуемых штаммов) мы не обнаружили ни одного из представленных генов. Такие штаммы характеризовались скудным ослизнением клеток по сравнению со штаммами, у которых были идентифицированы все исследуемые гены. В геноме *R. galegae* исследуемые гены не были обнаружены, что может быть связано с тем, что подобранные нами праймеры обладали высокой специфичностью к виду *R. leguminosarum*.

### Получение штаммов ризосферных бактерий, трансформированных генами-регуляторами синтеза экзополисахаридов

Для создания конструкций с генами *pssA*, *pssB* или *rosR* нами была выбрана плаزمида pJB658 класса BHR (широкого круга хозяев), содержащая репликон T2, а

также индуцибельный промотор Pm, 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.

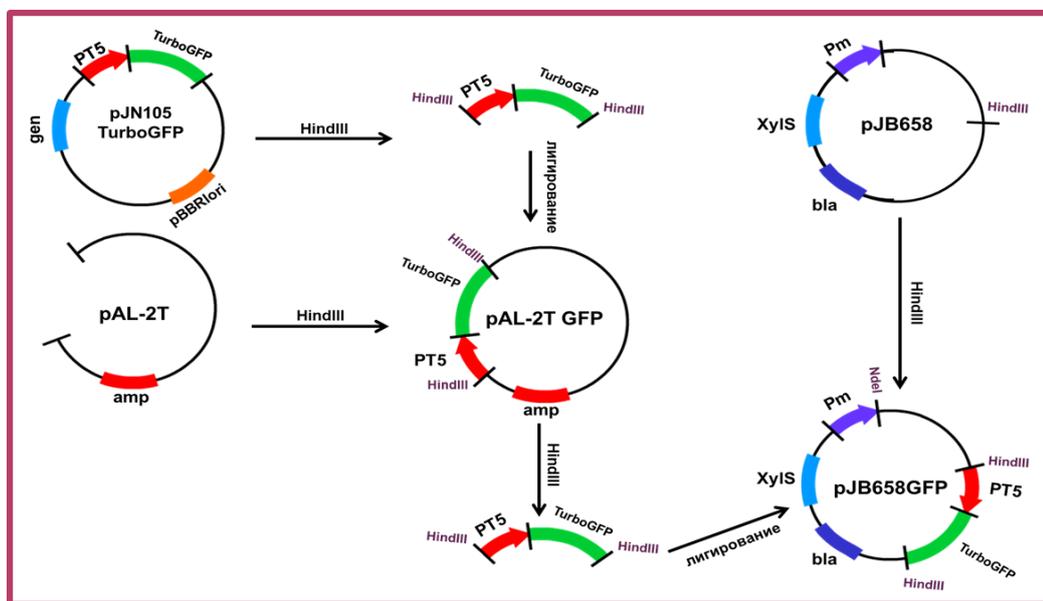
Для получения плазмидной конструкции с геном *pssB*, амплифицированную последовательность клонировали в вектор pJB658 (рис. 1). Благодаря наличию разных сайтов рестрикции на концах продуктов ПЦР-амплификации (*Bam*HI и *Nde*I), клонируемые последовательности попадали в рамку считывания с сайта *Nde*I в правильной ориентации. Наличие гена в полученном векторе подтвердил ПЦР-анализ с праймером, находившемся ниже Pm промотора - FpJB658 и обратного праймера (RBamHI), подобранного к гену *pssB*, а также проведенное ДНК-секвенирование. Секвенированная последовательность гена *pssB* была гомологична зарегистрированной под номером AAB67614.2 (Janczarek and Skorupska, 2003) последовательности, представленной в GenBank у *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.



**Рисунок 1.**  
Схема  
получения  
конструкции  
pJB658 с  
геном *pssB*.

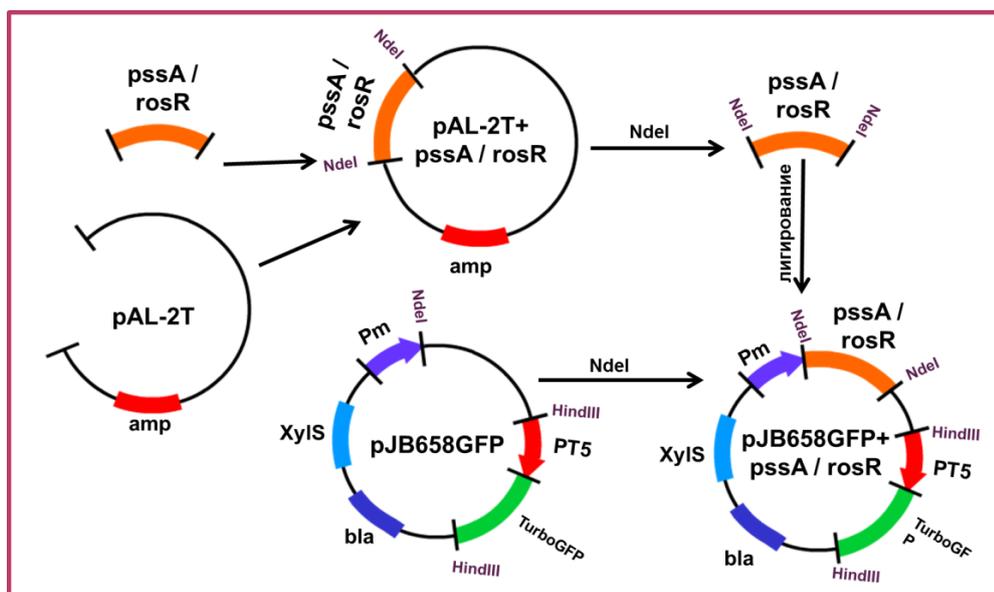
Для визуализации взаимодействия микроорганизмов с корнями растений, нами был получен вектор pJB658GFP, который использовался для создания плазмидных конструкций с генами *pssA* и *rosR*. Так целевой ген *gfp* был амплифицирован из вектора pJN105TurboGFP (Баймиев и др., 2011) вместе с

промотором фага T5 при помощи специфичных праймеров, содержащих сайт рестрикции *HindIII*. Далее амплифицированную последовательность ДНК клонировали в промежуточный вектор pAL-2T (рис. 2). Затем плазмиду pAL-2TGFP обработали рестриктазой *HindIII*. После этого целевая последовательность ДНК была клонирована в вектор pJB658 по сайту рестрикции *HindIII*.



**Рисунок 2.**  
Схема создания вектора pJB658GFP.

Далее проводили лигирование амплифицированных последовательностей генов *pssA/rosR* и промежуточного вектора pAL-2T. Затем вектора pAL-2T *pssA/rosR* и pJB658GFP обрабатывали рестриктазой *NdeI*. В конечном итоге, было произведено лигирование необходимого гена (*pssA/rosR*) и вектора pJB658GFP по липким концам (рис. 3).

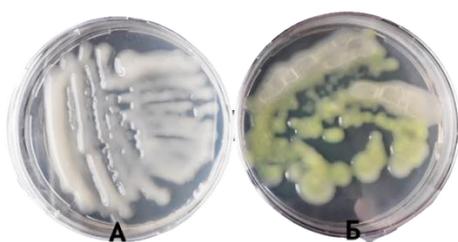


**Рисунок 3.**  
Схема получения вектора pJB658GFP с генами *pssA* или *rosR*.

Наличие целевых генов в векторе pJB658GFP подтвердил ПЦР-анализ с праймером, находившемся ниже Pm промотора - FpJB658 и соответствующих генам «обратных» праймеров. Секвенированная последовательность гена *pssA* была гомологична зарегистрированной 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).

Данными конструкциями были трансформированы компетентные клетки *E. coli*, *R. galegae* и *R. leguminosarum*. В случае наличия в геноме бактерий 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).

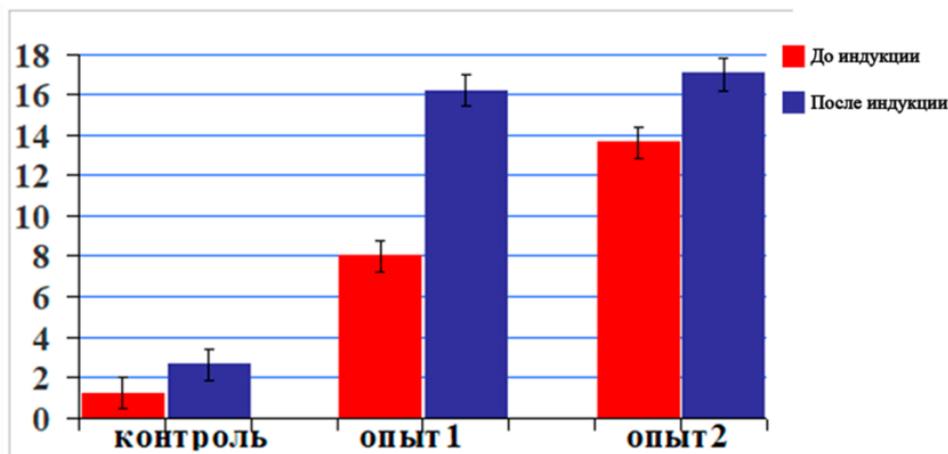
Для того чтобы проанализировать на какие фенотипические признаки влияет наличие плазмиды pJB658GFP RosR в геноме ризобактерий, нами был трансформирован штамм *R. leguminosarum* VSy3, изолированный из клубеньков горошка лесного (*Vicia sylvatica* L.), у которого ранее нами были идентифицированы гены *pssB* и *prsE*, но не был идентифицирован ген *rosR*. Клетки полученного рекомбинантного штамма, в отличие от дикого, характеризовались большим ослизнением клеточных стенок и окрасились в зеленый цвет (рис. 4).



**Рисунок 4.** Дикий и трансформированный ризобиальные штаммы:  
А - *R. leguminosarum* VSy3;  
Б - *R. leguminosarum* VSy3 pJB658GFP RosR.

Нами был проведен real-time ПЦР, в котором ген *recA* был использован в роли референсного гена (housekeeping), для того чтобы определить интенсивность транскрипции гена *rosR* во время активации промотора Pm, а также в тот момент, когда он выключен. При необходимости индукции промотора, культивировали исследуемые штаммы на питательной среде с добавлением 1 мМ *m*-толуиловой кислоты. Так, на примере ризобиальных штаммов, трансформированных конструкцией pJB658GFP RosR, нами было выявлено, что показатели уровня

экспрессии гена *rosR*, при индукции промотора P<sub>m</sub>, в трансформированных штаммах были значительно выше показателей уровня экспрессии исследуемого гена зафиксированных для контрольного штамма (рис. 5). При этом, значения показателей уровня экспрессии гена *rosR* без добавления *m*-толуиловой кислоты – индуктора промотора P<sub>m</sub>, также становились в несколько раз выше контрольного значения, что обусловлено неполным блокированием операторной области этого индуцибельного промотора.



**Рисунок 5.** Количественный ПЦР анализ уровня транскрипции гена *rosR* с использованием РНК, изолированной из *R. leguminosarum* (контрольный штамм и рекомбинантный штамм, содержащие плазмиду pJB658GFP RosR). По оси Y – условные единицы, обозначающие уровень транскрипции гена *rosR* в рекомбинантных штаммах относительно дикого штамма.

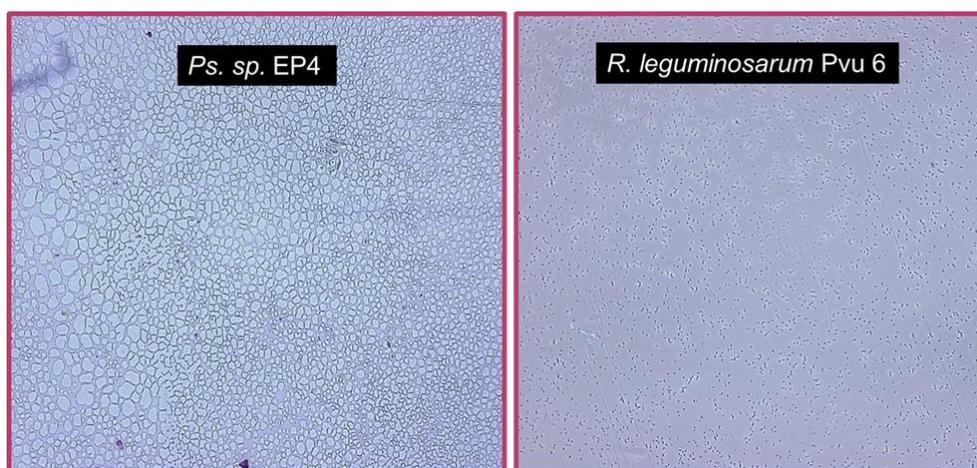
Контроль – штамм *R. leguminosarum* VSy3 GFP, трансформированный исходным вектором pJB658GFP. Опыт 1 и 2 – штаммы *R. leguminosarum* VSy3 RosR и *R. leguminosarum* VSy12 RosR, соответственно, трансформированные плазмидой pJB658GFP RosR.

### **Изучение процессов формирования биопленок ризосферными бактериями на инертных поверхностях и на поверхности корней растений**

Ризосферные штаммы образуют биопленки со сложной трехмерной архитектурой на абиотических поверхностях и окрашивание данной биопленки обеспечивает визуализацию ее экзополисахаридной матрицы (Fujishige et al., 2006a). Ввиду этого, нами был проведен анализ возможности формирования ризобиями биопленок на 96 луночных планшетах. Для этого исходные и рекомбинантные штаммы выращивали 48 часов в жидкой среде на шейкере при 28°C и 140 об/мин до концентрации 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> 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.

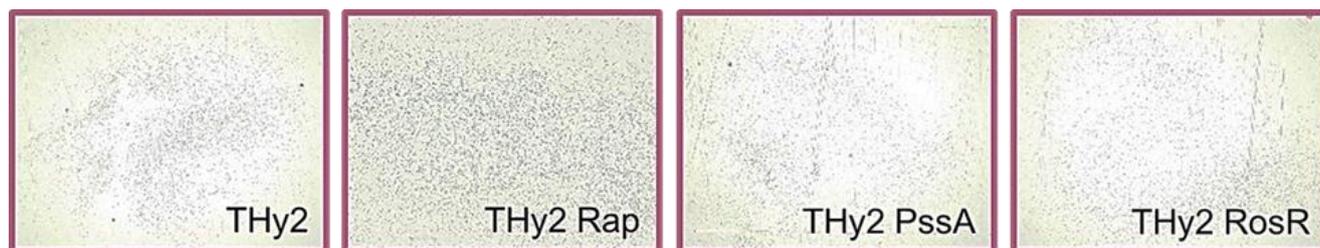
Микроскопические исследования проводили с помощью методов световой микроскопии, используя универсальный способ сложной окраски – окрашивание по Граму. Микроскопическая картина: при правильной окраске мазков по Граму в случае ризобий, которые являются грамотрицательными бактериями – окрашивание в цвет фуксина Пфейффера (розовый цвет). В качестве положительного контроля нами был выбран штамм *Pseudomonas* sp. EP4 из коллекции ВНИИСХМ, который образует высокоорганизованные комплексы биопленок похожие на соты. Отрицательным контролем являлся штамм *R. leguminosarum* Pvu6, при микрокопировании которого мы наблюдали одиночные, планктонные клетки (рис. 6).



**Рисунок 6.** Изображения, полученные при микрокопировании штаммов *Pseudomonas* sp. EP4 и *R. leguminosarum* Pvu6.

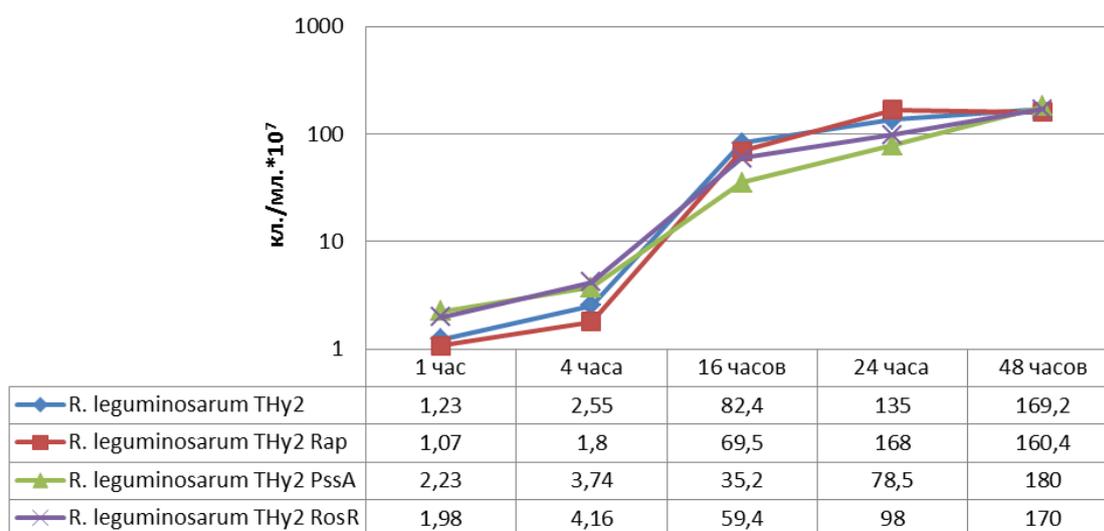
Нами было показано, что наличие в геноме штаммов *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12, *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4 дополнительной копии гена *pssA* или *rosR* положительно влияет на эффективность образования биопленок. Рекомбинантные штаммы ризобий формировали более сложные архитектурные структуры по сравнению с дикими штаммами. В случае штамма *R. galegae* 0702 значимых различий в биопленкообразовании между рекомбинантными и контрольными штаммами мы не выявили. Также мы исследовали на предмет биопленкообразования штаммы, содержащие в геноме ген *rapA1*. Экспрессия белка RapA1, который кроме свойств адгезина имеет также и

агглютинирующую способность, оказала положительное влияние на процессы биопленкообразования на инертных поверхностях (рис. 7).



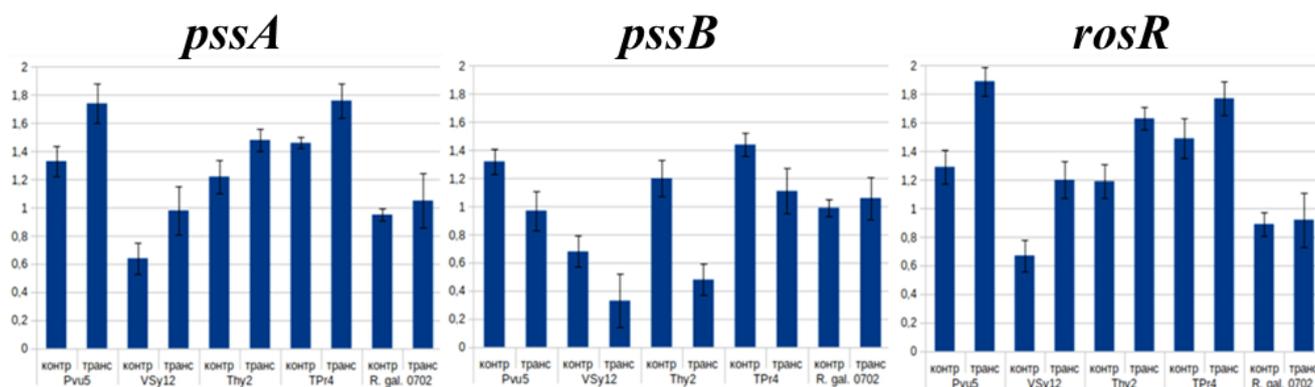
**Рисунок 7.** Биопленка, образованная контрольным и рекомбинантными штаммами за 7 суток: *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* THy2 RapA1, *R. leguminosarum* THy2 PssA, *R. leguminosarum* THy2 RosR.

При этом проведенный нами анализ зависимости логарифма 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. Так, в случае контрольного и трансформированных штаммов *R. leguminosarum* THy2, наиболее зрелая биопленка, наблюдалась у штамма *R. leguminosarum* THy2 RapA1, несмотря на то, что после 2-х суточных измерений показатель количества клеток данной культуры был незначительно ниже показателей штамма дикого типа и отставал от показателей штаммов *R. leguminosarum* THy2 PssA и *R. leguminosarum* THy2 RosR (рис. 8).



**Рисунок 8.** 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.

Напротив, трансформация исследуемых штаммов генно-инженерной конструкцией pJB658 + *pssB* в 2 раза уменьшала толщину биопленок (рис 9).

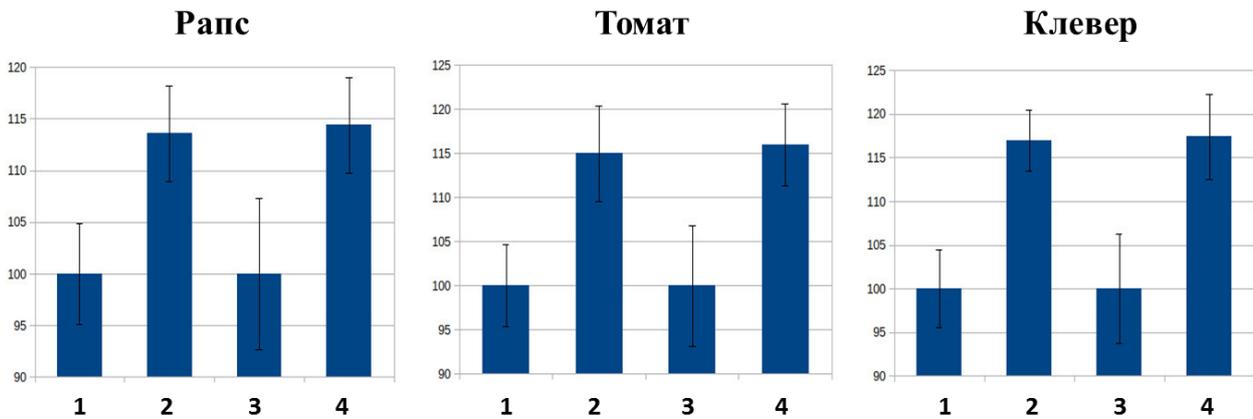


**Рисунок 9.** Относительная биомасса биопленок исходных и трансформированных штаммов бактерий после 7 суток культивирования при содержании 4,5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  в культуральной среде при 28°C. По оси Y – оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок, образованных на пластиковых планшетах.

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. Контрольными штаммами являлись - *R. leguminosarum* VSy3, *R. leguminosarum* VSy12, опытные штаммы – *R. leguminosarum* VSy3 RosR, *R. leguminosarum* VSy12 RosR.

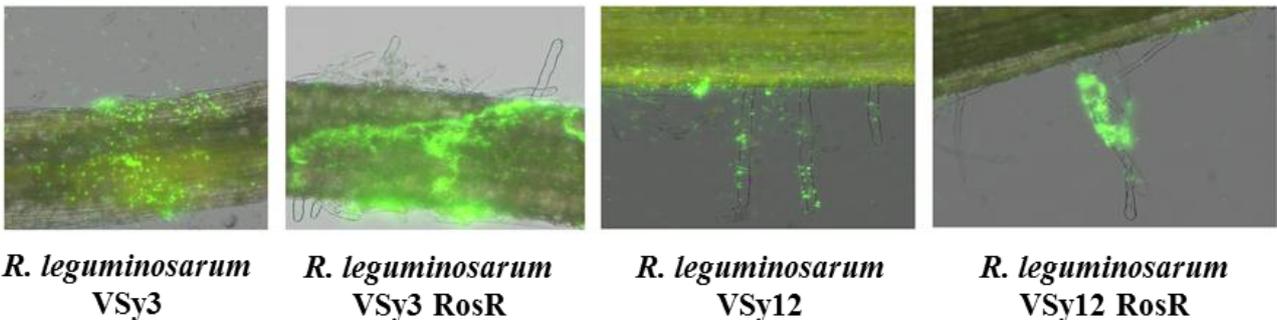
Так, было показано, что наличие в геноме *R. leguminosarum* дополнительной копии гена *rosR*, который кодирует регулятор транскрипции синтеза ЭПС и связан с экспрессией генов *pssA* и *pssB*, не оказывает существенного влияния на ростовые параметры растений, а также на образование клубеньков на корнях симбиотрофного растения клевера лугового. Тем не менее, эксперименты по совместному культивированию трансформированных конструкцией pJBGFP658 RosR 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 (рис. 10).



**Рисунок 10.** 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.

Кроме того, через 7 суток после совместной инокуляции исследуемых штаммов и растений томата, нами было проведено микроскопирование его корней на предмет наличия сформированных биопленок. Выявлено, что трансформированные штаммы способны образовывать зрелые биопленки на биотических поверхностях, причем их локализация зависит от того, каким штаммом инфицирована корневая система (рис. 11). В случае *R. leguminosarum* VSy3 и *R. leguminosarum* VSy3 RosR, мы наблюдали биопленки, которые находились на поверхности главного корня. В случае же *R. leguminosarum* VSy12 и *R. leguminosarum* VSy12 RosR, бактерии колонизировали преимущественно корневые волоски и биопленки наблюдались именно в этой области.



**Рисунок 11.** Образование биопленок экспериментальными штаммами на поверхности корней растений томата через 7 дней совместного культивирования.

## **Анализ влияния факторов окружающей среды на формирование биопленок ризобияльными штаммами**

Биопленкообразование представляет собой стратегию выживания ризобий и различные факторы окружающей среды в той или иной степени влияют на эту способность. Так, нами была выявлена корреляция между концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  в культуральной среде и толщиной биопленок – добавление в среду 1,5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  приводило к увеличению толщины биопленок в 2 раза, 3 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  - в 4 раза, 4,5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  - в 5 раз. 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 в 3 раза толще тех, что были образованы в богатых питательными веществами средах. Таким образом, показано, что концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в культуральной среде положительно коррелирует с биопленкообразованием, а низкие температуры и доступность питательных веществ вызывают отрицательный эффект.

### **Ростостимулирующий эффект штаммов синтезирующих модификаторы механизмов формирования биопленок на поверхности корней**

Для того чтобы оценить ростостимулирующий эффект штаммов синтезирующих регуляторы формирования биопленок, нами была создана коллекция генетически охарактеризованных штаммов ризосферных бактерий. Так, были отобраны 5 из 10 штаммов *R. leguminosarum*, у которых были идентифицированы исследуемые 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 1 штамм *R. galegae* 0702, клетки, которого продемонстрировали наибольшее зафиксированное нами ослизнение клеточных стенок. В качестве положительного контроля 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).

Так, было выявлено, что инокуляция растений салата латука, репы, козлятника восточного, огурца обыкновенного и клевера красного исследуемыми ризосферными штаммами приводит к увеличению показателя всхожести семян, длины корней и гипокотилей проростков этих растений. Кроме того, на примере растений огурца обыкновенного, показано, что применение ризобияльных штаммов, синтезирующих ЭПС, при обработке растений, как и в случае биопрепарата «Елена», ведет к увеличению размеров листа. Штамм *R. galegae* 0702 также оказывает положительное действие на этот параметр.

Следовательно, штаммы *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12 (2008), *R. leguminosarum* LSy10 (D17), *R. leguminosarum* THy1, *R. leguminosarum* TPr3 (2004) и *R. galegae* 0702 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.

Таким образом, были изучены механизмы формирования биопленок ризосферными бактериями на поверхности корней растений в ассоциативных

симбиозах путем использования в качестве модификаторов данных процессов генов-регуляторов путей синтеза ЭПС ризобий (*pssA*, *pssB* и *rosR*).

## 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 P<sub>m</sub>, были получены 12 рекомбинантных по генам *pssA* и *rosR* ризобиальных штаммов, меченных флуоресцентным белком GFP, а также 5 штаммов рекомбинантных по гену *pssB*.

3. Микроскопические исследования структур, образованных ризобиальными 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 ризобиальными 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  $\text{Ca}^{2+}$ , 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 ризобияльных штаммов, синтезирующих ЭПС, при обработке растений, положительно влияет на параметры высоты стебля, а также длины и ширины большего листа на побеге.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. Вершинина, З.Р. Ассоциативный симбиоз трансгенных томатов с ризобиями повышает устойчивость растений к *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* / З.Р. Вершинина, Д.К. Благова, Л.Р. Нигматуллина, **А.М. Лавина**, А.Х. Баймиев // Биотехнология. – 2015. – Т. 31. – № 3. – С. 42-53.

2. 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. (WoS/Scopus).

3. Благова, Д.К. Искусственные ассоциативные симбиозы между томатом и ризобиями, обладающими фунгистатической активностью / Д.К. Благова, З.Р. Вершинина, Л.Р. Нигматуллина, **А.М. Лавина**, А.Х. Баймиев, А.Х. Баймиев // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – № 1. – С. 107-114. (Scopus).

4. 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. – 2017. – Т. 53. – № 4. – С. 400-405. (WoS/Scopus).

5. 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, А.Х. Баймиев, А.Х. Баймиев // Биотехнология. – 2019. – Т. 35. – № 2. – С. 38-48. (Scopus).

6. Вершинина, З.Р. Влияние конститутивной экспрессии гена *garpA1* 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. – 2019. – Т. 88. – № 1. – С. 62-71. (WoS/Scopus).

7. 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, А.Х. Баймиев, А.Х. Баймиев // Микробиология. – 2021. – Т. 90. – № 2. – С. 191-203. (WoS/Scopus).

### Публикации в других журналах и сборниках

8. **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.

9. **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. – 2016. – № 3(89). – С. 91-93.

10. Хакимова, Л.Р. Оценка влияния конститутивной экспрессии гена *garpA1* 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.

11. **Лавина, А.М.** Создание векторной конструкции, содержащей ген *ppsB*, участвующий в синтезе экзополисахаридов в *Rhizobium leguminosarum* / А.М. Лавина, Л.Р. Нигматуллина, Э.Р. Сербаева, 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", 2016 мол. – С. 24.

12. 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. – 2017. – Т. 9. – № 4. – С. 356-363.

13. 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. – 2017. – Т. 9. – № 4. – С. 325-339.

14. 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. – 2017. – № 9(209). – С. 96-99.

15. **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.

16. **Лавина, А.М.** Получение флуоресцентно-меченных ризобиальных штаммов, содержащих ген белка TurboGFP, для их детекции *in vivo* и *in vitro* / А.М. Лавина, Л.Р. Нигматуллина, Е.Э. Аксюкова, З.Р. Вершинина, Ал.Х. Баймиев // Материалы III Всероссийской молодежной научной школы-конференции с международным участием «Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах» г. Оренбург – 2017. С. 20.

17. **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.

18. 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.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЭПС-экзополисахариды

ПЦР-полимеразная цепная реакция

**ЛАВИНА АННА МИХАЙЛОВНА**

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

03.02.03 Микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Подписано в печать . . .2022

Формат 60×90/16.

Усл. печ. л. 1.

Тираж 110 экз. Заказ №

Набор компьютерный

---

Отпечатано в