

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

ВЛАДИМИРОВА АНАСТАСИЯ АНДРЕЕВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ
ПРОДУКТА ГЕНА *NIFA* ВНУТРИ ГРУППЫ
КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ**

1.5.7. Генетика (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
Ан.Х. Баймиев

Уфа – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Фиксация атмосферного азота микроорганизмами.....	13
1.1.1. Свободноживущие азотфиксирующие бактерии.....	15
1.1.2. Ассоциативные азотфиксаторы.....	16
1.1.3. Фиксация азота в клубеньках.....	17
1.2. Структура и функции нитрогеназы в процессе азотфиксации.....	20
1.3. Гены, кодирующие нитрогеназный комплекс (<i>nif</i> -гены).....	23
1.3.1. Ген <i>nifA</i> и его роль в процессе фиксации азота.....	25
1.4. Генетическая регуляция азотфиксации у микроорганизмов.....	28
1.4.1. Транскрипционный уровень регуляции азотфиксации.....	29
1.4.2. Посттранскрипционная регуляция фиксации азота.....	35
1.4.3. Посттрансляционный уровень регуляции азотфиксации.....	36
1.5. Горизонтальный перенос генов в группе клубеньковых бактерий.....	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.1. Объекты исследования.....	43
2.2. Методы исследований.....	44
2.2.1. Создание рекомбинантных плазмид.....	44
2.2.2. Выделение бактериальной ДНК.....	45
2.2.3. Выделение плазмидной ДНК.....	46
2.2.4. Полимеразная цепная реакция и олигонуклеотидные праймеры.....	48
2.2.5. Полимеразная цепная реакция в реальном времени.....	50
2.2.6. Аналитический гель-электрофорез ДНК.....	51
2.2.7. Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции.....	51
2.2.8. Обработка ДНК щелочной фосфатазой.....	52
2.2.9. Лигирование <i>nifA</i> генов с плазмидной ДНК.....	52
2.2.10. Секвенирование ДНК.....	53

2.2.11. Подготовка химически компетентных клеток <i>E. coli</i>	53
2.2.12. Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i> плазмидной ДНК.....	54
2.2.13. Подготовка электрокомпетентных клеток ризобий.....	55
2.2.14. Электропорация компетентных клеток клубеньковых бактерий.....	55
2.2.15. Выделение и очистка РНК рекомбинантных клубеньковых бактерий.....	56
2.2.16. Реакция обратной транскрипции.....	57
2.2.17. Выделение и анализ белков из клеток клубеньковых бактерий.....	57
2.2.18. Определение числа КОЕ бактерий.....	59
2.2.19. Подбор концентрации индуктора для активации промотора <i>ParaBAD</i>	59
2.2.20. Выделение бактерий из клубеньков.....	60
2.2.21. Хранение рекомбинантных штаммов ризобий.....	61
2.2.22. Определение азотфиксирующей активности бактерий.....	61
2.2.23. Стерилизация и инокуляция семян.....	62
2.2.24. Количественное определение содержания пигментов в растительных тканях.....	63
2.2.25. Оценка стабильности рекомбинантных плазмид.....	64
2.2.26. Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей.....	65
2.2.27. Статистическая обработка полученных результатов.....	65
2.3. Реактивы и материалы.....	65
2.4. Составы использованных стандартных водных растворов.....	67
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	69
3.1. Выбор объектов исследования.....	69
3.2. Анализ полиморфизма <i>nifA</i> гена среди клубеньковых бактерий.....	76
3.3. Создание генно-инженерных конструкций с целевым геном <i>nifA</i>	78
3.4. Анализ функциональной активности гена <i>nifA</i> у рекомбинантных штаммов.....	83

3.5. Исследование стабильности привнесенного вектора среди клубеньковых бактерий.....	90
3.6. Оценка влияния рекомбинантных штаммов на рост и развитие растений.....	96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	102
ВЫВОДЫ.....	104
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	107

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Существование всех живых организмов всецело зависит от усвоения элементов необходимых для построения биомолекул и их функционирования. Одним из важнейших соединений является азот (N_2), входящий в состав таких биоструктур как: нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК), белки, мочевины, аденозинтрифосфат (АТФ) и другие соединения (Buren and Rubio, 2017). Азот является основным компонентом хлорофилла, важнейшего пигмента, необходимого для фотосинтеза, и играет решающую роль в развитии растений (Bassi et al., 2018). Однако, ни растения, ни животные, ни человек не способны самостоятельно фиксировать данный элемент, несмотря на его достаточное обилие в атмосферном воздухе (порядка 78%).

Существуют микроорганизмы, способные преобразовывать азот атмосферы в усвояемую форму (аммиак) в процессе называемом биологической фиксацией азота. Бактерии могут осуществлять данный процесс как в свободноживущем состоянии (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* и др.), так и в симбиозе с бобовыми растениями (*Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*). Отмечено, что наиболее эффективная азотфиксация происходит при образовании специализированных структур – клубеньков на корнях бобовых, а в отдельных случаях и не бобовых растений (Santi et al., 2013).

Как у свободноживущих азотфиксирующих бактерий, так и у симбиотических регуляция процесса фиксации молекулярного азота находится под контролем комплекса *nif*-генов (от англ. nitrogen fixation) (Rubio, 2002). Данный комплекс кодирует фермент нитрогеназу. Количество генов, необходимых для азотфиксации, сильно варьируется в зависимости от экологической ниши и физиологии бактерии. Кроме этого, наблюдаются различия также и в локализации *nif*-генов в геноме азотфиксирующих микроорганизмов. У клубеньковых бактерий (ризобий) они могут находиться либо на симбиотических

плазмидах *pSym* (*Rhizobium*, *Ensifer*), либо на хромосомных островках (*Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*) (MacLean et al., 2007).

Многими авторами показано, что симбиотические гены активно участвуют в горизонтальном переносе генов (ГПГ), это может приводить к появлению новых азотфиксирующих бактерий, которые до этого не являлись таковыми (Sullivan and Ronson, 1998; Koonin et al., 2001; Bailly et al., 2007; Epstein et al., 2012). Гены нитрогеназного комплекса (*nif*-гены) у клубеньковых бактерий собраны в несколько оперонов. В ходе ГПГ не всегда происходит перенос всех оперонов *nif*-генов и бактерия-реципиент может получать только определенную их часть. Недостающая часть теоретически может быть дополнена приобретением аналогичных генов от других штаммов бактерий, относящихся к одному или разным таксонам. Поэтому большой интерес вызывает взаиморасположение *nif*-генов в геномах ризобий.

Наиболее удобным и показательным для исследования комбинаторной эволюции *nif*-генов представляется использование гена *nifA*, поскольку он не имеет жесткой сцепленности с генами, кодирующими коровую часть нитрогеназы (Boyd et al., 2015). Белок NifA является активатором транскрипции генов нитрогеназного и гидрогеназного комплексов, непосредственно участвующих в процессе азотфиксации (Martinez et al., 2004). Искусственное привнесение данного гена под регуляцией индуцируемого промотора позволит выявить его функциональность в том или ином штамме бактерии по наличию появления у них азотфиксирующей активности в свободноживущем состоянии, которой у диких штаммов большинства ризобий не наблюдается.

Знания о специфичности продукта гена *nifA* среди клубеньковых бактерий позволят в дальнейшем создавать высокоэффективные штаммы ризобий для повышения урожайности различных сельскохозяйственных культур.

Степень разработанности темы исследования

По литературным данным, работы по модификации ризобияльных штаммов с целью улучшения показателей азотфиксации за счет изменения генетической регуляции проводились еще с конца XX в. Тем не менее исследований по изучению регуляции азотфиксации посредством изменения экспрессии *nifA* гена не так много. Так, была описана возможность конститутивной экспрессии данного гена в штаммах *Klebsiella pneumoniae* (Buchanan-Wollaston et al., 1981). Кроме того другими исследователями было выявлено, что подобная искусственная регуляция приводит к изменению уровня азотфиксирующей активности у свободноживущих и ассоциативных diaзотрофов (Kennedy and Robson, 1983; Zhu et al., 1983; Uozumi et al., 1986; Li et al., 1994). Положительное влияние на урожайность сельскохозяйственных культур модифицированных штаммов с конститутивной экспрессией *nifA* было продемонстрировано как на свободноживущем (*Enterobacter gergoviae*), так и на симбиотическом (*Ensifer fredii*) штаммах микроорганизмов (Jieping et al., 2002; An et al., 2007). В дальнейшем был проведен ряд работ по исследованию влияния двух типов промоторов на запуск азотфиксации у штаммов клубеньковых бактерий, в которых было показано, что как конститутивная, так и индуцибельная регуляции экспрессии гена *nifA* среди ризобий приводят к изменению уровня азотфиксации *ex planta* (Иванова и др., 2014; Баймиев и др., 2019b).

Несмотря на проведенные многочисленные исследования в области генетической регуляции азотфиксации, вопрос об универсальности регуляторного гена *nifA* среди представителей клубеньковых бактерий остается открытым. Изучение специфичности действия белка NifA среди ризобий внесет ясность в понимание взаимозаменяемости *nif*-генов, что в свою очередь позволит в дальнейшем целенаправленно создавать высокоэффективные штаммы клубеньковых бактерий, оказывающих положительное влияние как на бобовые, так и на другие сельскохозяйственные культуры.

Цель исследования

Целью работы являлось проведение анализа специфичности продукта гена *nifA* – активатора генов нитрогеназного комплекса – внутри группы клубеньковых бактерий.

В соответствии с поставленной целью работы были сформулированы следующие **задачи исследования**:

1. Провести анализ полиморфизма генов *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий.
2. Создать экспрессирующие конструкции с геном *nifA*, принадлежащим к трем основным родам ризобий (*Rhizobium*, *Ensifer* и *Mesorhizobium*), под управлением индуцируемого промотора на базе плазмиды широкого круга хозяев.
3. Получить рекомбинантные штаммы клубеньковых бактерий с дополнительной копией *nifA* гена.
4. Оценить степень специфичности гена *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий на основании появления азотфиксирующей активности в свободноживущем состоянии у рекомбинантных вариантов штаммов клубеньковых бактерий.
5. Исследовать ростостимулирующее влияние полученных рекомбинантных вариантов штаммов ризобий на сельскохозяйственные культуры.
6. Провести оценку стабильности рекомбинантных плазмид у штаммов клубеньковых бактерий.

Научная новизна

В данной работе впервые проводится исследование специфичности продукта гена *nifA* среди клубеньковых бактерий. Получено 25 рекомбинантных штаммов ризобий, содержащих разные варианты дополнительной копии *nifA* гена

под регуляцией индуцируемого промотора *ParaBAD*. Выявлено, что привнесение активной копии данного гена приводит к появлению азотфиксирующей активности у клубеньковых бактерий *ex planta* вне зависимости от родовой принадлежности гена. Показано, что стабильность привнесенных плазмид в клетках ризобий зависит от их таксономической принадлежности.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Знания о степени специфичности отдельных *nif*-генов или их кластеров у разных таксономических групп клубеньковых бактерий являются весьма актуальными и востребованы мировой наукой как в свете понимания эволюции данных генов у азотфиксирующих бактерий, так и возможности в дальнейшем конструирования наиболее оптимальных сочетаний генов нитрогеназного комплекса для получения хозяйственно-полезных штаммов ризобий.

Методология и методы исследования

Методологическую основу данной работы составил системный подход с применением методов молекулярной биологии и генетической инженерии, статистики, а так же анализа данных отечественной и зарубежной литературы. Основные методы исследования включали: выделение тотальной и плазмидной ДНК бактерий, подбор нуклеотидных последовательностей и химический синтез праймеров, качественную и количественную полимеразную цепную реакцию, электрофоретическое разделение продуктов ПЦР в агарозных гелях, молекулярное клонирование и секвенирование по Сэнгеру, вестерн-блот и дот-блот анализы белков, определение азотфиксирующей активности бактерий ацетиленовым методом.

Положения, выносимые на защиту

1. Ортологи гена *nifA*, полученные из бактерий родов *Rhizobium*, *Ensifer* и *Mesorhizobium*, способны перекрестно активировать экспрессию генов нитрогеназного комплекса у всех перечисленных родов ризобий.
2. Уровень активации генов, кодирующих нитрогеназный комплекс, не зависит от таксономической принадлежности дополнительной экспрессирующей копии гена *nifA* и имеет в большей степени зависимость от штамма бактерии-реципиента.
3. Стабильность рекомбинантных плазмид в штаммах клубеньковых бактерий зависит от их таксономической принадлежности.

Степень достоверности и апробации результатов

Достоверность полученных данных подтверждается воспроизводимостью и многочисленностью проведенных экспериментов, а также наличием положительных и отрицательных контролей. Основные материалы диссертационной работы были представлены на X Всероссийской научной интернет-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии» (Уфа, 2016), III Пущинской школе-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пушино, 2016), 21-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2017), научной конференции и школе молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (Судак, Крым, 2017), международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Уфа, 2018), Всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания» (Иркутск, 2019), IX Всероссийской конференции молодых ученых

«Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2019), второй международной научной конференции PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Саратов, 2020).

Личный вклад автора в проведенные исследования

Определение направления диссертационной работы, цели и задачи исследования проводились автором совместно с научным руководителем д.б.н. Баймиевым Ан.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 исследуемой теме и их написании. Основная часть экспериментальной работы выполнена автором самостоятельно.

Конкурсная поддержка работы

Данная работа проводилась при финансовой поддержке программы РФФИ № мол_а № 18-34-00034 и гранта У.М.Н.И.К. № 12605ГУ/2017.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК, из которых 2 статьи индексируются в международных базах Web of Science и Scopus, 2 – в журнале, индексируемом в Scopus.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа «Исследование функциональной специфичности продукта гена *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий» соответствует паспорту специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки) (пункт 7 «Организация и регуляция работы гена (транскрипция, репликация, рекомбинация, трансляция и др.)). В данной работе была исследована специфичность активации *nif*-генов различными ортологами гена-регулятора *nifA* у клубеньковых бактерий, принадлежащих к родам *Rhizobium*, *Ensifer* и *Mesorhizobium*.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 134 страницах, содержит 7 таблиц и 24 рисунка. Включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список литературы. Библиографический список включает 256 источника, среди них 22 – отечественных, 234 – зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Фиксация атмосферного азота микроорганизмами

Рост и развитие всех живых организмов всецело зависит от усвоения элементов, необходимых для построения и функционирования биологических молекул. Одним из важнейших соединений является азот (N_2), который входит в состав нуклеиновых кислот, белков и других соединений. В атмосферном воздухе содержание азота составляет порядка 78%, однако непосредственного его включения в метаболизм эукариотических организмов не происходит. Это связано с тем, что молекула азота имеет прочную тройную связь, на преобразование которой требуется колоссальное количество энергии (Han et al., 2019). Эукариоты не имеют системы, которая позволяла бы им менее затратно переводить инертный азот в доступный. Данной способностью обладают некоторые почвенные микроорганизмы, которые могут преобразовывать азот в процессе называемом биологической фиксацией азота.

Еще в древности было отмечено, что возделывание бобовых культур в севообороте давало высокие урожаи. В 1838 году Дж. Буссенго предположил, что бобовые растения способны накапливать азот, однако оставалось не ясным как это происходит. В 1886 году Г. Гельригель в своих экспериментах доказал наличие симбиотических азотфиксирующих микроорганизмов и в последующем Герман Уилфарт раскрыл механизм биологической фиксации азота (Galloway, 2013). В начале XX века немецкие химики Ф. Хабер и К. Бош изобрели способ, который позволял фиксировать данный элемент в промышленном масштабе. В этом процессе азот атмосферы восстанавливается до аммиака через реакцию с водородом при высокой температуре и давлении, используя железо как катализатор (Peoples et al., 1995; Erisman et al., 2008). Внесение азота в почву, полученного химическим синтезом, приводило к увеличению урожайности сельскохозяйственных культур. Но также это привело к загрязнению подземных вод, эвтрофикации водоемов, подкислению почвы, что в свою очередь оказывает

влияние на здоровье человека (Smith et al., 1999; Townsend et al., 2003; Lucas et al., 2011; de Vries, 2021).

Биологическая фиксация азота происходит с участием прокариотических микроорганизмов, которые содержат особый фермент – нитрогеназу. Данный фермент способствует преобразованию инертной формы азота в усвояемую (аммиак). Способность фиксировать азот имеет достаточно разнородная группа микроорганизмов, включая гетеротрофные и автотрофные микроорганизмы, такие как *Clostridium* (анаэроб), *Frankia* (аэроб), *Klebsiella* (факультативный анаэроб); хемосинтетические бактерии (*Desulfovibrio*); фотосинтетические микроорганизмы (*Rhodospseudomonas*, *Chromatium*, *Rhodospirillum*).

Энергию необходимую для биологической фиксации азота диазотрофы получают за счет окисления органических источников углерода. Выделяют три основных способа получения органического углерода азотфиксирующими микроорганизмами. Первый – из внешней среды (гетеротрофы). Вторым способом является процесс фотосинтеза, при котором за счет энергии света происходит отделение электронов от молекулы воды, которая затем используется для восстановления CO₂. Третий путь за счет формирования симбиотических отношений между бактериями и растением-хозяином (Inomure et al., 2020).

Большинство азотфиксирующих бактерий относятся к мезофилам и оптимальной температурой для их жизнедеятельности является диапазон от 15°C до 35°C. Кроме этого, они не фиксируют азот при температуре свыше 37°C (Zuberer, 2002). Однако в природе существуют термофильные азотфиксаторы. Например, цианобактерия (*Mastigocladus*), выделенная из горячих источников, способна фиксировать азот при температуре около 60°C (Khumanthem, 2007; Alcaman et al., 2015).

Среди азотфиксаторов выделяют три группы микроорганизмов: свободноживущие, ассоциативные и симбиотические. Такое разделение прокариотических организмов основано на степени близости и взаимозависимости между растением и микроорганизмом (Dixon and Kahn, 2004). Так, свободноживущие азотфиксаторы получают необходимые питательные

элементы непосредственно из почвы, в то время как симбиотические снабжаются полезными соединениями от растения – хозяина, в том числе растение защищает фермент – нитрогеназу от инактивации кислородом. Несимбиотические азотфиксаторы могут фиксировать азот как в анаэробных условиях, так в микроаэрофильных и аэрофильных. Однако у представителей последних имеются специальные системы, которые защищают нитрогеназу от окислительной дезактивации. К примеру, бактерии рода *Azotobacter* способны снижать концентрацию кислорода внутри бактериальной клетки, микроорганизмы рода *Azospirillum* могут фиксировать азот при низких его концентрациях, а у представителей цианобактерий данный процесс происходит в гетероцисте (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000; Kneip et al., 2007).

1.1.1. Свободноживущие азотфиксирующие бактерии

Свободноживущие азотфиксаторы представляют собой прокариотические организмы, которые способны самостоятельно преобразовывать и использовать атмосферный азот. Данная группа бактерий содержит различные гетеротрофные и автотрофные микроорганизмы, включая представителей протеобактерий, цианобактерий, фермикутес и архей (Zhan and Sun, 2011).

Несимбиотические азотфиксирующие бактерии способны к преобразованию атмосферного азота в различных условиях. Так, представители рода *Azotobacter*, *Beijerinckia* и *Derxia* осуществляют данный процесс в аэробных условиях, а бактерии родов *Clostridium* и *Klebsiella* в анаэробных. Кроме этого, азотфиксирующие микроорганизмы способны расти и фиксировать азот в различном диапазоне pH почв: бактерии рода *Beijerinckia*, *Derxia* (pH 4,5-5,2), *Azomonas* (pH 4,3-6,9), бактерии рода *Clostridium* малочувствительны к реакции окружающей среды и развиваются как в щелочных (pH 8-9), так и в кислых (pH 4,5-5,5) почвах. Способностью фиксировать азот в свободноживущем состоянии обладают фотосинтетические бактерии (*Rhodopseudomonas*, *Chromatium*,

Rhodospirillum), хемосинтетические микроорганизмы (*Desulfovibrio*), в том числе и сине-зеленые водоросли (*Anabaena*, *Aulosira*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*) (Сахно, 2007). Эффективность преобразования азота свободноживущими микроорганизмами составляет порядка 1-60 кг N₂ на 1 га в год (Vadakattu et al., 2006; Reed et al., 2011).

1.1.2. Ассоциативные азотфиксаторы

Некоторые diaзотрофные микроорганизмы осуществляют процесс фиксации азота, находясь в ассоциации с высшими растениями без формирования выраженных морфологических структур. К данному типу относятся многие представители различных родов азотфиксирующих микроорганизмов: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Arthrobacter*, *Paenibacillus* и другие (Сахно, 2007).

Ассоциативная азотфиксация происходит как в прикорневом пространстве (ризосфере), на поверхностях корней (ризоплане), а так же и на надземной части (филлосфере) небобовых растений (Pohlman and McColl, 1982; Fürnkranz et al., 2008). Некоторые diaзотрофы, такие как *Azospirillum* sp., *Azoarcus* sp., *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* и *Burkholderia* образуют ассоциативные и / или эндофитные отношения с широким разнообразием корней растений, в том числе зерновых (Franche et al., 2009; Tian et al., 2009; Santi et al., 2013). Однако граница между ассоциативной и эндофитной азотфиксацией не является явной, так как ассоциативные бактерии могут находиться и в тканях растений (Elmerich, 2007). Эндофитные diaзотрофы, колонизируя внутреннюю поверхность корня растения, имеют преимущества перед ассоциативными и свободноживущими diaзотрофами, поскольку эндофитные азотфиксаторы лучше защищены от абиотических и биотических факторов окружающей среды (Cocking, 2003; Reinhold-Hurek and Hurek, 2011). Поступление связанного азота за счет

ассоциативной азотфиксации составляет 2-170 кг/га в год (DeLuca et al., 2002; Herridge et al., 2008; Urquiaga et al., 2012).

1.1.3. Фиксация азота в клубеньках

Микроорганизмы, осуществляющие процесс биологической фиксации азота в симбиозе с бобовыми и небобовыми растениями, называются симбиотическими азотфиксаторами. При таком типе взаимоотношения бактерии имеют благоприятные условия для осуществления данного процесса, а растения получают усвояемую форму азота. Диязотрофные бактерии, участвующие в симбиотических взаимодействиях, включают ризобияльные члены альфа-подгруппы протеобактерий, которые ассоциируются с бобовыми (семейство *Fabaceae*) и небобовыми видами растений *Parasponia* (семейство *Cannabaceae*). Актиноризальные растения способны к развитию эндосимбиоза с азотфиксирующим почвенным актиномицетом *Frankia*. Некоторые растения формируют эндосимбиоз с азотфиксирующими цианобактериями *Nostoc*. Бактерии родов *Chromatium* и *Klebsiella* образуют азотфиксирующий эндосимбиоз с тропическими растениями *Peretta* и *Psichoteria*, формируя листовые клубеньки (Лысак, 2007; Ahmad et al., 2008; Santi et al., 2013; Mus et al., 2016). Симбиотическая азотфиксация является наиболее эффективной и составляет порядка 50-465 кг фиксированного азота на 1 га в год (Van Kessel and Hartley, 2000; Anglade et al., 2015).

Клубеньковые бактерии (ризобии) представляют собой разнородную группу симбиотических микроорганизмов, которые фиксируют атмосферный азот в специализированных структурах – клубеньках, формируемых на корнях бобовых растений. Филогенетически данные микроорганизмы относятся к трем основным классам, в которых выделено 14 родов и более 98 видов клубеньковых бактерий: α – протеобактерии (*Rhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Phylobacterium*, *Devosia*, *Microvirga*,

Methylobacterium, *Shinella*, *Ocrhobactrum*), β – протеобактерии (*Cupriavidus* (*Ralstonia*), *Burkholderia*) и γ – протеобактерии (*Pseudomonas*) (Berada and Fikri-Benbrahim, 2014; Ormeno-Orrillo et al., 2015).

Ризобии имеют в чистой культуре палочковидную форму клеток среднего размера шириной порядка 0,5-0,9 мкм, длиной 1,2-3,0 мкм. По Граму окрашиваются отрицательно, не образуют эндоспоры, хемоорганотрофы. Клубеньковые бактерии обладают подвижностью за счет наличия единственного полярного или субполярного жгутика или от двух до шести перетрихиальных жгутиков (Somasegaran and Hoben, 1994).

Ризобии могут находиться в свободноживущем состоянии в почве и в симбиотическом, когда они вступают в симбиоз с растением (Gibson et al., 2008). Однако осуществлять процесс биологической фиксации азота данные бактерии могут только в симбиозе. Он запускается азотным голоданием растения-хозяина, который секретирует из корня сигнальные молекулы, такие как флаваноиды и бетаины. Они служат для активации экспрессии *nod*-генов, что приводит к синтезу липохитоолигосахаридного сигнала (Nod-фактора), который запускает программу развития клубеньков у растения-хозяина (Walker and Downie, 2000; Oldroyd et al., 2011). Nod-фактор инициирует деформацию корневых волосков, деполяризацию мембран и деление клеток в коре корня, создавая тем самым зачаток меристемы и клубенька. Большинство ризобий проникают в растение через корневые волоски, где в результате инвагинации плазматической мембраны формируется инфекционная нить. Ризобии размножаются в инфекционных нитях и перемещаются по ним к растительным клеткам путем эндоцитоза, формируя симбиосомы, которые в последующем дифференцируются в азотфиксирующие бактериоиды (Глянко и др., 2017; Clua et al., 2018). Редко проникновение бактерий происходит через трещины на поверхности корней некоторых бобовых растений (Maroti and Kondorosi, 2014).

Способность осуществлять симбиотическую фиксацию азота клубеньковыми бактериями характеризуется тремя свойствами: специфичностью, вирулентностью и активностью (эффективностью) (Сытников, 2012). Ризобии

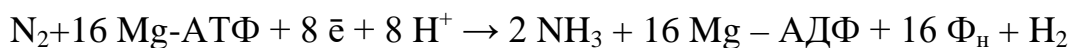
обладают избирательностью (специфичностью) по отношению к растению-хозяину. Выделяют два типа специфичности: широкую и узкую. Широкая избирательность характеризуется способностью «перекрестного заражения» т.е. ризобии гороха могут образовывать азотфиксирующие клубеньки на корнях гороха, бобов, чины, а клубеньковые бактерии чины и бобов образуют азотфиксирующий симбиоз с корнем растения гороха. При узкой специфичности ризобии клевера способны фиксировать азот при заражении растений группы клеверов (видовая специфичность), кроме этого клубеньковые бактерии одного растения могут заражать разные сорта, например, безалкалоидные и алкалоидные сорта люпина (сортовая специфичность). Помимо этого избирательность так же может проявляться на разных стадиях взаимодействия бактерий с растением-хозяином, начиная от прикрепления микроорганизмов и до формирования азотфиксирующих клубеньков (Wang et al., 2011).

Под вирулентностью клубеньковых бактерий понимается их способность проникать, приживаться и размножаться в тканях корня растения-хозяина, с последующим образованием функционирующих клубеньков (Шеманова, 1971). Степень вирулентности ризобий зависит от скорости их проникновения (Тихонович и Завалин, 2016).

Эффективная азотфиксация зависит не только от специфичности и вирулентности штаммов клубеньковых бактерий, но и от их активности. Под активностью подразумевается способность преобразовывать атмосферный азот в усвояемую форму и удовлетворять потребность растения-хозяина в данном элементе. Выделяют три типа штаммов клубеньковых бактерий в зависимости от их эффективности, влияющей на урожайность бобовых культур: неактивные (клубеньки формируются, но фиксации азота не происходит), малоактивные (переходная форма), активные (образуются клубеньки, в которых происходит активная азотфиксация) (Клечковский, 1967).

1.2. Структура и функции нитрогеназы в процессе азотфиксации

Биологическая фиксация азота является динамичным и энергоемким процессом (Rosenblueth et al., 2018). На восстановление одной молекулы атмосферного азота затрачивается 16 молекул АТФ (Flores-Tinoco et al., 2020). Однако энергетические затраты на азотфиксацию могут увеличиваться до 40 моль АТФ у аэробных diaзотрофов, при активном задействовании системы защиты от кислорода (Stam et al., 1984; Hill, 1992). Общая реакция биологической фиксации азота выглядит следующим образом:



Диазотрофы получают энергию для осуществления данного процесса путем окисления органических молекул, которые поступают как извне (нефотосинтезируемые микроорганизмы, ассоциативные и симбиотические азотфиксаторы), так и за счет внутреннего процесса – фотосинтеза (цианобактерии) (Figueiredo et al., 2013).

Нитрогеназа представляет собой сложный двухкомпонентный металлофермент, который катализирует преобразование атмосферного азота в доступную форму – аммиак. Данный фермент обнаружен у филогенетически разнообразных прокариот (у бактерий, архей, включая цианобактерий), а у эукариот он отсутствует.

Ферментный комплекс состоит из двух субъединиц: малой (редуктаза динитрогеназы) и большой (динитрогеназа) (рисунок 1). Динитрогеназа содержит по две субъединицы белка α и β ($\alpha_2\beta_2$), MoFe – кофактор и весит около 240 кДа. Редуктаза динитрогеназы состоит из двух субъединиц белка γ (γ_2) и содержит Fe-кофактор, весом приблизительно 60-64 кДа. Большая субъединица имеет активный центр восстановления азота, малая участвует в гидролизе АТФ и снабжает динитрогеназу электронами от их доноров (ферредоксинов) (Hoffman et al., 2014).

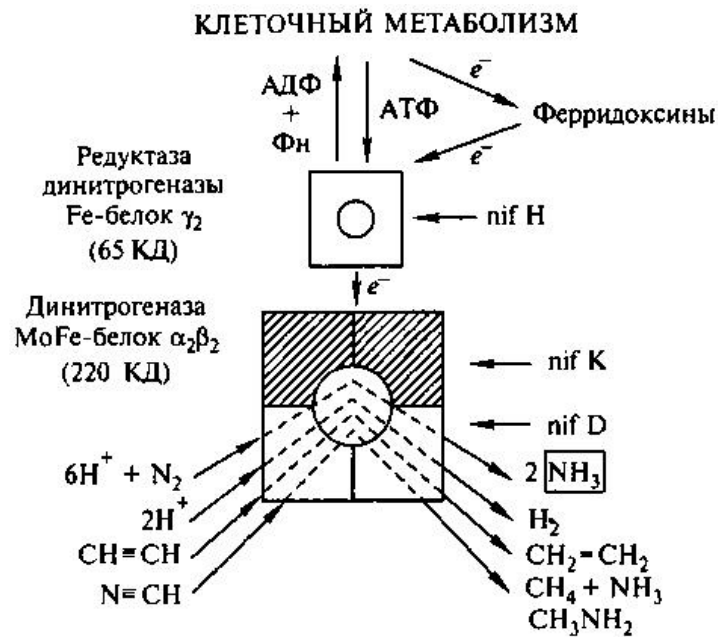


Рисунок 1 – Схематическое изображение структуры и функции нитрогеназы (Тихонович, 2009).

Выделяют три типа нитрогеназ, различающихся по содержанию металлов в активном центре, но имеющие структурное и филогенетическое родство: молибден-содержащая, ванадий-содержащая и железо-содержащая (Joerger et al., 1988; Rubio and Ludden, 2008; Boyd et al., 2011; Dos Santos et al., 2012; Boyd and Peters, 2013). Все три типа данного фермента восстанавливают азот по одному схожему механизму с небольшими вариациями. Мо-нитрогеназа является наиболее изученной из трех форм и более эффективной при восстановлении атмосферного азота (Harris et al., 2018). Ванадиевая нитрогеназа описана у свободноживущих азотфиксирующих микроорганизмов, в том числе и у некоторых цианобактерий. Данный тип фермента способен более эффективно преобразовывать азот при пониженных температурах по сравнению с Мо-нитрогеназой (Hu et al., 2012; Sippel et al., 2017). Fe-нитрогеназа нестабильна и имеет низкую активность по сравнению с двумя другими типами. В основном у diaзотрофов имеется один или два типа нитрогеназы за исключением фотосинтезирующей бактерии *Rhodospseudomonas palustris* CGA009 и свободноживущего азотфиксатора *Azotobacter vinelandii*, которые обладают всеми

тремя типами данного фермента. Так же отмечено, что некоторые азотфиксаторы (*Clostridium pasteurianum*, *Rhodobacter capsulitis*, *Rhodospirillum rubrum* и цианобактерии) в зависимости от содержания металлов в окружающей среде могут кодировать либо Fe-нитрогеназу, либо V-нитрогеназу (Oda et al., 2005).

Все три формы нитрогеназы быстро и необратимо ингибируются кислородом. Такая чувствительность привела к формированию различных стратегий ограничения доступа кислорода к этому ферменту. Некоторые бактерии способны создавать физический барьер на поверхности клетки в виде мукоидной слизи, предотвращающей диффузию кислорода (Sabra et al., 1999). Другая стратегия характерна для некоторых видов рода *Azotobacter*, при которой защита обеспечивается за счет увеличения кислород-зависимой дыхательной активности, снижающей уровень кислорода (Oelze et al., 2000). Такие микроорганизмы как *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhodopseudomonas* используют конформационную защиту: модифицируют фермент таким образом, чтобы сделать его устойчивым к инактивации O₂.

Цианобактерии имеют несколько механизмов защиты (Mehta and Baross, 2006). У некоторых фотосинтетических нитчатых цианобактерий наблюдается клеточная дифференциация: в вегетативных клетках происходит фотосинтетическая продукция кислорода, в специализированных клетках (гетероцистах) работает нитрогеназа. Многие цианобактерии, не образующие гетероцисты, способны разделять два несовместимых процесса, например, фотосинтез происходит днем, а азотфиксация ночью. Штамм ATCC 51142 *Cyanothece* sp. запасает гликоген в течение дня и преобразует азот ночью (Тоерел et al., 2008). Однако такой ритм жизнедеятельности отмечается не у всех негетероцистных цианобактерий. Азотфиксация на протяжении всего светового дня наблюдается у *Gloeothese* и *Synechococcus* sp. У нитчатой океанической цианобактерии *Trichodesmium* процессы фотосинтеза и фиксации азота происходят одновременно, но в разных клетках (Sandh et al., 2009; Kumar et al., 2010; Vothe et al., 2010).

У клубеньковых бактерий защита от ингибирующего действия кислорода с одной стороны обеспечивается за счет физического барьера для диффузии данного элемента формируемым растением, с другой выделяют биохимическую стратегию, при которой синтезируется леггемоглобин (Soto-Urzuа and Vaca, 2001). Леггемоглобин (леггемоглобин, Lb) представляет собой гемопротеин массой 16 кДа, состоящий из гемовой группы и одного полипептида (глобина). Аминокислотная последовательность глобина зависит от вида бобового растения, тогда как гемовая часть одинакова во всех молекулах Lb (Singh and Varma, 2017). Леггемоглобин транспортирует и поставляет кислород к симбиосомам в низкой, но постоянной концентрации, которая обеспечивает эффективное дыхание бактериоидов, предотвращая при этом инактивацию фермента нитрогеназы (Sainz et al., 2015). Это возможно за счет того, что данный белок имеет высокую скорость связывания с кислородом и относительно низкую скорость его диссоциации, вследствие этого Lb поддерживает концентрацию свободного кислорода на уровне около 7-11 нМ (Downie, 2005).

Четвертый тип нитрогеназы был описан для хемолитотрофной бактерии *Streptomyces thermoautotrophicus*, которая обладала резистентностью к кислороду (Ribbe et al., 1997). Данный фермент существенно отличается от других нитрогеназ как по структуре, так и по функции. Компонент динитрогеназы представлен белком MoFeS. Динитрогеназа редуктаза содержит не белок Fe, а марганец супероксид оксидоредуктазу. Кроме этого, данный фермент не способен восстанавливать ацетилен до этилена (Zhao et al., 2006). Однако в более поздних отчетах ставится под сомнение факт фиксации азота *S. thermoautotrophicus* (MacKellar et al., 2016).

1.3. Гены, кодирующие нитрогеназный комплекс (*nif*-гены)

Как у свободноживущих азотфиксирующих бактерий, так и у симбиотических регуляция процесса фиксации молекулярного азота находится

под контролем комплекса *nif*-генов (от англ. nitrogen fixation) (Rubio, 2002). Данный комплекс кодирует фермент нитрогеназу. Для сборки и функционирования ферментного комплекса требуются продукты порядка 20 *nif*-генов (Heller et al., 2014). Структурные субъединицы нитрогеназы кодируются тремя основными генами: *nifH* (белок Fe), *nifD* и *nifK* (компонент MoFe) (Igarashi and Seefeldt, 2003; Wang et al., 2013). Помимо генов, кодирующих основную часть фермента, необходимы так же продукты других *nif*-генов, обеспечивающих сборку функционального фермента. На данный момент на основе генетического и биохимического анализа установлено, что *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifB*, *nifQ*, *nifV*, *nifY* и *nifH* способствуют синтезу и формированию FeMo компонента, *nifU*, *nifS* и *nifZ* участвуют в синтезе металлокластеров, а *nifM* и *nifW* необходимы для созревания нитрогеназы, *nifA* и *nifL* участвуют в регуляции экспрессии *nif*-генов (Roberts et al., 1978; Gavini et al., 2006; Rubio and Ludden, 2008; Hu and Ribbe, 2011).

Расположение кластера *nif*-генов в геноме свободноживущих diaзотрофов и ризобий отличается. У несимбиотических микроорганизмов данные гены локализуются на хромосоме, и их число может варьироваться от 7 до более 50. Кластеры *nif*-генов у клубеньковых бактерий могут располагаться как на хромосоме (*Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*), так и на плазмидах (*Azorhizobium*, *Ensifer*, *Rhizobium*). Количество генов, необходимых для азотфиксации сильно варьирует у свободноживущих бактерий в зависимости от экологической ниши и физиологии бактерии (рисунок 2). Например, в *Klebsiella oxytoca* двадцать *nif*-генов организованы в семь транскрипционных единиц, расположены в кластере размером 24 т.п.н (Arnold et al., 1988), тогда как в *Azotobacter vinelandii* данные гены более рассредоточены и распределены в два кластера (Setubal et al., 2009). *Pseudomonas stutzeri* A1501 содержит 52 *nif*-генов, организованных в 11 NifA- σ^{54} -зависимых оперонов в кластере размером 49 kb (Yan et al., 2010). Однако другие микроорганизмы, фиксирующие азот, имеют более ограниченный набор *nif*-генов, например, *Methanococcus maripaludis* содержит только 9 *nif*-генов, два из которых *nif11* и *nif12* не являются существенными для процесса азотфиксации, но необходимы для регуляции (Dodsworth and Leigh, 2006).

бактерий. У быстрорастущих ризобий, таких как *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* и *R. leguminosarum* bv. *viciae* ген *nifA* находится в симбиотической плазмиде между *fixABC* опероном и *nifB* геном. У медленно растущих *Bradyrhizobium japonicum* данный ген локализован в хромосоме как часть оперона *fixR nifA* (Martinez et al., 2004). Ген *nifA* у свободноживущего азотфиксатора *Azotobacter caulinodans* располагается на расстоянии приблизительно 8 kb перед *nifHDKE* опероном (Fischer, 1994).

В геноме бактерий рода *Rhizobium*, *Ensifer* присутствует одна копия *nifA* гена, однако в медленно растущих ризобиях рода *Mesorhizobium* было выявлено две копии данного гена: *nifA1* и *nifA2*, локализованных на симбиотическом островке. В исследованиях Nakui с соавт. было показано, что белок NifA, запускающий весь каскад реакций, кодируется геном *nifA2* (Nakui et al., 2006). Кроме этого, было отмечено, что штамм *Bradyrhizobium* sp. DAO9 имеет в геноме две копии *nifA* гена, локализованных как в хромосоме (*nifAc*), так и в плазмиде (*nifAp*) (Wongdee et al., 2018).

Продукт гена *nifA* белок NifA является общим активатором транскрипции *nif*-генов у diaзотрофных бактерий. Данный протеин принадлежит к семейству бактериальных энхансер-связывающих белков (EBP) – регуляторов транскрипции, которые активируют экспрессию генов совместно с РНК-полимеразой, содержащей специализированный фактор σ^{54} (RpoN), что позволяет ядру полимеразы распознавать промоторы типа -24/-12 (Martines et al., 2004). NifA имеет трехдоменную структуру, типичную для других σ^{54} -зависимых активаторов транскрипции. N-концевой домен является сигнальным мотивом и содержит GAF, который является общим доменом для нескольких циклических рецепторов GMP (Ho et al., 2000). Центральный домен взаимодействует с σ^{54} – РНК-полимеразой и обладает АТФазной активностью, что способствует реструктуризации своих субстратов за счет гидролиза нуклеотидов (Neuwald et al., 1999). В σ^{54} -зависимых активаторах этого консервативного участка достаточно для нуклеотид-зависимых взаимодействий, которые управляют образованием открытого промоторного комплекса (Berger et al., 1994; Barret et al., 2001; Chaney et al., 2001). С-концевой

домен имеет мотив спираль-поворот-спираль (НТН-мотив, Helix-Turn-Helix), участвующий в связывании ДНК (Ray et al., 2002).

NifA взаимодействует с ДНК в промоторной области UAS (с англ. *upstream activating sequence*) с консенсусной последовательностью TGT-N₁₀-ACA, расположенной в положении от -80 п.н. до -150 п.н. выше сайта инициации транскрипции (Martinez et al., 2008; Tsoy et al., 2016). Данный белок работает в ассоциации с σ^{54} -фактором РНК полимеразы (RpoN). RpoN распознает промоторную область в положении -24/-12, содержащей последовательность TGGCACG-N₄-TTGCW (G и C, расположенные относительно сайта начала транскрипции в положении -24 и -12, соответственно) (Sullivan et al., 2013). Взаимодействие NifA и холофермента РНК-полимеразы происходит посредством образования петли (рисунок 3). Это необходимо для установления продуктивных взаимодействий между белком-регулятором и полимеразой. Во многих случаях в формировании петли принимают участие ДНК-связывающие белки, такие как факторы интеграции хозяина (INF), располагающиеся между UAS сайтом и коровой промоторной областью. Связывание NifA с холоферментом с последующим гидролизом нуклеотидов и образованием открытого комплекса способствует началу транскрипции. В отсутствие ЕВР холофермент РНК-полимераза σ^{54} образует замкнутые промоторные комплексы, которые редко подвергаются спонтанной изомеризации с образованием открытых комплексов (Dixon and Kahn, 2004).

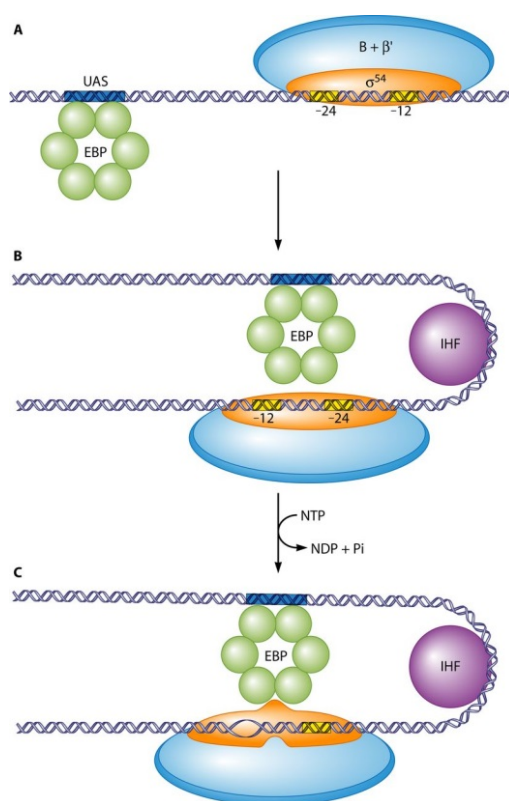


Рисунок 3 – Взаимодействие энхансер связывающего белка (EBP) с молекулой ДНК (Bush and Dixon, 2012).

1.4. Генетическая регуляция азотфиксации у микроорганизмов

Несмотря на важность и интерес исследователей к азотфиксации микроорганизмами, регуляция этого процесса описана лишь у небольшого числа diaзотрофов. Азотфиксирующие микроорганизмы имеют сложную и высокоэффективную регуляторную систему для получения и преобразования атмосферного азота (Гуменко и др., 2017). Регуляторные сети обладают значительной пластичностью, которые различаются от вида к виду в зависимости от физиологии хозяина. У diaзотрофных микроорганизмов, в том числе и ризобий, процесс фиксации азота представляет собой многоступенчатый процесс и регулируется на транскрипционном, посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях в ответ на изменения условий окружающей среды (рисунок 4).

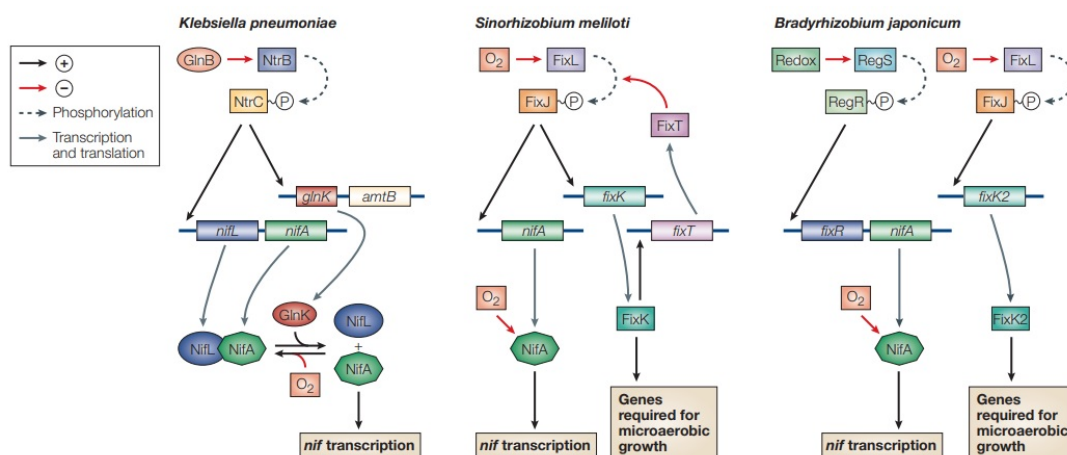


Рисунок 4 – Схема регуляторных каскадов, контролирующих транскрипцию *nif*-генов у свободноживущих и симбиотических азотфиксаторов (Dixon, 2004).

1.4.1. Транскрипционный уровень регуляции азотфиксации

Реализация генетической информации посредством транскрипции находится под строгим контролем, что позволяет всем организмам адекватно и эффективно отвечать на изменение окружающей среды. Процесс транскрипции осуществляется за счет наличия в клетках фермента РНК-полимеразы, содержащее минимальное ядро из пяти субъединиц: $\alpha_2\beta\beta'\omega$ (Werner and Grohmann, 2011; Sutherland and Murakami, 2018). Для распознавания промоторного сайта и инициации транскрипции необходимо участие дополнительного диссоциируемого сигма фактора (σ -фактор). Присоединение данного фактора к ферменту придает генную специфичность, направляя РНК-полимеразу на определенный набор генов и тем самым, снижает вероятность связывания фермента с неспецифическими последовательностями, а так же опосредует событие плавления дуплекса ДНК (Buck et al., 2000).

Основной сигма-фактор, который отвечает за транскрипцию большинства генов в нормальных условиях, принадлежит семейству σ^{70} . Кроме этого, имеется еще одно отдельное семейство σ^{54} , белки которого активируются в ответ на изменения в окружающей среде. Регуляция транскрипции у данных классов сигма-факторов различается. Холофермент σ^{70} распознает промоторные сайты в -

35 (TTGACA) и -10 (TATAAT) положениях перед сайтом начала транскрипции и может спонтанно изомеризоваться из закрытого комплекса в открытый (Paget and Helmann, 2003; Bush and Dixon, 2012). Белки σ^{54} распознают отдельные промоторные мотивы, расположенные в положениях -24 (GC) и -12 (TGC), и требуют присутствия активатора, который связывает энергию, генерируемую гидролизом АТФ с последующей изомеризацией замкнутого комплекса (Schumacher et al., 2004).

Количество копий гена *rpoN*, кодирующего сигма-фактор РНК-полимеразы, среди клубеньковых бактерий отличается. Единичную копию данного гена содержат *S. meliloti* и *R. leguminosarum* bv. *viciae* штамм VF39SM (Ronson et al., 1987; Clark et al., 2001). В геноме бактерий *R. etli*, *M. loti* и *B. japonicum* обнаружено по две копии гена *rpoN* (*rpoN1* и *rpoN2*), активация которых зависит от условий окружающей среды (Sullivan et al., 2013). Ген *rpoN1* у *R. etli* локализуется в хромосоме и необходим для метаболизма C4-дикарбоновых кислот, азотсодержащих соединений во время свободноживущего роста, в то время как второй ген найден на симбиотической плазмиде и участвует при симбиотической азотфиксации (Michiels et al., 1998). Кроме этого, данные варианты гена могут функционировать в обоих условиях, что характерно для бактерий *B. japonicum* (Kullik et al., 1991).

У свободноживущих и симбиотических микроорганизмов большинство *nif*-генов на транскрипционном уровне активируются энхансер-связывающим белком NifA вместе с сигма-фактором (σ^{54}) РНК-полимеразы. Экспрессия данного белка и, во многих случаях, его активность контролируется регуляторными каскадами, которые реагируют на различные сигналы окружающей среды, но в основном на концентрацию кислорода и аммония во внешней среде.

Выделяют четыре белка, регулирующих фиксацию азота в ответ на содержание кислорода: FixL, RegB (так же известный как PrrB, RegS, ActS в различных системах), NifL и NifA. У симбиотических бактерий FixL (гистидинкиназа) и NifA обеспечивают иерархический ответ на концентрацию кислорода. У других diaзотрофов NifA не реагирует напрямую на кислород, но

его активность регулируется флавопротеином (NifL), который определяет окислительно-восстановительный статус. Гистидиновая протеинкиназа RegB и ее гомологи реагируют на окислительно-восстановительный потенциал через активный цистеин и могут воспринимать поток электронов через высокоаффинную оксидазу *cbb3*-типа (Dixon and Kahn, 2004).

Форма азота у протеобактерий определяется белками передачи сигнала РII (GlnB и GlnK), которые воспринимают различные метаболические сигналы, включая уровни глутамина, 2-оксоглутарата, АДФ, АТФ (Merrick and Edwards, 1995; Ninfa and Jiang, 2005; Huergo et al., 2013; Forchhammer and Lüddecke, 2016). В зависимости от уровня азота в среде данные белки подвергаются посттрансляционной модификации (Zhang et al., 2010).

У клубеньковых бактерий регуляция транскрипции гена *nifA* зависит от концентрации кислорода в отличие от свободноживущих азотфиксаторов, у которых экспрессия данного гена отвечает на уровни азота (Dixon and Kahn, 2004; Martinez et al., 2004). У ризобий имеется несколько систем восприятия кислорода. Первая система включает сенсорную киназу FixL, образующую двухкомпонентную систему (TCS) с белком приемником FixJ (Torres et al., 2011). Белок FixL непосредственно воспринимает кислород, который связывает группу гема в сенсорном домене и инактивирует киназную активность (Rey and Harwood, 2010; Sousa et al., 2016). В микроаэробных условиях FixL фосфорилирует FixJ, что, в свою очередь, индуцирует экспрессию гена фактора транскрипции FixK. Последний запускает экспрессию нижележащих генов путем связывания с мотивом «анаэробокса» (TTGAT-N4-ATCAA) выше их промоторов. У *Sinorhizobium meliloti* 1021 гены *fixL* и *fixJ* кодируются в опероне симбиотической плазмиды *pSymA*. Ген *fixL* кодирует гистидинкиназу, которая прикрепляется к клеточной мембране, а он в свою очередь, регулируется концентрацией кислорода и активностью антикиназного регулятора FixT (Reyes-González et al., 2016).

Вторая система регуляции основана на гибридном варианте белка FixL (hFixL). Некоторые ризобии, например, *R. etli* CFN42 и *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 не имеют ген *fixJ* и используют альтернативный регуляторный каскад,

состоящий из гибридной гистидинкиназы hFixL и регулятора ответа FxkR аналогичного FixJ и FixKf (Zamorano-Sanchez et al., 2012). Ген *hFixL* расположен на плазмиде *pCFN42f* в области, содержащей копии генов *fixK*, *fixNOQP* и *fixG*, которые повторяются в симбиотической плазмиде (Patschkowski et al., 1996; Girard et al., 2000). У клубеньковой бактерии *R. etli* *hFixL* инициирует регуляторную цепь генов *fix* в координации с FxkR – новым регулятором ответа, который принадлежит к семейству OmpR / PhoB и без участия FixJ (Zamorano-Sánchez et al., 2012). В *R. etli* CFN42 белок FxkR непосредственно активирует экспрессию гена *fixKf* в ответ на низкую концентрацию кислорода путем связывания со специфической последовательностью К-боксом (GTTACA-N₄-GTTACA), расположенным в регуляторной области гена *fixKf* (Reyes-González et al., 2016).

Третья система восприятия кислорода основана на факторе транскрипции EnrN. Он определяет кислород через кластер железо-сера. В отличие от FixK, его N-конец богат цистеином, что делает данный белок прямым сенсором кислорода. EnrN инициирует транскрипцию *fixNOQP* и *fixGHIS* (Patschkowski et al., 1996; Voesten and Priefer, 2004).

В азотфиксирующем микроорганизме могут присутствовать как одна система, так и несколько. Наличие в бактериальной клетке двух систем EnrN и FixLJ-FixK объясняется различной субклеточной локализацией кислород-чувствительных структур в этих системах. При этом FixL или hFixL воспринимает внеклеточный кислород, а EnrN – внутриклеточный. Каскадное регулирование дает большое время отклика по сравнению с таковым с помощью однокомпонентного регулятора. Так регуляция системой FixLJ-FixK используется для более медленного и длительного ответа на содержание внеклеточного кислорода, а EnrN применяется для быстрой реакции на изменения концентрации внутриклеточного O₂ (Tsoy et al., 2016).

У бактерий *Bradyrhizobium japonicum* присутствуют два взаимосвязанных регуляторных каскада, реагирующих на концентрацию кислорода – FixLJ-FixK2 и RegS-RegR-NifA (Sciotti et al., 2003). При содержании кислорода не более 5%

происходит индукция генов, контролируемых каскадом FixL-FixJ, с последующей активацией транскрипции *fixk2*. Последний запускает экспрессию регуляторных генов: *rpoN1*, *fixK1*, *nnrR* (Mesa et al., 2003; Mesa et al., 2008). Каскад RegS-RegR-NifA индуцирует экспрессию оперона *fixR-nifA* при очень низкой концентрации кислорода (менее 0,5%) (Torres et al., 2011) (рисунок 4).

Регуляция азотфиксации на уровне транскрипции у представителей бактерий рода *Mesorhizobium* отличается от других видов ризобий. Особенность бактерий *M. loti* в том, что они в своем геноме содержат две копии *nifA* гена (*nifA1* и *nifA2*), располагающихся на симбиотическом островке (Nukui et al, 2006). Гена *nifA1* наиболее схож как по структуре, так и по расположению в геноме (между *fix* и *nifB*) с данным геном *R. leguminosarum*, *R. etli* и *S. meliloti*. Второй ген не располагается рядом с известными генами азотфиксации и имеет сходство с *B. japonicum* (Sullivan et al., 2002). Инициация экспрессии *nif*-генов у *M. loti* происходит по другому механизму без участия регуляторов FixJ, FixK, RegS. Ген *nifA1* находится под регуляцией гена *nifA2* (рисунок 5). Последний находится под управлением регулятора FixV, который является членом семейства LacI/GalR. Как предполагается активация FixV происходит в ответ на производное инозитола, продуцируемое растениями (Sullivan et al., 2013).

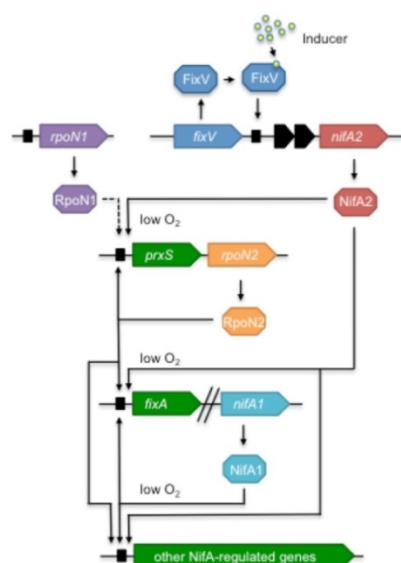


Рисунок 5 – Схема регуляторных каскадов, контролирующих транскрипцию *nif*-генов у *Mesorhizobium loti* (Sullivan et al., 2013).

Развитие молекулярно-биологических технологий в XX в. позволило изучать структуры различных генов и их регуляцию. Исследования генетической регуляции биологической азотфиксации были начаты с 70-х годов и ведутся по настоящее время. В 1970 году была опубликована работа, в которой впервые была описана возможность целенаправленного получения азотфиксирующих бактерий за счет переноса кластера *nif*-генов от *Klebsiella oxytoca* в *E. coli*. Модифицированные штаммы *E. coli* фиксировали азот в незначительном количестве (Dixon and Postgate, 1972). В дальнейшем активно проводились различные исследования в этом направлении (Temme et al., 2012; Wang et al., 2013; Smanski et al., 2014; Han et al., 2015; Li et al., 2016). Получение азотфиксирующих микроорганизмов за счет переноса кластеров *nif*-генов была так же продемонстрирована на недiazотрофных цианобактериях (Tsujimoto et al., 2018).

В начале 80-х годов Buchanan-Wollaston с соавт. показали конститутивную экспрессию гена *nifA* в штаммах *Klebsiella pneumoniae*, активация которого происходила даже в присутствии кислорода и азота (Buchanan-Wollaston et al., 1981). В дальнейшем было выявлено, что продукт гена *nifA* *K. pneumoniae* может активировать экспрессию *nif*-генов у других свободноживущих бактерий (Kennedy and Robson, 1983).

Практический интерес использования результатов подобных исследований заключается в получении высокоэффективных азотфиксирующих микроорганизмов, которые повышают урожайность различных сельскохозяйственных культур. К примеру, было показано, что применение модифицированного штамма *Enterobacter gergoviae* за счет конститутивной экспрессии гена *nifA*, приводило к увеличению роста кукурузы (An et al., 2007).

1.4.2. Посттранскрипционная регуляция фиксации азота

Генетическая регуляция процесса преобразования азота у микроорганизмов также обеспечивается на стадии экспрессии *nif*-генов на уровне РНК. Посттранскрипционная регуляция азотфиксации осуществляется с участием шаперонов Hfq. Данные белки имеют гексамерную структуру и взаимодействуют с малыми регуляторными РНК (sRNA) в одноцепочечных областях богатых аденином (ARN), тем самым облегчая малым РНК связывание с их мРНК-мишенями. Также Hfq может способствовать образованию дуплекса за счет увеличения локальной концентрации мРНК и ее мишени, изменения структуры РНК (Barra-Bily et al., 2010). Данные шапероны предположительно связываются с двумя ARN-мотивами (AAAAAG и AAGACG), которые были обнаружены в области гена *fixL* (Gao et al., 2016). Поскольку в симбиотических условиях Hfq связывается с транскриптами генов *fixL* и *fixJ*, то вероятно регуляция генов *nifHDK* у *Sinorhizobium meliloti* осуществляется через FixLJ (Bobik et al., 2006; Gong et al., 2006).

Посттранскрипционная регуляция экспрессии гена *nifA* у *R. leguminosarum* bv. *viciae* происходит с участием Hfq и РНКазы E. Предполагается, что Hfq способствует стабилизации транскриптов и сворачиванию 5'-нетранслируемой области транскрипта *nifA* в структуру восприимчивую к расщеплению РНКазой E (Zhang and Hong, 2009). Данный способ регуляции обнаружен также у других diaзотрофных микроорганизмов: *Azorhizobium caulinodans*, *Rhodobacter capsulatus* (Kaminski et al., 1994; Drepper et al., 2002).

Некодирующие РНК (нкРНК) на посттранскрипционном уровне регулируют различные физиологические процессы в бактериальных клетках. В работе Zhan с соавт. было впервые описано, что нкРНК (NfiS) участвует в регуляции процесса фиксации азота в *Pseudomonas stutzeri* A1501. Однако у других diaзотрофных микроорганизмов этого не было отмечено (Vercauysse et al., 2010; Torre-Quesada et al., 2014; Huerta et al., 2016). Авторы предполагают, что действие этой нкРНК контролирует активность нитрогеназы на посттранскрипционном уровне как

непосредственно за счет регуляции мРНК и *nifK* гена, так и опосредованно через регуляторный каскад RpoN-NtrC-NifA (Zhan et al., 2016).

1.4.3. Посттрансляционный уровень регуляции азотфиксации

Контроль активности нитрогеназы на посттрансляционном уровне был обнаружен у ряда азотфиксирующих микроорганизмов, позволяющий регулировать активность нитрогеназы в соответствии с изменениями в окружающей среде. Дiazотрофы имеют различные стратегии регуляции азотфиксации на данном уровне.

Наиболее изученным механизмом регуляции работы нитрогеназы является процесс обратимого ADP-рибозилирования димера динитрогеназредуктазы с участием ферментов DraT и DraG (Moure et al., 2013). Такая стратегия была описана у *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Azospirillum brasilense*, *A. lipofenum* и *Chromatium vinosum* (Halbleib and Ludden, 2000). ADP-рибозилирование белка NifH нарушает контакт между компонентами нитрогеназы (NifH и NifDK), тем самым блокируя реакцию переноса электрона, которая необходима для восстановления азота (Huergo et al., 2012).

Экспрессия *nif*-генов контролируется на посттрансляционном уровне в ответ на доступность аммония. У протеобактерий концентрация азота в окружающей среде определяется PII белками, такими как GlnB и GlnK. В зависимости от содержания азота в окружающей среде белки GlnB и GlnK подвергаются посттрансляционной ковалентной модификации ферментом GlnD (уридилтрансфераза) (Zhang et al., 2010).

У *K. pneumoniae* активация *nifLA* промоторов происходит через двухкомпонентную систему NtrB-NtrC. В условиях недостатка азота уридилированный белок GlnB запускает сенсорную киназу NtrB, которая фосфорилирует NtrC. Фосфорилированная форма NtrC действует как транскрипционный активатор *nifA*, *glnA* и других оперонов, участвующих в

фиксации и ассимиляции азота (Zhang et al., 2005). В условиях избытка азота второй белок GlnK в *Rhodospirillum rubrum* (GlnZ у *A. brasilense*) опосредует образование тройного комплекса между AmtB, GlnZ и DraG, что в последующем приводит к ингибированию нитрогеназы. Количество гомологов белка РII среди представителей протеобактерий варьируется от одного (*Azotobacter vinelandii*) до двух (*E. coli*, *K. oxytoca*) и даже трех (*R. rubrum* и *Azoarcus olearius*). У свободноживущих диазотрофных бактерий, обладающих регуляторной системой NifL-NifA, РII-подобный белок GlnK регулирует активность NifA с помощью совершенно разных механизмов, демонстрируя пластичность белок-белковых взаимодействий в этих системах (Batista and Dixon, 2019). Такое присутствие различных гомологов данного белка позволяет осуществлять каскадное регулирование, где каждый белок РII взаимодействует с разными мишенями для выполнения различных функций.

Посттрансляционная регуляция азотфиксации также осуществляется с участием шаперонов, которые обеспечивают правильную сборку белков. У *Bradyrhizobium japonicum* выявлено пять генов *groESL*, один из которых (*groESL3*) транскрибируется с промотора σ^{54} . Продукт этого гена участвует в сборке белка NifA (Fischer et al., 1993). Кроме этого, регуляция преобразования азота на данном уровне так же осуществляется посредством защиты нитрогеназы от инактивирующего действия кислорода с участием белков-ферредоксинов. У *A. vinelandii* и *Gluconacetobacter diazotrophicus* белки FeSII и FdxD осуществляют конформационную защиту фермента посредством нековалентного связывания с Мо-нитрогеназой (Hoffmann et al., 2014).

1.5. Горизонтальный перенос генов в группе клубеньковых бактерий

Геном ризобий обладает высокой пластичностью, что позволяет данным микроорганизмам адаптироваться к различным условиям окружающей среды (Boussau et al., 2004; Tian et al., 2012). Формирование приспособленности

происходило как в результате рекомбинационных процессов, так и за счет горизонтального переноса генов между различными формами ризобий. При исследовании хронологии эволюции и геномной пластичности было выявлено, что гены *nod* и *nif* неоднократно приобретались среди клубеньковых бактерий (Wang et al., 2020). Кроме этого, геном ризобий содержит высокую долю повторяющихся последовательностей ДНК и IS-элементов. Также у ризобий встречаются протяженные участки ДНК, ограниченные прямыми повторяющимися последовательностями, и потенциально способные к амплификации посредством *recA*-зависимой рекомбинации (Provorov and Vorobev, 2000).

Горизонтальный перенос генов (ГПГ) играет важную роль в биологическом разнообразии и экологии бактерий, способствуя их адаптации к окружающей среде и конкурентоспособности (Polz et al., 2013). Благодаря ГПГ микробы приобретают функционально полезные гены и могут утрачивать некоторые другие (Шестаков и Карбышева, 2017). Первый эксперимент, проведенный Гриффитсом в 1928 году, показал возможность переноса детерминант вирулентности между пневмококками у инфицированных мышей (Griffith, 1928). Данное явление, как было показано позже, опосредованно поглощением генетического материала (ДНК) в процессе называемом трансформацией (Thomas and Nielsen, 2005).

Процесс ГПГ между бактериями осуществляется тремя основными способами: трансформацией (поглощение свободной ДНК), трансдукцией (передача гена, опосредованная бактериофагами) и конъюгацией (перенос генов с помощью плазмид или интегративных конъюгативных элементов). Мобильные генетические элементы (МГЭ) такие как плазмиды, бактериофаги, интегративные конъюгативные элементы, транспозоны, элементы IS, интегроны, генные кассеты и геномные острова являются важными транспортными средствами в последних двух процессах (Heuer and Smalla, 2007).

Геном ризобий является многокомпонентным и содержит в себе кольцевую хромосому и набор плазмид размер которых варьирует от 100 kb и свыше 2Mb.

Количество последних среди клубеньковых бактерий может варьироваться. Так, например, *Sinorhizobium meliloti* 1021 имеет одну хромосому и две большие плазмиды: *pSymA* (1,4 Mb) и *pSymB* (1,7 Mb) (DiCenzo et al., 2013); в геноме *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 и *R. etli* CFN42 выявлено шесть плазмид (Young et al., 2006), а бактерии рода *Mesorhizobium* sp. имеет одну или две плазмиды с высокой молекулярной массой более 200 т.п.н. (Kaneko et al., 2000; Haskett et al., 2016). Кроме того, другие крупные ризобийные плазмиды несут "полезные" гены, обеспечивающие конкурентоспособность в ризосфере, к примеру гены, кодирующие продукцию бактериоцина, производство липополисахаридов и экзополисахаридов (Ding and Hynes, 2009).

Плазмиды ризобий являются гетерогенными по содержанию и размеру генов и не обладают синтением даже у близкородственных видов кроме генов, кодирующих репликацию плазмид и симбиотические свойства. Выявлено, что у некоторых видов, таких как *R. leguminosarum*, содержание плазмид составляет 35% от общего генома (Mazur and Koper, 2012). В том числе, в геноме штамма *S. meliloti* плазмидная ДНК составляет 45% от общего генома (Lagares et al., 2014). Плазмиды обнаруживаются примерно у 24% бактерий рода *Bradyrhizobium* по сравнению с ризобиями родов *Rhizobium* и *Ensifer*, где наличие плазмид является обычным явлением (Cytryn et al., 2008; Lopez-Guerrero et al., 2012; Mazur and Koper, 2012). Кроме симбиотических мобильных генетических элементов ризобии имеют в составе своего генома криптические плазмиды (non-pSym), имеющие определенные генетические области, которые принимают участие в генетических перестройках способствующих преимуществам адаптации. Размер данных плазмид варьируется от 7 kb до 260 kb (Barran et al., 2001; Galardini et al., 2011).

Обмен генетическим материалом посредством конъюгации играет основную роль в эволюционном развитии ризобий. Система конъюгации включает перенос ДНК и репликацию Dtr-компонента, кодируемый *tra* геном и cis-активным сайтом oriT, также компонент формирующий спаривание (Mdf), за который ответственны *trb* гены (Ding and Hynes, 2009). Информации о конъюгационных механизмах переноса плазмид между клубеньковыми

бактериями недостаточно. Однако были описаны несколько групп плазмид, в которых содержится набор функциональных генов, необходимых для осуществления конъюгации.

К первой группе относятся плазмиды, репликация которых регулируется системой «QuorumSensing» (QS). Данный регуляторный механизм зависит от плотности популяции бактерий. Клетки продуцируют сигнальную молекулу в основном гомосерин-лактон, которая выделяется в окружающую среду и там накапливается в зависимости от плотности клеточной популяции. При увеличении плотности клеток гомосерин-лактон диффундирует обратно в клетки и образует комплекс с регуляторами транскрипции. Такой комплекс способен вызывать различные ответы включая экспрессию генов, необходимых для переноса плазмиды (Nealson et al., 1970). У некоторых представителей клубеньковых бактерий данной системой регулируется передача не только симбиотических плазмид. Кроме этого, например, плазида *CNF42 R. etli* может передаваться не прямым способом, а посредством коинтеграции с регулируемой QS плазмидой *pREt42* (Brom et al., 2004).

Во второй группе выделяют плазмиды, перенос которых зависит от системы RctA-RctB. Сверхэкспрессия *rctB* гена приводит к активации *dtr* и *mpf* генов с последующим переносом генетического материала из одной бактериальной клетки в другую. Ген *rctA* является репрессором данного процесса, и его активация происходит в неблагоприятных условиях окружающей среды (Perez-Mendoza et al., 2005; Nogales et al., 2013). При этом регуляция данного процесса может отличаться среди клубеньковых бактерий. Например, в плазмиде *pSymA S. meliloti* экспрессия гена *rctB* контролируется генами *rctR* и *rctC*, которые отсутствуют у *R. etli*.

На основе филогенетического анализа последовательностей генов *traA* и *traG* выделяют еще третью и четвертую группы регуляции (Ding and Hynes, 2009; Ding et al., 2013; Torres Tejerizo et al., 2014; Wathugala et al., 2020). К третьему типу относятся плазмиды, имеющие гены, необходимые для переноса и репликации ДНК, но которые не способны к самоконъюгации. Четвертая группа

представлена плазмидной ДНК, имеющей отличный механизм регуляции передачи, который был описан для *pSym* (*pRL5JI*) штамма ТОМ и non-*pSym* различных видов клубеньковых бактерий. Кроме этого, некоторые плазмиды вовлекаются в процесс конъюгации в присутствии трансмиссивных плазмид либо путем коинтеграции, либо с помощью транс-вспомогательных механизмов (Cervantes et al., 2011).

На данный момент имеются данные, свидетельствующие о горизонтальном переносе генов среди клубеньковых бактерий, а также между микроорганизмами, которые относятся к разным таксонам (Sullivan and Ronson, 1998; Koonin et al., 2001; Bailly et al., 2007; Epstein et al., 2012; Andrews et al., 2018). В 1998 году в своей работе Sullivan & Ronson сообщили о переносе симбиотического острова размером 500 т.п.н. *Mesorhizobium loti* ICMP3153 в несимбиотические штаммы бактерий рода *Mesorhizobium*, превращая исходные сапрофиты в симбиотические бактерии (Sullivan and Ronson, 1998). Подобные результаты были описаны Rogal с соавт., где несимбиотическая почвенная бактерия *Ensifer adhaerens* стала способна образовывать клубеньки на фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) и леуцены светлоглазкой (*Leucaena leucosephala*) за счет приобретения *pSym* от *R. tropici* CFN299 (Rogal et al., 2001). Также было показано, что штамм *S. fredii* GR64 несет конъюгирующую плазмиду *pSfr64a*. Данная плазида имеет в своем составе большой сегмент, подобный *R. etli pSym*, включая репликацию, но не связанные с симбиозом гены, другой сегмент, схожий *pRet42a*, содержащий область переноса, а также третий сегмент, аналогичный хромосоме *S. fredii* NGR234 (Cervantes et al., 2011). Обнаружение генов *B. japonicum* в штаммах *B. elkanii* и *S. fredii* указывает на то, что ГПГ островков симбиоза возможен не только внутри вида, но и между родами клубеньковых бактерий (Barcellos et al., 2007). Кроме этого, было выявлено, что переход функционирования нитрогеназы из бескислородной среды в аэробную был опосредован приобретением *nif*-генов в процессе ГПГ (Boyd et al., 2015).

Биологическая фиксация азота осуществляется почвенными микроорганизмами, которые в своем геноме содержат оптимальный набор *nif*-генов, кодирующих фермент – нитрогеназу.

Регуляция процесса фиксации азота на генетическом уровне представляет собой сложный механизм и отличается между бактериями. Тем не менее, активация экспрессии генов, кодирующих нитрогеназный комплекс, происходит по единой стратегии. Как у свободноживущих азотфиксаторов, так и у клубеньковых бактерий на транскрипционном уровне запуск работы *nif*-генов происходит с участием энхансер-связывающего белка NifA.

На данный момент известно, что симбиотические гены активно участвуют в горизонтальном переносе генов не только между штаммами одного вида, но и между микроорганизмами разных таксонов. В ходе ГПГ не всегда происходит перенос всех оперонов *nif*-генов, и бактерия-реципиент часто получает только определенную их часть. Недостающая часть теоретически может быть дополнена приобретением аналогичных генов от других штаммов бактерий, относящихся к одному или разным таксонам. Поэтому большой интерес вызывает взаиморасположение *nif*-генов в геномах клубеньковых бактерий. Наиболее удобным и показательным для исследования взаимозаменяемости определенных *nif*-генов представляется использование гена *nifA*.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В данной работе объектами исследования служили штаммы бактерий из коллекции «Симбионт» ИБГ УФИЦ РАН, изолированные из клубеньков дикорастущих бобовых растений Южного Урала, относящиеся к трем трибам (таблица 1). Штамм *Pseudomonas* sp. K749 из коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН был использован в качестве контроля.

Таблица 1 – Бактериальные штаммы, использованные в работе

Триба	Название растения	Штамм
<i>Fabeae</i>	Горошек лесной (<i>Vicia sylvatica</i> L)	VSyl1, VSyl3, VSyl7, VSyl8
	Чина гороховидная (<i>Lathyrus pisiformis</i> L)	LPis4
<i>Trifolieae</i>	Люцерна хмелевидная (<i>Medicago lupulina</i> L)	MLu2, MLu10
<i>Loteae</i>	Лядвенец рогатый (<i>Lotus corniculatus</i> L)	LZh1, LZh3

В экспериментах по клонированию применялись штаммы ризобий и *E. coli* – NEB10, плазида широкого круга хозяев – *pJN105*. При создании экспрессионных конструкций использовались целевые гены, кодирующие белок – активатор транскрипции *nif*-генов (*nifA*). Данные гены были выделены из штаммов клубеньковых бактерий, принадлежащим к трем основным родам ризобий: *Rhizobium*, *Ensifer* и *Mesorhizobium*.

2.2. Методы исследований

2.2.1. Создание рекомбинантных плазмид

На первом этапе создания рекомбинантных векторов с геном *nifA* из штаммов ризобий VSy17, MLu2 и LZh1 выделяли ДНК. Методом ПЦР нарабатывались амплификаты данного гена. Праймеры были подобраны таким образом, что в ДНК были необходимые сайты рестрикции (см. раздел 2.2.4). Вектор *pJN105* линейризовался по сайту *SmaI*. Полученные амплификаты и фрагменты рестрикции проверялись с помощью метода аналитического геле-электрофореза (см. раздел 2.2.6). Лигирование вектора и *nifA* гена осуществляли с использованием T4 ДНК-лигазы (см. раздел 2.2.9). Далее получали рекомбинантные штаммы *E. coli* методом химической трансформации с использованием лигазной смеси (см. раздел 2.2.11; 2.2.12). При помощи методов ПЦР и секвенирования осуществляли проверку клонов на наличие рекомбинантной плазмиды с геном *nifA* в правильной ориентации с соблюдением рамки считывания (см. раздел 2.2.4; 2.2.9). Затем рекомбинантные плазмиды выделялись из *E. coli* и трансформировались в электрокомпетентные клетки ризобий при помощи электропорации (см. разделы 2.2.13; 2.2.14).

При создании экспрессирующих конструкций на базе плазмиды *pJN105* возникла необходимость выбора последовательности RBS-сайта, поскольку вектор *pJN105* им не располагает. Для этого провели анализ RBS-сайтов большого числа генов данных бактерий, доступных в GenBank, при котором было выявлено, что наиболее универсальная последовательность имеет вид GGAG. Исходя из этого, при амплификации последовательности *nifA*-гена при создании экспрессионных конструкций последовательность RBS-сайта была введена в состав переднего праймера. Таким образом, полученный амплификат представлял из себя полноразмерную кодирующую последовательность с сайтом Шайна-Дельгарно имеющий вид GGAG (рисунок 6). Правильность создания конструкций

и отсутствие ошибок при амплификации целевого гена проверялась методом секвенирования.

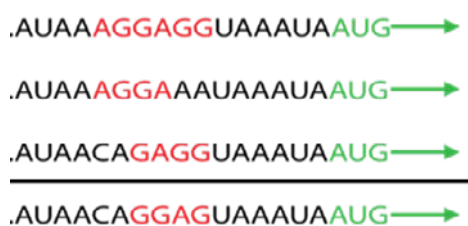


Рисунок 6 – Распространенные типы RBS-сайтов среди клубеньковых бактерий.

2.2.2. Выделение бактериальной ДНК

Выделение высокомолекулярной бактериальной ДНК клубеньковых бактерий осуществляли по методу Грэхэма (Graham, 1978) с некоторыми модификациями. В колбах Эрленмейра объемом 100 мл выращивали культуры бактерий в 100 мл питательного бульона YM при 28°C на термостатируемом шейкере в течение ночи. Затем клетки бактерий осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 4°C, 4000g и ресуспендировали в 10 мл буфера (pH 8,5), содержащем 15%-ную сахарозу, 100мМ трис-HCl, 20 мМ ЭДТА с добавлением лизоцима (5 мг/мл). Далее пробирки выдерживали при 0°C в течение 15 мин, к образцам добавляли лизирующего раствора в объеме 10 мл (2% додецилсульфат натрия) и протеинкиназы К (10 мг/мл). После инкубировали на протяжении 2 ч при 55°C. Затем к полученному раствору добавляли равный объем смеси 80%-ного свежеприготовленного фенола (pH 8,0) (доводили pH используя трис-HCl pH 8,0), хлороформа и изоамилового спирта с целью удалить белки и очистить ДНК. Соотношение компонентов составляло 25:24:1.

Для поставновки рутинных ПЦР анализов в данной работе использовали метод быстрого выделения ДНК из бактериальных клеток за счет их лизирования в 1% суспензии Chelex100 и 1% TritonX100. В пробирки объемом 1,5 мл отбирали небольшое количество бактериальной массы, затем добавляли 100 мкл 1%

TritonX100 и 1% суспензии Chelex100 и тщательно ресуспендировали. Пробирки с образцами прогревали при 95°C в течение 10-15 мин. После инкубации пробирки с содержимым перемешивали на вортексе и центрифугировали 3 мин при 12000g для осаждения клеточного дебриса. В качестве матрицы для постановки ПЦР использовали надосадочную жидкость, содержащую ДНК.

2.2.3. Выделение плазмидной ДНК

Плазмидную ДНК выделяли методом мягкого лизиса (Clewel and Helinski, 1969) при минимальной концентрации сахарозы в ресуспендирующем буфере и осаждении плазмидной ДНК из лизата полиэтиленгликолем. В 100 мл питательной среды Лурия-Бертани (LB) засекали единичной колонией *E. coli*, несущую какую-либо плазмиду. Штамм *E. coli* NEB10 выращивали с добавлением в среду 50 мкг/мл стрептомицина. Для рекомбинантных клубеньковых бактерий и *E. coli*, несущих плазмиду *pJN105*, вносили по 15 мкг/мл гентамицина. Далее в колбу с питательной средой LB объемом 100 мл, содержащей соответствующие антибиотики, переносили 1 мл ночной культуры. Бактерии наращивали на термостатируемом шейкере до достижения оптической плотности порядка $1-2 \times 10^8$ клеток на мл. Время инкубации для *E. coli* составляло 14-16 ч, а для клубеньковых бактерий от 2 до 7 суток (в зависимости от родовой принадлежности штамма).

Бактериальные клетки осаждали центрифугированием в центрифуге Eppendorf 5804R (Германия) в течение 10 мин при 3000 об/мин. После этого к полученному осадку добавляли 8 мл сахарозы (10%) и перемешивали. Далее образцы инкубировали при 0°C 10 мин в присутствии свежеприготовленного раствора лизоцима (10 мг/мл в 250 мМ трис-НСl, рН 7,8) объемом 2 мл. Добавляли 0,5 М ЭДТА по 2 мл и продолжали инкубировать пробирки в течение 5 мин при тех же условиях. Используя смесь детергентов состоящую из 1% бридж и 0,4% 58-дезоксихолата натрия проводили разрушение бактериальных клеток.

Аккуратно перемешивали образцы в течение 5 мин до появления вязкого и прозрачного раствора. Затем полученный лизат осаждали в течение 30 мин при 39000 об/мин в ультрацентрифуге Spinco L2-65B (Beckman-Coulter, США) в бакет-роторе SW-41. С осторожностью удаляли надосадочную жидкость, не допуская при этом перетекания осадочного слоя, который содержит хромосомную ДНК. В пробирки с отобранным супернатантом вносили 1/5 объема NaCl (5M) и 1/4 объема полиэтиленгликоля 6000 (50%). После этого образцы выдерживались при 0°C в холодильной камере в течение нескольких часов для формирования осадка плазмидной ДНК, содержащего загрязняющее количество РНК, полисахаридов и белка.

После инкубации образцы центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин в центрифуге Eppendorf 5804R. К полученному осадку добавляли однократный 1×TE. Затем добавляли хлороформ и центрифугировали 5 мин 2500 об/мин для удаления остаточного полиэтиленгликоля в образцах. Удаление белков из суспензии проводили встряхиванием в течение 10 мин с равным объемом смеси хлороформа и 80%-ого свежеперегнанного фенола (pH 8,0) (в соотношении 1:1). Далее образцы центрифугировали в центрифуге Eppendorf 5804R при 2500 об/мин в течение 20 мин. Полученную надосадочную жидкость, которая содержала ДНК, повторно подвергали очистке от белков. При необходимости очистку повторяли. Степень очистки определяли по отсутствию интерфазы, состоящей из денатурированных белков. Затем к надосадочной жидкости добавляли равный объем хлороформа и перемешивали. После центрифугирования осаждали ДНК двумя объемами этилового спирта. На заключительном этапе проводили удаление следов фенола и хлороформа, используя 70% этанол. Полученный осадок растворяли в 1×TE.

При анализе рекомбинантных клонов для определения размера вставки применяли метод щелочного лизиса бактериальных колоний (Vimboim and Doly, 1979). Для этого наращивали ночную культуру бактерий (100-300 мл) в жидкой среде. Затем бактерии осаждали центрифугированием в течение 10 мин, при 4°C и 4000 об/мин. Далее полученный осадок отмывали в 25 мл ресуспендирующего

раствора I (50 мМ трис-HCl (pH 7,8), 20 мМ ЭДТА) и откручивали. После осадок тщательно ресуспендировали в 5 мл первого раствора и добавляли двухкратный объем лизирующего раствора II (1% SDS, 0,2 М NaOH), аккуратно перемешивали до образования белого творожистого осадка и выдерживали при 4°C в течение 30 мин. По истечении времени добавляли нейтрализующий раствор III (3 М CH₃COOK, 2 М уксусная кислота) и плавно перемешивали до исчезновения полупрозрачного слизистого комка, помещали пробирку в холодильную камеру на 30 мин. Затем суспензию центрифугировали в течение 10 мин, при 4°C и 4000 об/мин. Супернатант отбирали в новую пробирку, стараясь максимально не захватить полученный осадок. Осаждали ДНК двухкратным объемом изопропилового спирта в морозильнике в течение 2-3 ч. Затем центрифугировали при максимальных оборотах. Жидкую фазу осторожно сливали и для смывания остатков изопропанола осадок промывали 70%-ным спиртом. Осадок подсушивали. Затем добавляли по 650 мкл воды mQ. После растворения осадка пробирку откручивали в течение 10-15 мин при максимальных оборотах. Водную фазу переносили в новую пробирку и добавляли 5 мкл РНКазы (5 мкг/мкл), инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Далее проводили депротеинизацию с помощью смеси фенол-хлороформа в соотношении 1:1. После повторяли этап очистки с добавлением хлороформа. На каждом этапе очистки содержимое пробирок тщательно перемешивались в течение 10 мин и откручивали при максимальных оборотах. Водную фазу переносили в новую пробирку, добавляли трехкратный объем 96% спирта для осаждения ДНК. Пробирку выдерживали в морозильной камере в течение ночи. Затем откручивали, подсушивали осадок и добавляли минимальный объем TE-буфера.

2.2.4. Полимеразная цепная реакция и олигонуклеотидные праймеры

Для избирательной амплификации разных вариантов гена *nifA* среди клубеньковых бактерий использовали метод полимеразной цепной реакции

(ПЦР), приводящий за 25-30 последовательных циклов денатурации, отжига и элонгации к многократному увеличению числа копий фрагмента ДНК. Объем реакционной смеси составлял 25-30 мкл. В ее состав входили следующие компоненты: 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, дГТФ, дТТФ, дЦТФ и 1 е.а Taq-полимеразы. После добавления всех компонентов реакционной смеси в пробирку аккуратно вносили по 30 мкл минерального масла для предотвращения испарения жидкости. ПЦР проводили в амплификаторах МС2 «Терцик» (ДНК-технология, Россия) по схеме: начальная денатурация в течение 2 мин при 95°C; 25-30 циклов амплификации со следующими параметрами: 1) денатурация при 95°C (30 сек); 2) отжиг праймеров при 50-55°C (40 сек); 3) элонгация при 72°C (1 мин 30 сек), после инкубировали при 72°C в течение 2 мин. Далее полученный амплификат анализировали в 1%-ном или 2%-ном агарозном геле, в зависимости от предполагаемого размера фрагмента ДНК. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованных в работе, представлены в таблице 2. Праймеры были синтезированы фирмой «Евроген» (Россия).

Таблица 2 – Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

№	Название праймера	Последовательность
Для клонирования в плазмиду <i>pJN105</i>		
Для амплификации гена <i>nifA Rhizobium leguminosarum</i>		
1	nifAviciaF	5'-cagtgactgcgaggagttttgtaggcatgatta-3'
	nifAviciaR	5'-tggcgatcgcggtcactccttcttcaca-3'
Для амплификации гена <i>nifA Sinorhizobium meliloti</i>		
2	nifAsinoF	5'-catgcgcaaacaggaca-3'
	nifAsinoR	5'-gctcgcgacgcctttatc-3'

Для амплификации гена <i>nifA</i> <i>Mesorhizobium loti</i>		
3	nifAmesoF	5'-catgcacgatactcgcaac-3'
	nifAmesoR	5'-cgcgagccggttcagag-3'
Для проверки ориентации генов <i>nifA</i> в плазмиде <i>pJN105</i>		
4	pJN105seq	5'-gattattgcacggcgtcacactt-3'
Для RAPD анализа		
5	AFK-1	5'-acggtggacg-3'
Для амплификации участка гена <i>nifA</i> методом Real-time PCR		
6	nifAviciaR_RT	5'-atggcagccttcagcaagttgtct-3'
7	nifAsinoR_RT	5'-gtagccgctgttatcttttctct-3'
8	nifAmesoR_RT	5'-ccacgttattcatctcggactt-3'

2.2.5. Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Для количественного определения искомого фрагмента ДНК в ризобиальных клетках использовали метод ПЦР в реальном времени. Реакцию осуществляли в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I (Синтол, Россия) на детектируемом амплификаторе iQ5 (Bio-Rad, США). Объем реакционной смеси для постановки количественной ПЦР составлял 25 мкл и включал следующие компоненты: 2,5х реакционная смесь (+SYBR Green I), смесь праймеров (указаны в разделе 2.2.4), dd H₂O и образец ДНК. Для ПЦР анализа было взято по 20 нг ДНК (NanoDrop One, Thermo Fisher Scientific) каждого образца. Амплификацию проводили по следующей схеме: начальная денатурация в течение 5 мин при 94°C; 40 циклов амплификации со следующими параметрами: 1) денатурация при 95°C (30 сек); 2) отжиг праймеров при 55°C (40 сек); 3) элонгация при 72°C (1 мин 30 сек), конечная элонгация при 72°C в течение 2 мин.

Учет полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения iQ5 Optical System Software.

2.2.6. Аналитический гель-электрофорез ДНК

Для электрофоретического разделения препаратов ДНК использовали 1-1,7% агарозные гели в зависимости от размера разделяемых фрагментов ДНК и требуемого разрешения (Sealey and Southern, 1982). Источниками питания служили приборы модели «Эльф-4» (ДНК-технология, Россия) или модели 250/2.5 (Bio-Rad, США). В качестве буферной системы был использован TAE-буфер, в составе данного буфера – 40 мМ трис-ацетата рН 7,6) и 2 мМ ЭДТА. В работе был использован 1Кб ДНК маркер 500-10000 п.н. фирмы «NEB» (Англия). По истечению времени электрофореза агарозные гели помещали в раствор бромистого этидия (5 мкг/мл) в течение 5-10 мин. При помощи фотодокументационной системы фирмы «UVP» (США) детектировали флуоресценцию нуклеиновых кислот.

2.2.7. Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции

Расщепление вектора *pJN105* по сайту *SmaI* проводили с использованием рестриктазы *SmaI* фирмы BioLabs (NEB, Англия) в буфере, рекомендованном фирмой-поставщиком. Для этого в пробирку добавляли плазмиду, буфер и рестриктазу, затем перемешивали и инкубировали при 25°C. Время рестрикции составляло от 1 часа до 1 суток в зависимости от количества расщепляемого препарата ДНК и единиц активности взятого в реакцию. По истечению времени инкубации смесь инактивировали при 65°C согласно инструкции производителя. После инактивации фермента препарат ДНК осаждали спиртом. Далее центрифугировали при максимальных оборотах, удаляли спирт и растворяли осадок в mQ. Расщепленную ДНК фракционировали в агарозном геле с помощью

электрофореза с добавлением буфера для нанесения (6×ТАЕ буфер, 50% глицерин, ксиленцианол и бромфеноловый синий).

2.2.8. Обработка ДНК щелочной фосфатазой

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 плазмиды, обработкой щелочной фосфатазой. Для удаления фосфатных групп использовали буфер следующего состава: трис-НСl (50 мМ, рН 9,0), MgCl₂ (10 мМ), спермидин (10 мМ), ZnCl₂ (1 мМ) с добавлением щелочной фосфатазы (0,1 е.а). Реакционную смесь выдерживали при 37°C в течение 30 минут. Удаление фермента проводили обработкой фенолом. Затем добавляли спирт для осаждения препарата ДНК. Центрифугировали пробирку 5 мин при 12000 об/мин. Остатки фенола удаляли, используя 70%-ный спирт. Подсушивали осадок и добавляли mQ в необходимом количестве.

2.2.9. Лигирование *nifA* генов с плазмидной ДНК

Лигирование образцов *nifA*-генов с плазмидной ДНК проводили по методике описанной Sambrook (Sambrook et al., 1989). Реакцию проводили с использованием T4 ДНК лигазы (NEB, Англия) в буфере содержащем 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ DTT, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ АТФ, 0,1-1 мкМ ДНК. В реакционной смеси объемом 20 мкл содержалось 1 мкл высококонцентрированной лигазы (2000 ед. активности). Образцы инкубировали при 16°C в течение 2-10 часов. Затем лигазную смесь выдерживали в термостате на протяжении 10 минут при 65°C для инактивации фермента. В дальнейшем

полученную смесь использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* методом теплового шока.

2.2.10. Секвенирование ДНК

Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК осуществляли на автоматическом секвенаторе GenomeLab фирмы BeckmanCoulter, используя наборы для секвенирования «GenomeLab». Секвенирующую реакцию проводили при следующем режиме: 96°C – 20 сек., 50-59°C – 20 сек., 60°C – 4 мин. Количество циклов 25-30. Состав реакционной смеси включал 4 мкл «DyeTerminatorCycleSequencing (DTCS) QuickStartMasterMix», 10-15 нг амплифицированной ДНК-матрицы, 1,6 пкм праймера. Смесь до конечного объема 10 мкл доводили деионизованной водой.

Определение нуклеотидных последовательностей клонированных фрагментов ДНК проводили при следующем режиме: 96°C – 20 сек., 50°C – 20 сек., 60°C – 4 мин. Очистку от избытка не включившихся меченых дидезокситерминаторов проводили с помощью набора «Centri-Step» (AppliedBiosystems, США) согласно протоколу фирмы-производителя.

2.2.11. Подготовка химически компетентных клеток *E. coli*

Компетентные клетки *E. coli* готовили, как предложено Hanahan (1983). Бактерии выращивали в объеме от 100 до 300 мл питательной среды LB в зависимости от необходимого количества пробирок компетентных клеток. В данную среду добавляли стрептомицин (50 мкг/мл). Далее 1 мл ночной культуры *E. coli* штамма NEB10 вносили в среду LB. Бактерии наращивали при 37°C в условиях интенсивной аэрации на темростатируемом шейкере до достижения $OD_{600} = 0,3$. Клетки бактерий собирали центрифугированием в стерильной пробирке при 4°C, 3000 об/мин, 10 мин. Надосадочную жидкость сливали и к

осадку приливали 25 мл охлажденного буфера I (pH 5,8), содержащим CaCl₂ (10 mM), MnCl₂ (50 mM), KCl (100 mM), ацетат калия (30 mM). Затем центрифугировали при 4°C, 3000 об/мин, 10 мин. Супернатант сливали и к осадку добавляли 5 мл охлажденного буфера II (pH 6,5, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15% глицерин, 10 mM MOPS) и ресуспендировали. После клеточную суспензию аликвотили по 200 мкл в предварительно охлажденные стерильные полипропиленовые пробирки, подписывали и замораживали при -70°C. Буфер I и II были предварительно простерилизованы в автоклаве и охлаждены до 4°C. Работу проводили на льду с соблюдением стерильных условий.

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

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* рекомбинантной ДНК проводили по методу описанным Cohen (Cohen et al., 1972). Замороженную пробирку с компетентными клетками *E. coli* помещали в стакан со снегом. В подтаявшую бактериальную суспензию объемом 40 мкл вносили 10 мкл лигазной смеси (или по 1-2 мкл вектора) и выдерживали в снегу 30 мин. После бактерии подвергались тепловому шоку за счет прогревания пробирок при 42°C в течение 2 мин. Потом пробирку снова помещали в снег, добавляли по 1 мл охлажденной питательной среды LB. Инкубировали при 37°C в течение 1 часа с перемешиванием через каждые 15 мин. Затем пробирку центрифугировали при 2 об/мин 3 мин, к бактериальному осадку добавляли по 100 мкл питательной среды LB и ресуспендировали. Затем в заранее подготовленные чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей антибиотик, равномерно распределяли суспензию стеклянным стерильным шпателем. Чашки Петри инкубировали в термостате при 37°C.

2.2.13. Подготовка электрокомпетентных клеток ризобий

Подготовку электрокомпетентных клеток ризобий проводили по Lin (Lin, 1995). Дикие штаммы клубеньковых бактерий выращивали в объеме от 100 до 300 мл питательной среды УМ в зависимости от необходимого количества пробирок компетентных клеток. Инкубировали на термостатируемом шейкере при 28°C. Все дальнейшие манипуляции проводили на снегу и в ламинарном боксе. При достижении $OD_{600} = 0,5-1$ бактериальные клетки собирали центрифугированием (4°C, 4000 об/мин, 10 мин) в стерильных пробирках типа Falcon. Супернатант сливали и к осадку добавляли 10% глицерин для отмывки по 40, 30, 20, 10 мл соответственно. После добавления 10 мл глицерина и центрифугирования к осадку добавляли 1 М сорбитол (4°C) и ресуспендировали. Затем полученную суспензию расфасовывали по стерильным пробиркам по 50 мкл и помещали в морозильную камеру на -70°C.

2.2.14. Электропорация компетентных клеток клубеньковых бактерий

Для проведения электропорации компетентных клеток ризобий использовали прибор Micropulser (BioRad, США) и электропорационные кюветы с расстоянием между электродами 0,1 см. Кюветы охлаждали в снегу или в холодильной камере. Все этапы электропорации проводили на снегу и в ламинарном боксе. Пробирку с замороженными компетентными клетками помещали в снег. Затем в зависимости от концентрации плазмиды в пробирку с подтаявшей суспензией вносили по 0,5-1,5 мкл вектора. Аккуратно наконечником перемешивали смесь, отбирали дозатором и переносили в кюветы. Кювету помещали в электропоратор и проводили электрический ток. Сразу после этого в кювету добавляли 1 мл питательной среды УМ (4°C) и промывали смесь. Далее отбирали и переносили в стерильную пробирку и инкубировали при 28°C в течение 2-3 ч при постоянном помешивании. По истечению времени

инкубирования бактерии осаждали центрифугированием (3000 об/мин, 2 мин). Далее осадок ресуспендировали в среде YM и распределяли стерильным шпателем на поверхности 1,5 % агаризованной среды с добавлением гентамицина. Чашки помещали в термостат на 28°C и наращивали в течение 2 суток (бактерии рода *Rhizobium*, *Ensifer*) и на протяжении 5-7 суток (род *Mesorhizobium*).

При использовании для трансформации плазмид, выделенных методом мягкого лизиса, проводили их 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.

2.2.15. Выделение и очистка РНК рекомбинантных клубеньковых бактерий

Для выделения РНК из рекомбинантных штаммов ризобий использовали набор FastRNA Pro Blue Kit (США). Бактерии наращивали на безазотной среде объемом 15 мл в стерильных пробирках типа Falcon с добавлением 1 мМ арабинозы для активации экспрессии рекомбинантного гена *nifA* (Newman and Fuqua, 1999; Khlebnikov et al., 2002). Бактерии инкубировали при 28°C и постоянном помешивании до достижения $OD_{600} = 0,9-1,0$. После центрифугировали, супернатант сливали, к осадку добавляли 1 мл раствора RNAPro и перемешивали. Далее 1 мл этого раствора переносили в микроцентрифужные пробирки, содержащие Lysing matrix B. Полученный раствор 2 раза перемешивали по 40 сек на гомогенизаторе Bertin Minilys (Франция) со скоростью 6 м/с. После этого раствор центрифугировали на центрифуге с охлаждением фирмы Heraeus (США) при 13000 об/мин, 4°C в течение 5 мин. Аккуратно переносили надосадочную жидкость в новые пробирки, не задевая осадка. Затем образцы выдерживались при комнатной температуре 5 мин. К ним добавляли по 300 мкл хлороформа, перемешивали на вортексе (10 сек) и инкубировали при тех же условиях. Образцы центрифугировали при 4°C, 13000

об/мин, 5 мин. Верхнюю фазу, не задевая интерфазы, переносили в новые микроцентрифужные пробирки. К образцам добавляли 500 мкл 96% перегнанного спирта и инкубировали при -20°C в течение 30 мин. Образцы после осаждения РНК центрифугировали при 13000 об/мин, 15 мин, при 4°C . Далее сливали надосадочную жидкость, осадок промывали 75% спиртом (разведенным в DEPC- H_2O) и подсушивали при комнатной температуре. После подсыхания к образцам добавлялись по 100 мкл DEPC- H_2O . Концентрацию полученной РНК определяли на спектрофотометре BioRad (США) на OD_{260} .

2.2.16. Реакция обратной транскрипции

Для экспериментов по оценке экспрессии *nif*-генов, первую цепь ДНК, комплементарную мРНК, получали при помощи фермента MMLV-ревертазы (обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей) (Евроген, Россия). Реакцию проводили в течение 2 часов в термостате на 42°C . В состав реакционной смеси входили следующие компоненты: 1-5 мкг РНК, 20 мкМ random hexamer primer (Fermentas, США), однократный буфер для ревертазы (50 мМ трис-НСl, рН 8,3, 10 мМ MnCl_2 , 10 мМ DTT, 0,5 мМ спермидина), по 500 мкМ каждого из дезоксинуклеотидтрифосфатов и 5 единиц MMLV-ревертазы. После завершения инкубации образцы инактивировали нагреванием до 70°C в течение 10 мин. Полученную смесь разделяли на аликвоты и в дальнейшем использовали для постановки ОТ-ПЦР (см. раздел 2.2.4).

2.2.17. Выделение и анализ белков из клеток клубеньковых бактерий

Выделение тотального белка из культуры бактериальных клеток проводили по описанной ранее методике (Towbin et al., 1979). Вестерн-блот-анализ осуществляли по методике, описанной в работе Mongiardini (Mongiardin et al., 2008), используя прибор Mini Trans-Blot® Module 170-3924EDU (Bio-Rad, США)

при 4°C в течение 1 ч при напряжении 100 V и силе тока 18-22 мА. В качестве мембраны для переноса белков использовали PVDF-мембрану (поливинилденфторид) (Bio-Rad, США).

Дот-блоттинг (метод вакуумной фильтрации) осуществляли согласно Gershoni, 1988 и Stott, 1989. Для этого PVDF-мембрану помещали в прибор Bio-Dot Microfiltration System (Bio-Rad, США), затем наносили по 500 мкл суспензии в лунки, предварительно разрушенных бактериальных клеток после ультразвуковой дезинтеграции в ресуспендирующем буфере (50 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl, 1 мМ PMSF). После этого через PVDF мембрану пропусклся образец при помощи медицинского отсасывателя OM-1 (Россия).

Обнаружение корового белка нитрогеназы – NifH проводили с использованием коммерческих поликлональных куриных антител (первичные антитела) (AS01021A, Agrisera, Швеция). После блокировки мембраны в 0,5% сухом обезжиренном молоке иммобилизованные белки обрабатывали первичными антителами, которые предварительно разводили в 2000 раз в TBS буфере с добавлением 0,5% сухого обезжиренного молока (10 мМ трис-основание, 0,9% NaCl, 0,1% Tween-20, 0,5% сухое молоко). По окончании инкубации в течение 10-16 ч при +4°C мембраны трижды промывали в TBS-буфере от остатков первичных антител. Для обнаружения связавшихся первичных антител использовали моноклональные кроличьи антитела в разведении 1:2000, конъюгированные с пероксидазой хрена HPR (Agrisera, Швеция). Инкубацию проводили в течение 1,5-2 ч при комнатной температуре и равномерном покачивании. После трех отмывок в TBS-буфере связывание вторичных антител детектировали с помощью субстрата DAB (Cell Marque Corporation, США). Отмытую мембрану помещали в указанный раствор и ожидали появления окрашенных полос в течение 2-3 мин. Остаток красящего раствора смывали, мембрану высушивали на воздухе и сканировали.

2.2.18. Определение числа КОЕ бактерий

Определение числа КОЕ бактерий проводили по методу Коха. Для этого готовили серию разведений культур клеток. Степень разведения зависела от плотности микробной популяции. Она была тем больше, чем была выше популяция бактерий. Для приготовления каждого разведения использовали стерильный наконечник для дозатора. Поверхностным способом производили посев суспензии из трех последних разбавлений на агаризованную питательную среду УМ, для каждого разведения делали по 3 параллельных посева. Инкубировали чашки в термостате при 28°C. Подсчет выросших колоний клубеньковых бактерий осуществлялся в зависимости от скорости роста колоний ризобий через 1-7 суток инкубации. Результаты полученные из параллельных посевов из одного и того же разведения суммировали и определяли среднее число колоний, которые выросли при посеве из разведения на одной чашке.

Расчет количества КОЕ в 1 мл исходного инокулята производили по формуле: $N=M \times R/V$, где N – КОЕ в 1 мл исходного инокулята; M – среднее количество КОЕ, выросших на чашке Петри в разведении R; R – разведение, из которого сделан посев; V – объем инокулята, взятого для посева в чашку Петри из разведения R.

2.2.19. Подбор концентрации индуктора для активации промотора *ParaBAD*

Для определения эффективной концентрации индуктора промотора *ParaBAD* наращивали ночные культуры всех полученных рекомбинантных штаммов до КОЕ 1×10^8 в 1 мл среды. Затем переносили в стерильные пробирки типа Falcon и откручивали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость сливали и к осадку добавляли по 60 мл безазотной питательной среды, содержащей селективные антибиотики. Перемешивали и бактериальную суспензию разливали по 10 мл в стерильные пробирки. Добавляли индуктор –

арабинозу в конечной концентрации 0,1 мМ, 0,5 мМ, 1 мМ, 1,5 мМ и 2 мМ. Затем инкубировали при 28°C при постоянном перемешивании в течение ночи. В качестве контроля использовали модифицированные бактерии без добавления индуктора и штаммы дикого типа. После инкубации отбирали из каждого образца по 1 мл жидкой культуры и вносили их в стеклянные флаконы для последующего анализа азотфиксирующей активности рекомбинантных бактерий под действием индукторов. Опыт проводился в трех повторностях. Аналогичным образом проводили наращивание культур рекомбинантов в питательной среде с/без добавления индуктора для оценки влияния последнего на наработку корового белка нитрогеназы – NifH.

2.2.20. Выделение бактерий из клубеньков

Чистые культуры ризобий выделяли по методике описанной Vincent (1970) и Баймиев и др. (2010). Для этого отбирали в пробирки типа Falcon объемом 50 мл части корня, содержащие клубеньки. Далее промывали в мыльном растворе. Используя гипохлорид натрия, стерилизовали поверхность клубеньков. Затем тщательно промывали стерильной водой и дополнительно стерилизовали 70% спиртом с последующим отмыванием клубеньков в воде. Высев бактерий из клубеньков на твердую питательную среду проводили следующим образом. Брали две стерильные иглы от одноразовых шприцев. Первой делали срез с дистальной части клубенька. Второй иглой проводили пункцию инфекционной зоны клубенька и в виде штрихов наносили на агаризованную питательную среду. При необходимости иглы стерилизовали над пламенем горелки. Далее чашки помещали в термостат и инкубировали при 28°C. Таким же образом выделяли клубеньковые бактерии из растений, обработанных рекомбинантными штаммами ризобий.

2.2.21. Хранение рекомбинантных штаммов ризобий

Для хранения рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий, как и для чистых культур использовали метод криоконсервирования. Для этого бактериальные культуры предварительно выращивали на жидкой питательной среде УМ при постоянном перемешивании для обеспечения достаточной аэрации до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0,3-0,4$ при $28^{\circ}C$. Затем суспензию бактерий по 0,7 мл раскапывали в стерильные полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл. Далее добавляли в каждую пробирку криопротектор (глицерин) до конечной концентрации 30%. Пробирки тщательно перемешивали и помещали в ультраморозильную камеру на $-70^{\circ}C$. На хранение каждый образец закладывался в трех повторностях.

2.2.22. Определение азотфиксирующей активности бактерий

Анализ азотфиксирующей активности клубеньковых бактерий проводили методом редукции ацетилена, предложенным Умаровым (Умаров, 1989). Для этого штаммы ризобий выращивали на безазотной среде в течение 1-2 суток (для бактерий рода *Rhizobium* и *Ensifer*) и 3-5 суток (род *Mesorhizobium*) до концентрации клеток 1×10^8 КОЕ/мл на термостатируемом орбитальном шейкере ES20 при 180 об/мин и температуре $28^{\circ}C$. Рекомбинантные штаммы выращивались при тех же условиях, но с добавлением селективного антибиотика (гентамицина). Суспензию бактериальных клеток объемом 1 мл переносили в стерильные стеклянные флаконы на 15 мл, содержащие 5 г стерильного песка. После внесения суспензии бактерий влажность песка составляла порядка 60% полной влагоемкости. Затем флаконы закрывали ватными пробками и помещали в термостат на $28^{\circ}C$ на сутки. После инкубации заменяли ватные пробки на стерильные резиновые и во флаконы вводили ацетилен до концентрации 10% по объему. В качестве контроля неспецифического этиленогенеза использовали

десять флаконов с песком, влажность песка составляла 60% полной влагоемкости. На каждый штамм, как дикого типа, так и рекомбинантного использовали по 10 флаконов в трех повторностях (30 проб на один штамм). Через 1 час проводили анализ содержания ацетилена и этилена по времени выхода каждого газа в исследуемых образцах на газовом хроматографе с пламенным ионизационным детектором (Shimadzu GC-2014, Япония). Характеристики прибора: длина колонки – 2 м, диаметр – 3 мм, наполнитель – Porapak N 80/100, температура колонки – 60°C, температура детектора – 180°C, температура испарителя – 180°C, расход газа-носителя (N₂) – 25 мл/мин, воздуха – 50 мл/мин, водорода – 50 мл/мин. Актуальную активность азотфиксации измеряли без внесения глюкозы. Количество ацетилена и этилена определяли по калибровочной кривой. Для фиксации одной молекулы N₂ необходима энергия, которая соответствует образованию 3 молекул этилена из ацетилена. Коэффициент пересчета от C₂H₂-редукции к N₂-фиксации равен 1/3.

Исследование азотфиксирующей активности бактерий непосредственно в клубеньках на корнях бобовых растений проводили по методике описанной выше.

2.2.23. Стерилизация и инокуляция семян

Для опытов по оценке влияния рекомбинантных штаммов на рост и развитие растения семена всех исследуемых растений перед инокуляцией подвергались стерилизации. Для этого отобранные семена промывались мыльным раствором, с последующей отмывкой в проточной воде. Далее проводили поэтапную стерилизацию семян. Сначала их выдерживали в растворе гипохлорита натрия, затем в 70% спирте. После каждого этапа стерилизации семена тщательно промывались стерильной водой.

Для инокуляции использовали семена горошка посевного сорт Чишминский и ячменя. Заражение простерилизованных семян проводили следующим образом. Для этого необходимое количество семян отбирали в стерильные пробирки и

добавляли к ним суспензию бактериальных клеток плотностью 1×10^8 КОЕ/мл так, что бы поверхность семян была равномерно покрыта без избытка жидкости. Выдерживали в течение часа в темном месте. Затем осуществляли посадку семян в стерильный песок по 10 контейнеров на каждый исследуемый штамм. Опыт повторяли 3 раза. Для оценки влияния полученных рекомбинантных штаммов на продуктивность растений в естественных условиях посадку семян гороха и ячменя проводили непосредственно в почву.

При проведении опытов в искусственных условиях семена гороха проращивали в стерильном песке в течение двух недель при температуре 24-26°C и 16 ч светопериоде. Натурные исследования проводили на делянках размером 1 м², на каждый образец закладывалось по 3 делянки. Посадку семян в грунт проводили в мае, сбор и учет урожая в августе.

2.2.24. Количественное определение содержания пигментов в растительных тканях

Для определения количественного содержания растительных пигментов широко используется метод спектрофотометрии (Шлык, 1971; Lichtenthaler, 1987; Rogga, 1991). Навеску растительного материала листья массой 0,1-0,2 г тщательно растирали в ступке с добавлением MgCO₃. Далее поэтапно приливали 80% ацетон (20-40 мл) и все аккуратно растирали. Отфильтровывали. Определение оптической плотности полученной вытяжки проводили на спектрофотометре BioRad (США) при длинах волн соответствующих максимумам поглощения хлорофиллов а и b (663 и 646 нм) и каротиноидов (470 нм).

Концентрацию растительных пигментов рассчитывали по следующим формулам:

$$C_a = 12,21 \times D_{663} - 2,28 \times D_{646}$$

$$C_b = 20,13 \times D_{646} - 5,03 \times D_{663}$$

$$C_c = (1000 \times D_{470} - 3,27 \times C_a - 100 \times C_b) / 229$$

где D – оптическая плотность при соответствующей длине волны, $C_{a,b,c}$ – концентрация хлорофилла a , b и каротиноидов (мг/л).

Количественное содержание пигментов в растительном материале вычисляли по формуле:

$$X = V \times C / 1000 \times M$$

где V – объем вытяжки (мл), C – концентрация пигментов (мг/л), M – навеска материала (г).

2.2.25. Оценка стабильности рекомбинантных плазмид

Исследование стабильности привнесенных плазмид в ризобиях проводили путем последовательного размножения рекомбинантных штаммов в отсутствие давления отбора (антибиотика) (Peloquin et al., 2002; Ma et al., 2011). Для этого рекомбинантные штаммы выращивали на жидкой среде Ym с добавлением антибиотика (гентамицин). Культуры рекомбинантных штаммов, выращенных в среде Ym с добавлением гентамицина, использовали для инокуляции среды без антибиотика. Бактерии наращивали до концентрации 1×10^8 без селективного давления и переносили ежедневно (штаммы рода *Rhizobium*, *Ensifer*) и через 4-5 дня (штаммы рода *Mesorhizobium*) при разведении 1:100 в свежую среду в течение 50 дней подряд. При переносе бактериальную суспензию объемом 10 мкл распределяли на агаризованную питательную среду с гентамицином по 3 чашки Петри на один образец. Затем чашки помещали в термостат и инкубировали в течение 2 суток (штаммы рода *Rhizobium*, *Ensifer*) и 5-7 дней (штаммы рода *Mesorhizobium*) при 28°C. Опыт проводили в трех повторностях.

Для ПЦР-анализа аликвоту бактериальной культуры по 1 мл из каждого пассажа центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин. Образовавшийся осадок использовали для выделения ДНК (раздел 2.2.2). Потерю встроенной

плазмиды рекомбинантными штаммами ризобий оценивали по отсутствию роста на питательной среде с селективным маркером и отсутствию или снижению искомого фрагмента ДНК в образцах.

2.2.26. Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей

Компьютерный анализ секвенированных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета компьютерных программ Lasergene (DNASTAR, США). Нуклеотидные последовательности гена *nifA* клубеньковых бактерий для сравнительного анализа были взяты из Международного банка данных нуклеотидных последовательностей GenBank. Множественные выравнивания нуклеотидных последовательностей проводили с помощью алгоритма CLUSTALW и редактировали вручную.

2.2.27. Статистическая обработка полученных результатов

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием программы Microsoft Office Excel 2010. Эксперименты проводили в трехкратной повторности. На графиках указаны средние значения с их стандартными ошибками. Для сравнения независимых выборок использовали критерий Краскела-Уоллиса. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Обработку результатов дот-блот-анализа проводили с использованием компьютерной программы TatalLab v 2.01.

2.3. Реактивы и материалы

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

Акриламид (Helicon, Россия)

Бакто-агар (Difco, США)
Бакто-триптон (Difco, США)
Бис-Акриламид (Helicon, Россия)
Бридж 58 (Serva, ФРГ)
Бромфеноловый синий (Serva, ФРГ)
Вторичные моноклональные антитела HRP (Agrisera, Швеция)
Гентамицин (Serva, ФРГ)
Глицерин (Serva, ФРГ)
Дезоксинуклеотидтрифосфаты: дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ (Pharmacia, Швеция)
Дезоксихолат натрия (Serva или Merck, ФРГ)
ДНК-лигаза фага T4 (BioLabs, Англия)
ДНК-полимераза фага T4 (BioLabs, Англия)
Додецилсульфат натрия (ДДС-натрия) (Serva, ФРГ)
Дрожжевой экстракт (Difco, США)
Кальций хлористый (Merck, ФРГ)
Магний хлористый (Serva, ФРГ)
Мембрана PVDF (Bio-Rad, США)
Обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей (MMLV-ревертаза) (Евроген, Россия)
Первичные поликлональные анти-NifH антитела (Agrisera, Швеция)
Полиэтиленгликоль 6000 (Fluka, Швейцария или Merck, ФРГ)
Рестрикционная эндонуклеаза *SmaI* (BioLabs, Англия)
Сухое обезжиренное молоко (Applichem, Германия)
ТЕМЕД (Helicon, Россия)
Трис (гидроксиэтиламинометан) "тризма" или "Sigma 7-9" (Sigma, США)
ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль) (Serva, ФРГ)
Этидиум бромид (Fluka, Швейцария)
Random hexamer primer (Fermentas, США)

2.4. Составы использованных стандартных водных растворов

В работе использовали стандартные водные растворы и питательные среды, состав которых приведен в таблице 3.

Таблица 3 – Составы использованных стандартных водных растворов

1 x TAE	40 мМ трис-основание, 20 мМ уксусной кислоты, 2 мМ ЭДТА, (pH 7,6)
1 x TE	10 мМ трис-HCl (pH 8,0), 1 мМ 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 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 (30%)
агаризованная среда YM	маннитол (1%), дрожжевой экстракт (0,04%), NaCl (0,01%), MgSO ₄ (0,01%), K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O (0,05%), CaCl ₂ (30%), агар-агар (1,5%)
безазотная питательная среда	KH ₂ PO ₄ (0,02%), K ₂ HPO ₄ (0,08%), MgSO ₄ x 7H ₂ O (0,02%), FeCl ₃ (следы), Na ₂ MoO ₄ (следы), дрожжевой экстракт (0,02%), сахароза (2%)
агаризованная безазотная питательная среда	KH ₂ PO ₄ (0,02%), K ₂ HPO ₄ (0,08%), MgSO ₄ x 7H ₂ O (0,02%), FeCl ₃ (следы), Na ₂ MoO ₄ (следы), дрожжевой экстракт (0,02%), сахароза (2%), агар (1,5%)
Running buffer (pH 8,3)	25 мМ трис-основание, 190 мМ глицин, 0,1% SDS

Tris-buffer (TBS) (pH 7,5)	20 мМ трис-основание, 150 мМ NaCl
Tris-buffer с Tween 20 (TBST) (pH 7,5)	20 мМ трис-основание, 150 мМ NaCl, 0,1% Tween 20
Transfer buffer TS (pH 8,3)	25 мМ трис-основание, 190 мМ глицин, 20% метанол
Концентрирующ й гель ПААГ (4%)	акриламид (4%), SDS (0,1%), трис-основание (pH 6,8), глицерин (10%), персульфат аммония (ПСА) (10%), ТЕМЕД (5%)
Разделяющий гель ПААГ (12%)	акриламид (12%), SDS (0,1%), трис-основание (pH 8,8), глицерин (10%), персульфат аммония (ПСА) (10%), ТЕМЕД (5%)
Буфер с бромфеноловым синим	трис-основание (62,5 мМ, pH 6,8), β-меркаптоэтанола (1%), глицерина (10%) и бромфенолового синего (0,001%)

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Выбор объектов исследования

Клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* и *Bradyrhizobium* являются наиболее распространенными азотфиксирующими микроорганизмами, которые вступают в симбиотические отношения с бобовыми растениями умеренного климата (Баймиев, 2015; Иванова, 2016; Иванова, 2017). Выбор штаммов реципиентов для получения рекомбинантных по созданным конструкциям микроорганизмов осуществлялся из числа представителей перечисленных родов ризобий по следующим критериям: во-первых, штаммы должны были быть эффективными, т.е. иметь хорошую клубенек-образующую и азотфиксирующую активности, что свидетельствовало бы о присутствии полного набора необходимых для азотфиксирующего симбиоза генов, во-вторых, неустойчивыми к действию антибиотика гентамицина для возможности селекции рекомбинантных бактерий после их трансформации. Для этого был проведен скрининг 134 штаммов клубеньковых бактерий, относящиеся к родам *Rhizobium*, *Ensifer* и *Mesorhizobium*, на способность формировать функционирующие клубеньки и обладающие устойчивостью к антибиотику. Данные штаммы были взяты из коллекции симбиотических микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН «Симбионт».

При анализе бактерий рода *Rhizobium* было выбрано 34 штамма, изолированные из следующих растений: горошек лесной (*Vicia sylvatica* L), чина гороховидная (*Lathyrus pisiformis* L) и горошек гороховидный (*Vicia pisiformis* L). В результате у всех исследуемых штаммов устойчивость к гентамицину отсутствовала (таблица 4).

Таблица 4 – Оценка формирования азотфиксирующих клубеньков и устойчивости к антибиотику штаммов рода *Rhizobium*

№	Название штамма	Растение-хозяин	Формирование азотфиксирующих клубеньков	Резистентность к антибиотику (Gm, 15 мкг/мл)
1	VSyl1	Горошек лесной (<i>Vicia sylvatica</i> L)	+	-
2	VSyl2		+	-
3	VSyl3		+	-
4	VSyl4		+	-
5	VSyl5		+	-
6	VSyl6		+	-
7	VSyl7		+	-
8	VSyl8		+	-
9	VSyl9		+	-
10	VSyl10		+	-
11	VSyl11		+	-
12	VSyl12		+	-
13	VSyl13		+	-
14	VSyl14		+	-
15	LPis1	Чина гороховидная (<i>Lathyrus pisiformis</i> L)	+	-
16	LPis2		+	-
17	LPis3		+	-
18	LPis4		+	-
19	LPis5		+	-
20	LPis6		+	-
21	LPis7		+	-
22	LPis8		+	-
23	LPis9		+	-
24	LPis10		+	-
25	VPis101	Горошек гороховидный (<i>Vicia pisiformis</i> L)	+	-
26	VPis105		+	-
27	VPis106		+	-
28	VPis107		+	-
29	VPis108		+	-
30	VPis109		+	-
31	VPis110		+	-
32	VPis111		+	-
33	VPis112		+	-
34	VPis113		+	-

Примечание: «+» – рост на среде с антибиотиком, «-» – отсутствует рост на среде с антибиотиком.

При исследовании 58 штаммов ризобий, принадлежащих к роду *Ensifer*, изолированных из клубеньков растений люцерны посевной (*Medicago sativa* L), люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina* L), донника белого (*Melilotus albus*) и донника лекарственного (*Melilotus officinalis* L) напротив, большая часть штаммов (50 штаммов) обладала устойчивостью при росте на среде с добавлением антибиотика (таблица 5). При этом у 6 штаммов, выделенных из клубеньков люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina* L), отсутствовала резистентность.

Таблица 5 – Оценка формирования азотфиксирующих клубеньков и устойчивости к антибиотику штаммов рода *Ensifer*

№	Название штамма	Растение-хозяин	Формирование азотфиксирующих клубеньков	Резистентность к антибиотику (Gm, 15 мкг/мл)
1	MSa1	Люцерна посевная (<i>Medicago sativa</i> L)	+	+
2	MSa2		+	+
3	MSa3		+	+
4	MSa4		+	+
5	MSa5		+	+
6	MSa6		+	+
7	MSa7		+	+
8	MSa8		+	+
9	MSa9		+	+
10	MSa10		+	+
11	MSa11		+	+
12	MSa12		+	+
13	MSa13		+	+
14	MSa14		+	+
15	MSa15		+	+
16	MSa16		+	+
17	MSa17		+	+
18	MSa18		+	+
19	MSa19		+	+
20	MSa20		+	+
21	MLu1	Люцерна хмелевидная (<i>Medicago lupulina</i> L)	+	+
22	MLu2		+	-
23	MLu3		+	-
24	MLu4		+	-

№	Название штамма	Растение-хозяин	Формирование азотфиксирующих клубеньков	Резистентность к антибиотику (Gm, 15 мкг/мл)	
25	MLu5	Люцерна хмелевидная (<i>Medicago lupulina</i> L)	+	-	
26	MLu6		+	+	
27	MLu7		+	+	
28	MLu8		+	+	
29	MLu9		+	-	
30	MLu10		+	-	
31	MA11	Донник белый (<i>Melilotus albus</i>)	+	+	
32	MA12		+	+	
33	MA13		+	+	
34	MA16		+	+	
35	MA17		+	+	
36	MA18		+	+	
37	MA19		+	+	
38	MA110		+	+	
39	MA111		+	+	
40	MA112		+	+	
41	MA114		+	+	
42	MA115		+	+	
43	MA116		+	+	
44	MA117		+	+	
45	MA118		+	+	
46	MOf1		Донник лекарственный (<i>Melilotus officinalis</i> L)	+	-
47	MOf2			+	+
48	MOf3			+	+
49	MOf4	+		+	
50	MOf5	+		+	
51	MOf6	+		+	
52	MOf7	+		+	
53	MOf8	+		+	
54	MOf9	+		-	
55	MOf10	+		+	
56	MOf11	+		+	
57	MOf12	+		+	
58	MOf13	+		+	

Примечание: «+» – рост на среде с антибиотиком, «-» – отсутствует рост на среде с антибиотиком.

Для скрининга устойчивости бактерий рода *Mesorhizobium* было отобрано 42 штамма, которые формировали азотфиксирующие клубеньки с такими растениями как лядвенец рогатый (*Lotus corniculatus* L), люпинник белый (*Lupinaster albus* Link), люпинник пятилистный (*Lupinaster pentaphyllus* Moench), остролодочник близкий (*Oxytropis approximata* Knjasev) и остролодочник башкирский (*Oxytropis baschkiriensis* Knjasev) (Баймиев и др., 2019а; Баймиев и др., 2020). В результате среди 42 штаммов только 2 имели устойчивость к гентамицину (таблица 6).

Таблица 6 – Оценка формирования азотфиксирующих клубеньков и устойчивости к антибиотику штаммов рода *Mesorhizobium*

№	Название штамма	Растение-хозяин	Формирование азотфиксирующих клубеньков	Резистентность к антибиотику (Gm, 15 мкг/мл)
1	LZh1	Лядвенец рогатый (<i>Lotus corniculatus</i> L)	+	-
2	LZh2		+	+
3	LZh3		+	-
4	LZh4		+	-
5	LZh5		+	+
6	LZh6		+	-
7	LZh7		+	-
8	LZh8		+	-
9	LZh9		+	-
10	LZh10		+	-
11	LZh11		+	-
12	LZh12		+	-
13	LZh13		+	-
14	LZh14		+	-
15	LZh15		+	-
16	LZh16		+	-
17	LZh17		+	-
18	LZh18		+	-
19	LZh19		+	-
20	LZh20		+	-
21	LA11	Люпинник белый (<i>Lupinaster albus</i> Link)	+	-
22	LA12		+	-
23	LA13		+	-

№	Название штамма	Растение-хозяин	Формирование азотфиксирующих клубеньков	Резистентность к антибиотику (Gm, 15 мкг/мл)
24	LPe1	Люпинник пятилистный (<i>Lupinaster pentaphyllus</i> Moench)	+	-
25	LPe2		+	-
26	LPe3		+	-
27	LPe4		+	-
28	LPe5		+	-
29	LPe6		+	-
30	LPe7		+	-
31	OAp3.1	Остролодочник близкий (<i>Oxytropis approximata</i> Knjasev)	+	-
32	OAp3.3		+	-
33	OAp3.4		+	-
34	OAp3.5		+	-
35	OAp3.6		+	-
36	OAp4.1		+	-
37	OAp4.2		+	-
38	OВа3.1	Остролодочник башкирский (<i>Oxytropis baschkiriensis</i> Knjasev)	+	-
39	OВа3.2		+	-
40	OВа3.3		+	-
41	OВа3.4		+	-
42	OВа3.5		+	-

Примечание: «+» – рост на среде с антибиотиком, «-» – отсутствует рост на среде с антибиотиком.

Таким образом, для данного исследования из коллекции симбиотических микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН «Симбионт» были отобраны эффективные штаммы не резистентные к гентамицину: VSyl1, VSyl3, VSyl7, VSyl8, LPis4 (род *Rhizobium*), MLu2 и MLu10 (род *Ensifer*), LZh1 и LZh3 (род *Mesorhizobium*). Для подтверждения разности штаммов был сделан RAPD анализ (рисунок 7).

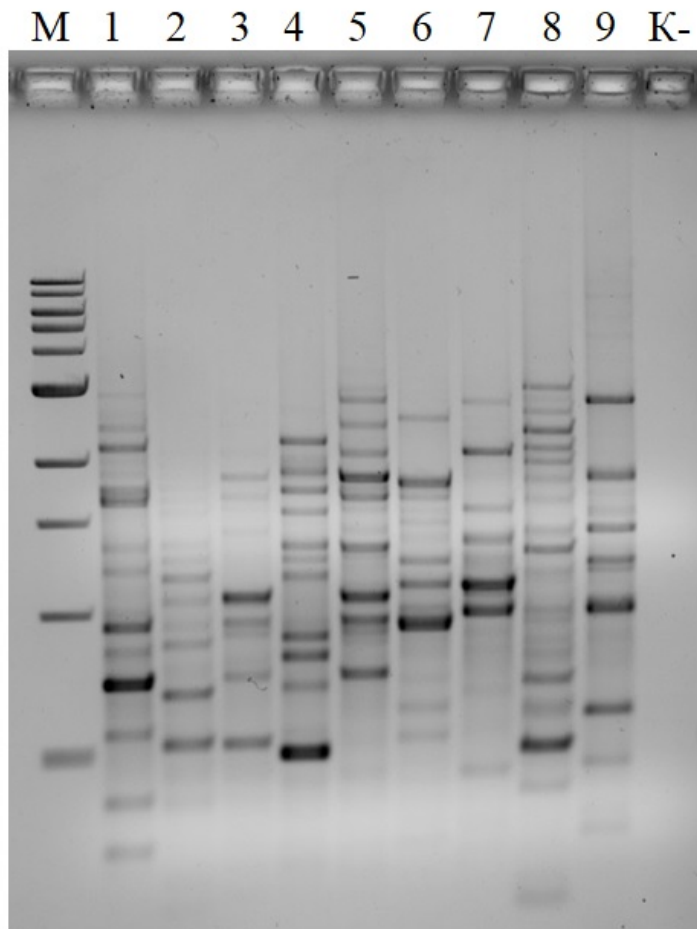


Рисунок 7 – Электрофоретические спектры RAPD – анализа диких штаммов клубеньковых бактерий: 1 – штамм VSyl11; 2 – штамм VSyl3; 3 – штамм VSyl17; 4– штамм VSyl8; 5 – штамм LPis4; 6 – штамм MLu2; 7 – штамм MLu10; 8 – штамм LZh1; 9 – штамм LZh3. М – маркер. К- – отрицательный контроль.

3.2. Анализ полиморфизма *nifA* гена среди клубеньковых бактерий

На данный момент известно, что гены, необходимые для осуществления азотфиксации у ризобий в зависимости от родовой принадлежности микроорганизмов локализуются или на симбиотических плазидах (*pSym*), или в составе интегрированных конъюгативных мобильных генетических элементов (ICESym) в составе хромосомы (Шестаков, 2007; Frost et al., 2005; Colombi et al., 2021). За счет такой локализации эти гены часто вовлекаются в процесс горизонтального переноса. Для оценки возможности приобретения *nifA* гена разными видами ризобий путем горизонтальной передачи в ходе эволюции был проведен общий филогенетический анализ последовательностей данного гена разных родов клубеньковых бактерий (рисунок 8).

В ходе проведенного исследования были обнаружены следующие закономерности: часть взятых последовательностей генов *nifA* кластеризуются согласно родовой принадлежности микроорганизмов, что свидетельствует о параллельной эволюции этой группы генов и самих бактерий. Кроме этого, было выявлено, что существует отдельная группа филогенетически близких вариантов гена *nifA*, не имеющая четкой корреляции с родовой принадлежностью микроорганизмов, что может свидетельствовать об элементах комбинаторной эволюции при составлении набора *nif*-генов при активном участии в этом процессе горизонтального переноса генов.

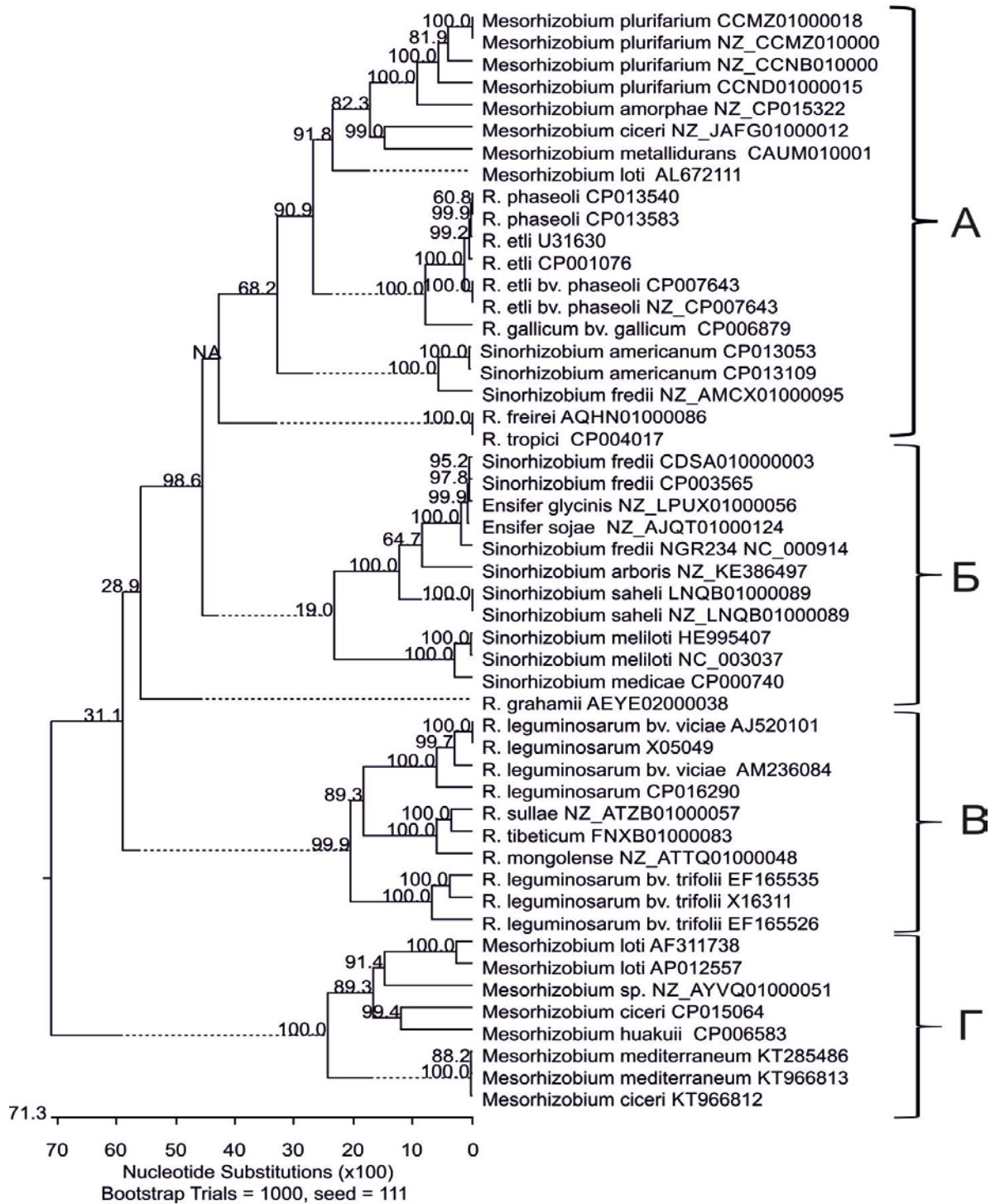


Рисунок 8 – Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основе сравнительного анализа последовательностей гена *nifA*. А – кластер, образованный тремя родами клубеньковых бактерий; Б – кластер, образованный ризобиями рода *Ensifer*; В – кластер, образованный клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium*; Г – кластер, образованный бактериями рода *Mesorhizobium*.

3.3. Создание генно-инженерных конструкций с целевым геном *nifA*

У симбиотических азотфиксаторов при избытке кислорода ген *nifA* находится в репрессированном состоянии, в результате чего не происходит активации генов нитрогеназного комплекса и выработки белков нитрогеназы (Dixon and Kahn, 2004). Следовательно, клубеньковые бактерии не проявляют азотфиксирующей активности в свободноживущем состоянии. Тем не менее, в ранних работах было показано, что фиксация азота бактериями в репрессивных условиях активируется после введения конститутивно экспрессируемого гена *nifA* в различные азотфиксирующие бактерии (Wollaston et al., 1981; Kennedy and Robson 1983; Zhu et al., 1983; Buchanan-Uozumi et al., 1986; Li et al., 1994).

Возможность искусственной индукции азотфиксации у ризобий вне симбиоза ранее нами была продемонстрирована (Иванова и др., 2014). Был получен рекомбинантный штамм *R. leguminosarum* 1078, содержащий в векторе дополнительную копию гена *nifA* под управлением конститутивного промотора фага T5. Однако применение такого промотора приводило к снижению скорости роста ризобий и негативно влияло на их стабильность. Поэтому в дальнейшем ген *nifA* встраивали в плазмидную конструкцию (вектор *pJB658*) под управлением индуцибельного промотора *Pm*. В результате было показано, что при привнесении дополнительной активной копии данного гена приводило к азотфиксации в свободноживущем состоянии среди клубеньковых бактерий (Баймиев и др., 2019b). Тем не менее, данные штаммы отличались нестабильностью, которая проявлялась как в медленной регенерации модифицированных клонов после криохранения, так и в элиминации плазмиды при непродолжительных пассажах (Гуменко, 2020).

В данной работе для клонирования была использована плазида широкого круга хозяев *pJN105* с маркерным геном устойчивости к антибиотику – гентамицину (Gm), что позволило трансформировать большее количество штаммов по сравнению с предыдущей плазмидой, так как ризобиальные штаммы в большей мере резистентны к действию ампициллина (Newman and Fuqua, 1999).

Выбор данного вектора был обусловлен тем, что он является производной плазмиды *pBBR1*, выделенной из штамма S87 *Bordetella bronchiseptica* (Antoine and Loch, 1992; Elzer et al., 1995). Репликон этого вектора является уникальным за счет того, что он не относится ни к одной из известных групп несовместимости, т. е. плазида не должна конфликтовать ни с одной из известных плазмид (Antoine and Loch, 1992; Lefebre and Valvano, 2002). Данное свойство является необходимым условием для получения рекомбинантных штаммов ризобий, целевой ген которого экспрессируется с плазмиды, поскольку наличие конфликта непременно приведет к стабильной элиминации или вносимой векторной конструкции или хозяйских плазмид, что в свою очередь может привести к изменению фенотипа микроорганизма. Это особенно важно при исследовании клубеньковых бактерий, у которых значительную часть генома составляют именно плазмиды. Кроме того, гены, определяющие симбиотические свойства у *Rhizobium* sp. и *Ensifer* sp., имеют плазмидную локализацию, и их потеря приведет к утрате данных свойств.

В создаваемую конструкцию различные варианты гена *nifA* встраивались под управление индуцибельного промотора *ParaBAD*, который активируется сахаром арабинозой (рисунок 9). Согласно литературным данным экспрессия генов под регуляцией данного промотора имеет экспоненциальный характер уровня экспрессии в зависимости от концентрации индуктора (Newman and Fuqua, 1999; Khlebnikov et al., 2001; Khlebnikov et al., 2002). Такой подход исключает еще один фактор, который, возможно, оказывал негативное влияние на рекомбинантные штаммы ризобий. Таким фактором является *m*-толуоловая кислота – индуктор промотора *P_m*. Добавление в среду данного соединения к модифицированным бактериям приводило к значительному снижению скорости их роста, однако подобное возможно и из-за повышенной нагрузки на клетку вследствие усиленной выработки белка.

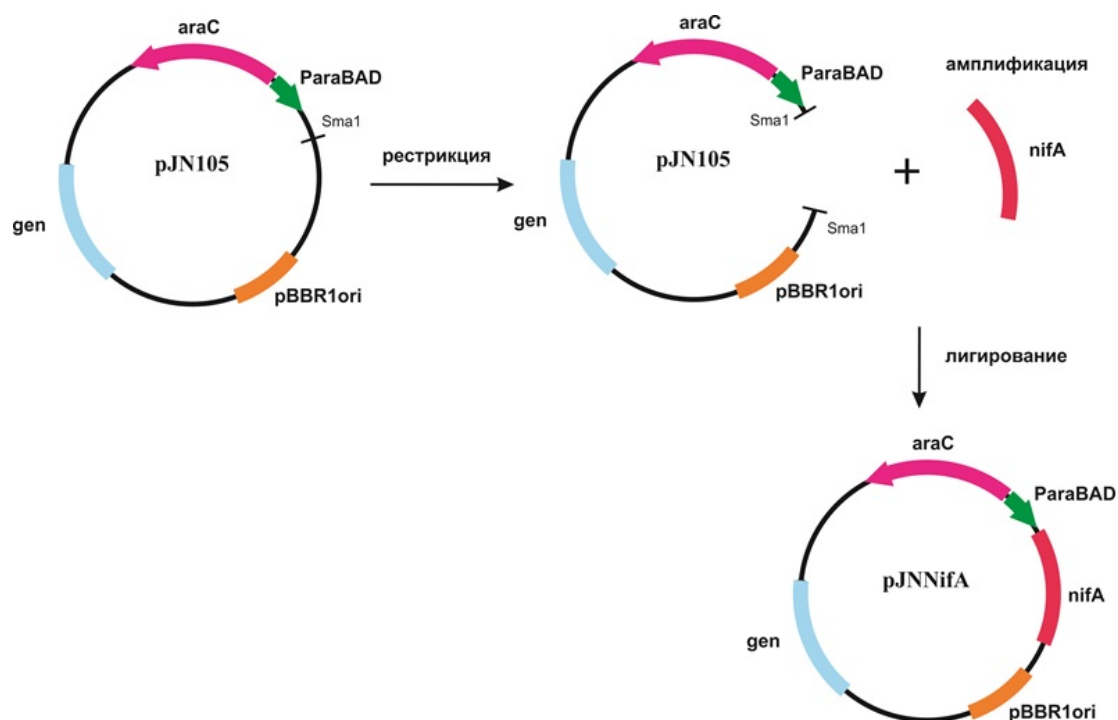


Рисунок 9 – Схема клонирования гена *nifA* в вектор *pJN105*.

Хотя по результатам сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена *nifA* была выявлена высокая степень полиморфизма среди клубеньковых бактерий, все же отмечалась и филогенетическая их кластеризация по группам в зависимости от родовой принадлежности ризобий. Поэтому в данной работе при получении генно-инженерных конструкций нами были выбраны в качестве целевых генов три гена *nifA*, принадлежащие следующим родам: *Rhizobium*, *Ensifer* и *Mesorhizobium* (рисунок 10). На данный момент известно, что бактерии рода *Mesorhizobium* имеют две копии данного гена: *nifA1* и *nifA2*. В работе нами был использован ген *nifA2*, поскольку данный вариант запускает весь каскад реакций регуляции азотфиксации (Nukui et al., 2006).

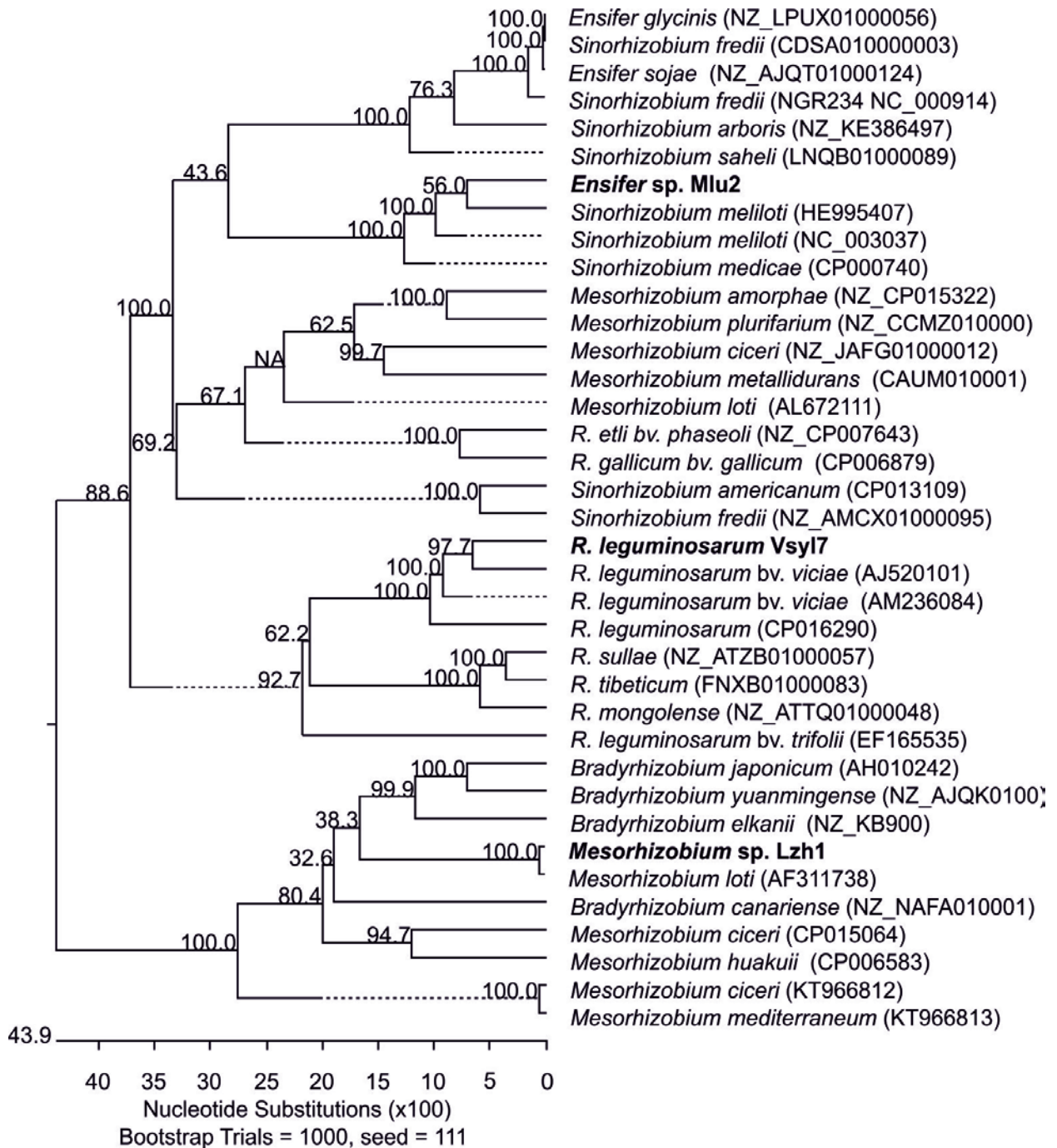


Рисунок 10 – Филогенетическое положение генов *nifA*, использованных в данной работе.

Для того чтобы удостовериться, что плазмидные конструкции функциональны в штаммах клубеньковых бактерий нами также была создана подобная конструкция, в которую был клонирован репортерный ген зеленого флуоресцентного белка вместо целевого гена. После трансформации данного вектора в ризобийные клетки на среде с добавлением арабинозы в качестве

индуктора образовывались клоны бактерий, окрашенные в зеленый цвет, что свидетельствовало о работоспособности промотора *ParaBAD* в исследуемых образцах.

На следующем этапе работы полученные конструкции с различными вариантами гена *nifA* были трансформированы в клубеньковые бактерии. Таким образом, для оценки специфичности продукта гена *nifA* нами были получены серии рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий, содержащие дополнительные копии гена *nifA* (таблица 7). Получение рекомбинантов на основе диких штаммов бактерий, принадлежащим к роду *Ensifer*, было затруднено. В результате с целевым геном *nifA* данного рода было получено два рекомбинантных штаммов, а с другими вариантами по одному.

Таблица 7 – Список полученных рекомбинантных штаммов ризобий

№	Целевой ген	Штаммы (род <i>Rhizobium</i>)	Штаммы (род <i>Ensifer</i>)	Штаммы (род <i>Mesorhizobium</i>)
1	<i>nifA</i> <i>Rhizobium</i>	VSyl1, VSyl3, VSyl7, VSyl8, LPis4	MLu2	LZh1, LZh3
2	<i>nifA</i> <i>Ensifer</i>	VSyl1, VSyl3, VSyl7, VSyl8, LPis4	Mlu2, Mlu10	LZh1, LZh3
3	<i>nifA</i> <i>Mesorhizobium</i>	VSyl1, VSyl3, VSyl7, VSyl8, LPis4	MLu2	LZh1, LZh3

3.4. Анализ функциональной активности гена *nifA* у рекомбинантных штаммов

Поскольку продукт гена *nifA* является основным транскрипционным активатором генов, кодирующих белки нитрогеназного комплекса, функциональную активность привнесенных ортологов этого гена у рекомбинантных штаммов ризобий определяли анализом индукции наработки корового белка нитрогеназы NifH.

Так как при анализе тотального белка рекомбинантных штаммов методом вестерн-блот проявлялась только одна целевая полоса, оценку наработки белка NifH проводили дот-блот методом (рисунок 11).

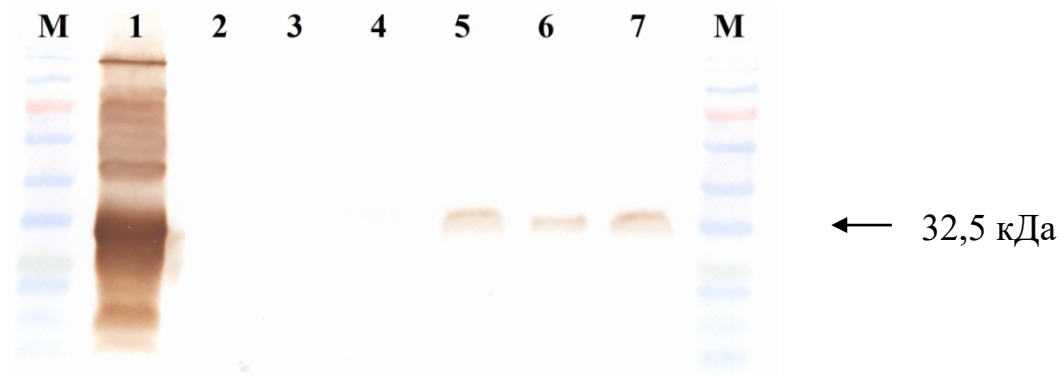


Рисунок 11 – Пример вестерн-блот анализа белков NifH, выделенных из штаммов клубеньковых бактерий дикого типа и их рекомбинантных вариантов. 1 – гибридационный профиль белка NifH, полученный из клубеньков гороха посевного; 2-4 – белок NifH, идентифицированный из штаммов дикого типа V_{Syl}7, M_{Lu}2 и L_{Zh}1, соответственно; 5-7 – белок NifH, идентифицированный из рекомбинантных штаммов V_{Syl}7ParaBADRhizo, M_{Lu}2ParaBAD_{Sino} и L_{Zh}1ParaBAD_{Meso}, соответственно. Концентрация индуктора арабинозы 1 мМ.

Было выявлено, что наработка белка NifH у диких штаммов клубеньковых бактерий не происходит, поскольку ген-регулятор находится в репрессированном

состоянии, тогда как во всех рекомбинантных штаммах при индукции гена *nifA* арабинозой нарабатывается данный белок.

По результатам анализа влияния на уровень наработки белка NifH различных концентраций индуктора бактериального промотора *ParaBAD*, под регуляцией которого находятся дополнительные копии *nifA* генов, были получены неоднозначные результаты. Так, при добавлении арабинозы в диапазоне 0,1 – 2 мМ было выявлено, что у разных рекомбинантных штаммов ризобий наибольший уровень наработки данного белка наблюдался при различных концентрациях индуктора, хотя транскрипционная активность гена *nifA* имеет прямую зависимость от концентрации вносимой в среду арабинозы (рисунок 12).

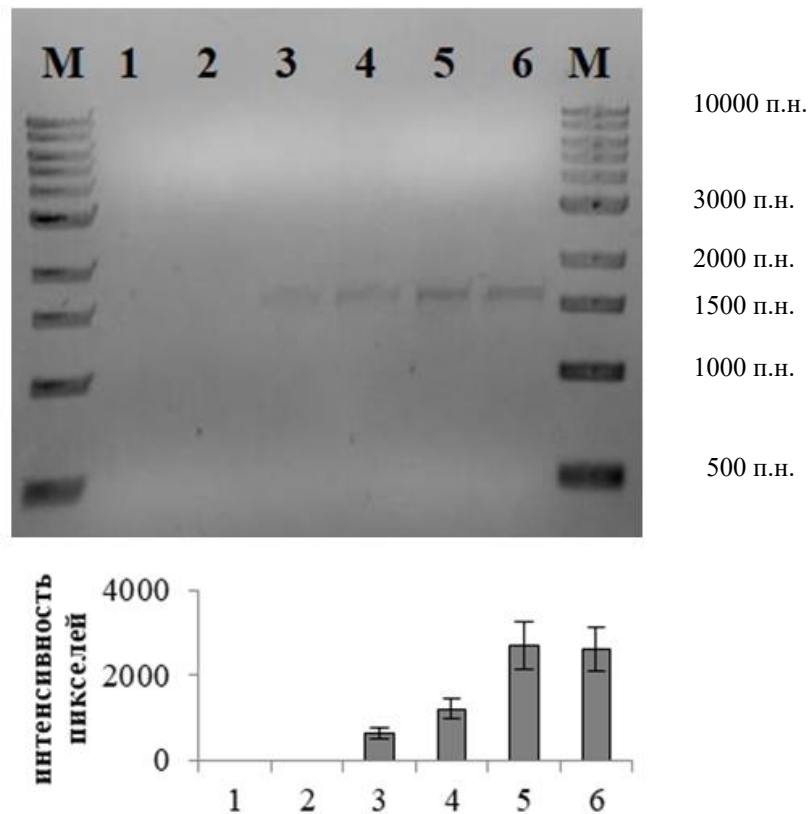


Рисунок 12 – Анализ транскрипционной активности гена *nifA* методом ОТ-ПЦР у рекомбинантного штамма бактерий *Rhizobium* sp. VSy17 с дополнительной копией данного гена рода *Rhizobium* при воздействии различных концентраций индуктора арабинозы: 1 – без индуктора; 2 – 0,1 мМ; 3 – 0,5 мМ; 4 – 1 мМ; 5 – 1,5 мМ; 6 – 2 мМ.

Вместе с этим, например, у рекомбинантных штаммов *R. leguminosarum* VSy17 с конструкцией *pJN105nifARhizo* и *Mesorhizobium* sp. LZh1 с *pJN105nifAMeso* было обнаружено, что уровень наработки белка NifH увеличивался уже при концентрации 0,1 мМ, которая при 0,5 мМ падала и опять повышалась при 1 мМ. Хотя у другого штамма *Ensifer* sp. MLu2 с *pJN105nifASino* наибольший уровень индукции гена *nifH* был выявлен при внесении 0,5 мМ индуктора, и с увеличением его концентрации постепенно данный показатель уменьшался. Без индукции также происходила наработка белка, что, предположительно, связано с явлением «протекания» промотора (рисунок 13).

Тем не менее обнаружить какую-либо закономерность действия определенной концентрации индуктора гена *nifA* на активацию генов, кодирующих нитрогеназу, не удалось. Предположительно это связано с тем, что индуктор оказывает опосредованное влияние на конечный белок через продукт гена *nifA*, на который в свою очередь могут действовать ингибирующие факторы. Поэтому каждый вариант рекомбинантного штамма обладает своей особенностью на ответ при воздействии на них индуктором.

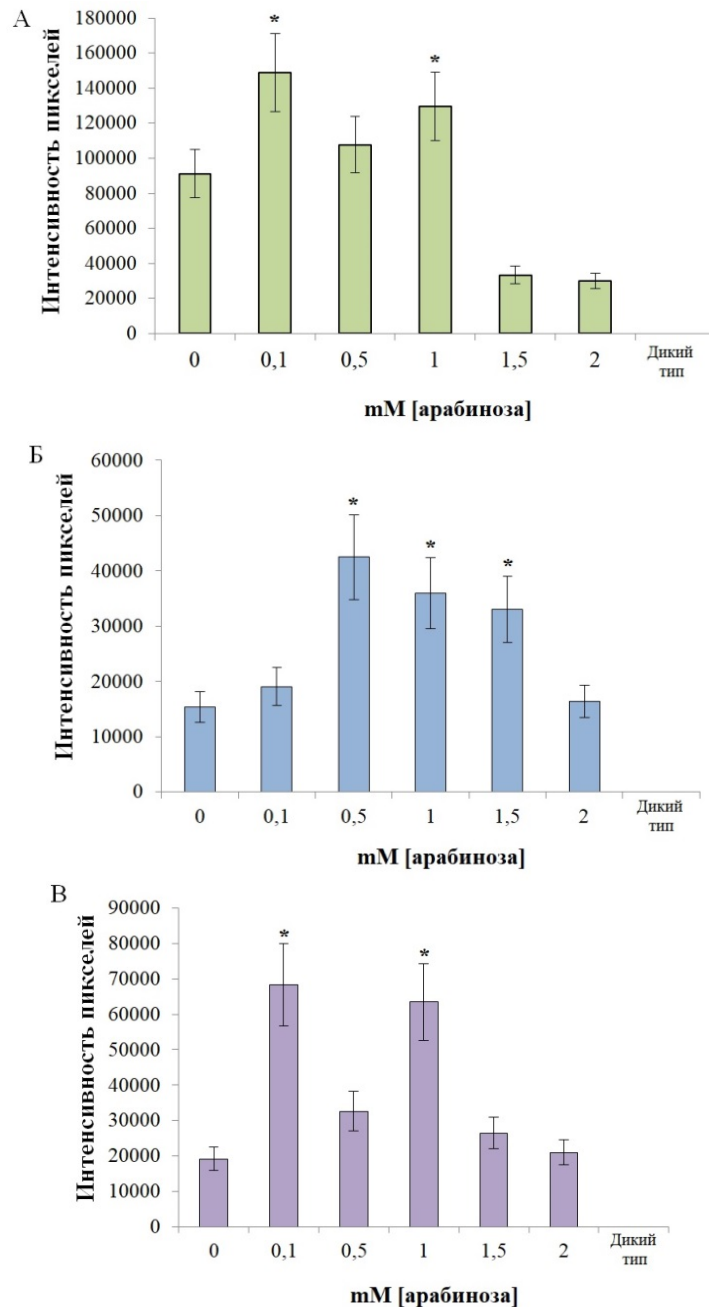


Рисунок 13 – Гистограммы анализа наработки белка NifH рекомбинантными бактериями и штаммами дикого типа дот-блот-методом, выращенными на питательной среде в присутствии/отсутствии индуктора – арабинозы в диапазоне концентраций 0,1 – 2 мМ. А. Рекомбинантный штамм бактерий *Rhizobium* sp. VSy17 с дополнительной активной копией *nifA* гена рода *Rhizobium*, штамм дикого типа – VSy17. Б. Рекомбинантный штамм бактерий *Ensifer* sp. MLu2 с дополнительной активной копией *nifA* гена рода *Ensifer*, штамм дикого типа – MLu2. В. Рекомбинантный штамм бактерий *Mesorhizobium* sp. LZh1 с

дополнительной активной копией *nifA* гена рода *Mesorhizobium*, штамм дикого типа – LZh1. Средняя интенсивность пикселей по точкам представлена в графическом режиме. Знаком «*» помечены столбцы, где данные представляют статистическую значимость при $p < 0,05$ между показателями рекомбинантных штаммов, выращенных на питательной среде в присутствии/отсутствии индуктора.

Далее было проанализировано влияние различных концентраций индуктора на изменение уровня азотфиксирующей активности методом редукции ацетилена. Исследуемые штаммы выращивали на питательной среде с добавлением арабинозы до достижения концентраций клеток 1×10^8 (см. раздел 2.2.19). В результате было показано, что при концентрации 1 мМ арабинозы наблюдается наибольший уровень азотфиксирующей активности у рекомбинантных штаммов, принадлежащим к трем основным родам клубеньковых бактерий (рисунок 14). Кроме этого, данная активность появлялась даже без добавления индуктора, что, по нашему мнению, связано с явлением «протекания» промотора *ParaBAD*, при котором наблюдается слабая экспрессия гена, находящегося под его управлением. Надо полагать, что для запуска процесса фиксации азота достаточно и небольшого количества наработанного белка NifA. Обратный эффект наблюдается при увеличении индуктора, что приводит к снижению азотфиксирующей активности, что может быть связано с повышенной нагрузкой на бактериальную клетку при увеличении наработки целевого белка. Для дальнейшей работы нами была выбрана концентрация индуктора равная 1 мМ.

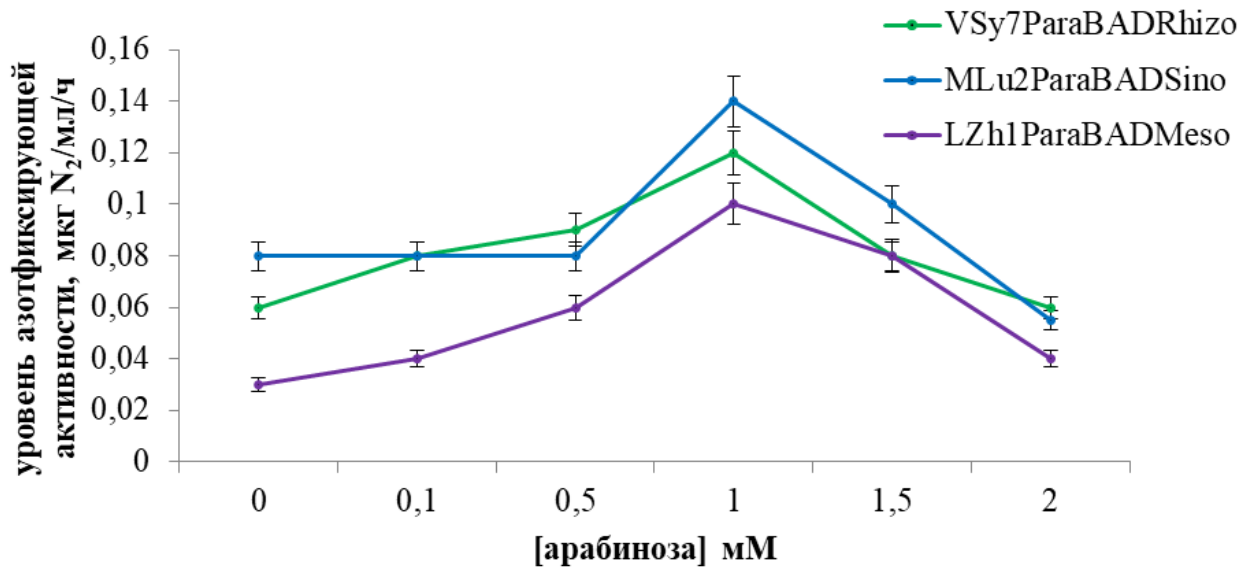


Рисунок 14 – Влияние различной концентрации индуктора на уровень азотфиксации.

Для проверки гипотезы об универсальности регуляторного гена *nifA* среди клубеньковых бактерий рекомбинантные штаммы, имеющие разные ортологи данного гена под управлением индуцибельного промотора, были проанализированы на наличие азотфиксирующей активности ацетиленовым методом. Во избежание получения ложноположительных результатов штаммы дикого типа культивировали как на питательной среде с добавлением индуктора, так и без него. В результате детектируемый уровень фиксации азота у данных бактерий *ex planta* не был обнаружен, что свидетельствовало об ингибированном состоянии нитрогеназы. В качестве контроля сравнения (положительного контроля) использовали штамм *Pseudomonas* sp. K749 (свободноживущий азотфиксатор), при этом уровень его азотфиксации не зависел от наличия или отсутствия добавления индуктора в питательную среду.

По результатам эксперимента было выявлено, что наличие активной дополнительной копии *nifA* гена у клубеньковых бактерий приводит к возникновению фиксации азота вне растений (рисунок 15). При этом азотфиксирующая активность данных микроорганизмов наблюдалась как при наличии конструкций с геном *nifA*, который характерен для бактерий своего рода,

так и с ортологами, клонированными из ризобий других родов. Это свидетельствует о том, что продукты гена *nifA* обладают универсальностью среди исследованных родов симбиотических азотфиксаторов (Владимирова и др., 2021b). Тем не менее было выявлено, что разные сочетания родовой принадлежности гена *nifA* и штаммов ризобий приводят к азотфиксирующей активности на различных уровнях. При этом большее значение имел именно штамм микроорганизмов, а не родовая принадлежность бактерий.

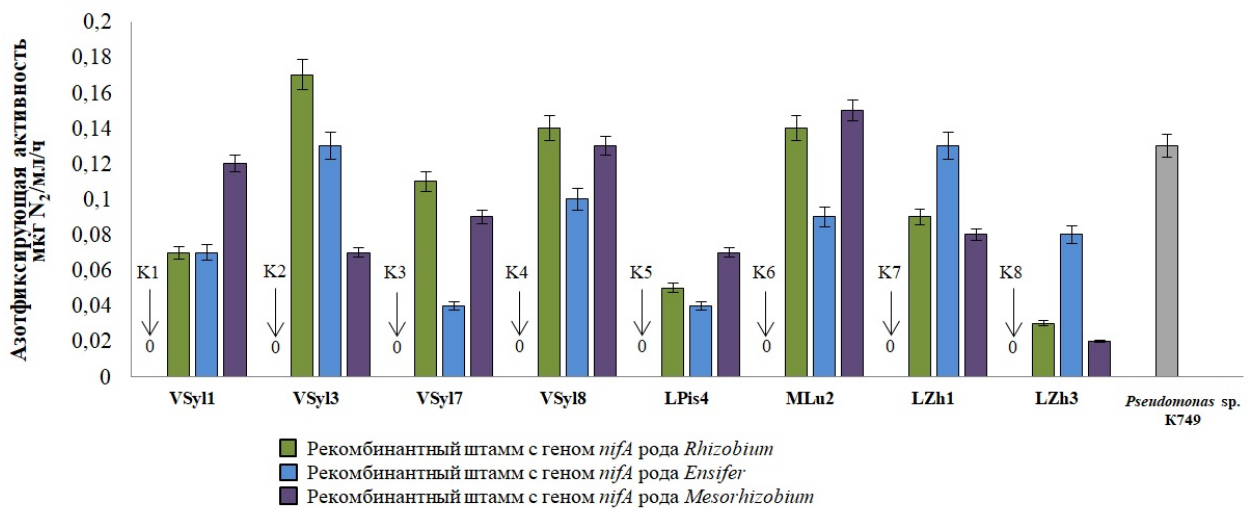


Рисунок 15 – Анализ азотфиксирующей активности рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий. В качестве образца для сравнения взяты дикие варианты штаммов клубеньковых бактерий K1 – K8.

Так отличия наблюдались даже среди штаммов *R. leguminosarum*. Наибольшая азотфиксирующая активность была отмечена у штамма *R. leguminosarum* VSy13 при привнесении гена *nifA*, характерного для бактерий рода *Rhizobium*. Однако у другого штамма VSy11 с такой же конструкцией этот показатель оказался ниже. Напротив, у него наибольшую азотфиксирующую активность вызвало привнесение гена *nifA*, характерного для рода *Mesorhizobium*. Интересные данные были получены по штамму *Ensifer* sp. MLu2, который показал наименьший уровень азотфиксации при трансформации конструкцией с *nifA* геном своего рода. В то время как наличие в клетке этого штамма с

дополнительной активной копии данного гена других родов бактерий придавало более высокий уровень азотфиксирующей активности. Аналогично у рекомбинантных штаммов рода *Mesorhizobium* привнесение в их клетки гена *nifA* микроорганизма своего же рода приводило к меньшей степени активации процесса фиксации азота по сравнению с привнесением гена *nifA* других родов клубеньковых бактерий. Наибольшие показатели у данных штаммов наблюдали при трансформации их конструкциями с геном *nifA* бактерий рода *Ensifer*.

3.5. Исследование стабильности привнесенного вектора среди клубеньковых бактерий

Необходимо отметить, что данное исследование проводилась на диких штаммах клубеньковых бактерий с неизвестными рекомбинационными характеристиками, поэтому важным этапом в работе являлся анализ стабильности привнесенных конструкций у рекомбинантных вариантов штаммов микроорганизмов, поскольку это может оказать значительное влияние на результаты экспериментов по экспрессии целевого гена. Известно, что ризобии характеризуются высокой мобильностью генетических элементов, и учет стабильности наследования плазмид является важной частью работы.

Бактерии, как известно, в составе своего генома имеют внехромосомные генетические элементы (плазмиды), которые детерминируют различные свойства, позволяющие им приспосабливаться к разнообразным условиям окружающей среды за счет экспрессии определенных наборов генов (Williams, 2004; Leplae et al., 2006; Heuer and Smalla, 2012; Dziewit et al., 2015; Porse et al., 2016). В генной инженерии плазмиды используются в качестве векторов для доставки и экспрессии экзогенной ДНК в бактериальных клетках, и их стабильное наследование при культивировании рекомбинантных вариантов штаммов имеет важное значение (Weaver et al., 1990; Lopez-Guerrero et al., 2012). Особенно это касается плазмид с высоким числом копий, которые обычно теряются из

бактериальной популяции с высокой скоростью, поскольку часто несут большую метаболическую нагрузку и не имеют определенных факторов поддержания, которые есть у природных плазмид (Million-Weaver and Camps, 2014).

В данной работе была исследована стабильность конструкции *pJN105* с *nifA* генами трех родов клубеньковых бактерий (*Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*). Для анализа были отобраны 3 штамма *R. leguminosarum* рода *Rhizobium* (VSyl3, VSyl7, LPis4) и по два штамма *Ensifer* sp. (MLu2 и MLu10) и *Mesorhizobium* sp. (LZh1 и LZh3), несущие дополнительную копию *nifA* гена своего рода. Исследование проводили по методике, описанной в разделе 2.2.25.

Было обнаружено, что среди трансформированных ризобий наблюдается потеря вектора при долговременном культивировании данных микроорганизмов, причем отличия имеются даже среди штаммов одного вида бактерии (рисунок 16). Так рекомбинантные штаммы *R. leguminosarum* VSyl3 и VSyl7, трансформированные конструкцией *pJN105ParaBADRhizo*, стабильно растут в течение 20 – 22 пассажей на среде с антибиотиком, что подтверждалось также ПЦР анализом (рисунок 17). У штамма LPis4 наблюдается постепенное снижение резистентности к гентамицину с 15-го пассажа и полная утрата роста на селективной среде происходит на 18 пассаже (рисунок 16).

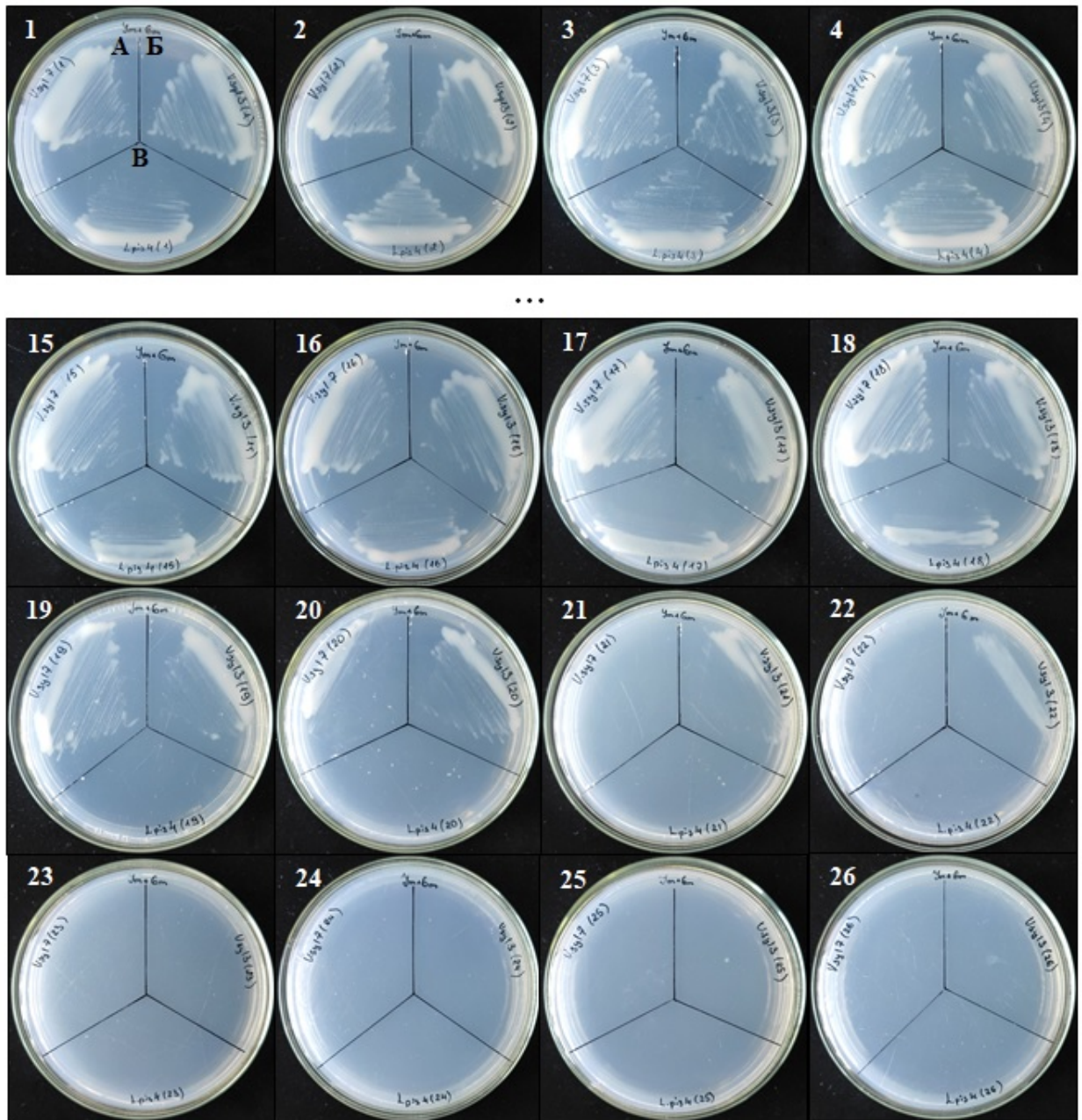


Рисунок 16 – Рост рекомбинантных штаммов на среде с антибиотиком в течение 26 пассажей. А – рекомбинантный штамм VSyl7ParaBADRhizo; Б – рекомбинантный штамм VSyl3ParaBADRhizo; В – рекомбинантный штамм LPis4ParaBADRhizo.

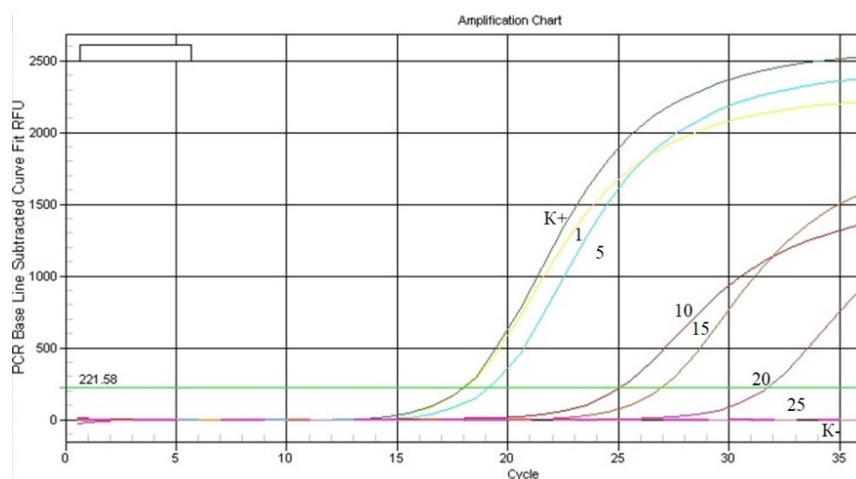


Рисунок 17 – График амплификации ДНК рекомбинантного штамма VSy17ParaBADRhizo, выращенного в течение 25 пассажей. K⁺ – положительный контроль (исходный рекомбинантный штамм). K⁻ – отрицательный контроль.

Совсем другие результаты выявляются при рассмотрении рекомбинантных микроорганизмов, относящихся к другим родам клубеньковых бактерий. Так рекомбинантный штамм MLu2ParaBADSino, принадлежащий к роду *Ensifer*, стабильно рос на среде с селективным маркером в течение 40 пассажей (рисунки 18, 19). Аналогичные данные были получены с другим штаммом рода *Ensifer* MLu10ParaBADSino, что может послужить подтверждением значения таксономической принадлежности в резистентности к антибиотикам.

Быстрее же всего плазмиды терялись у рекомбинантных клеток, относящихся к роду *Mesorhizobium*. Так штаммы *Mesorhizobium* sp. LZh1ParaBADMeso и LZh3ParaBADMeso показали снижение роста на среде с антибиотиком уже с 4-го пассажа (рисунки 20, 21).

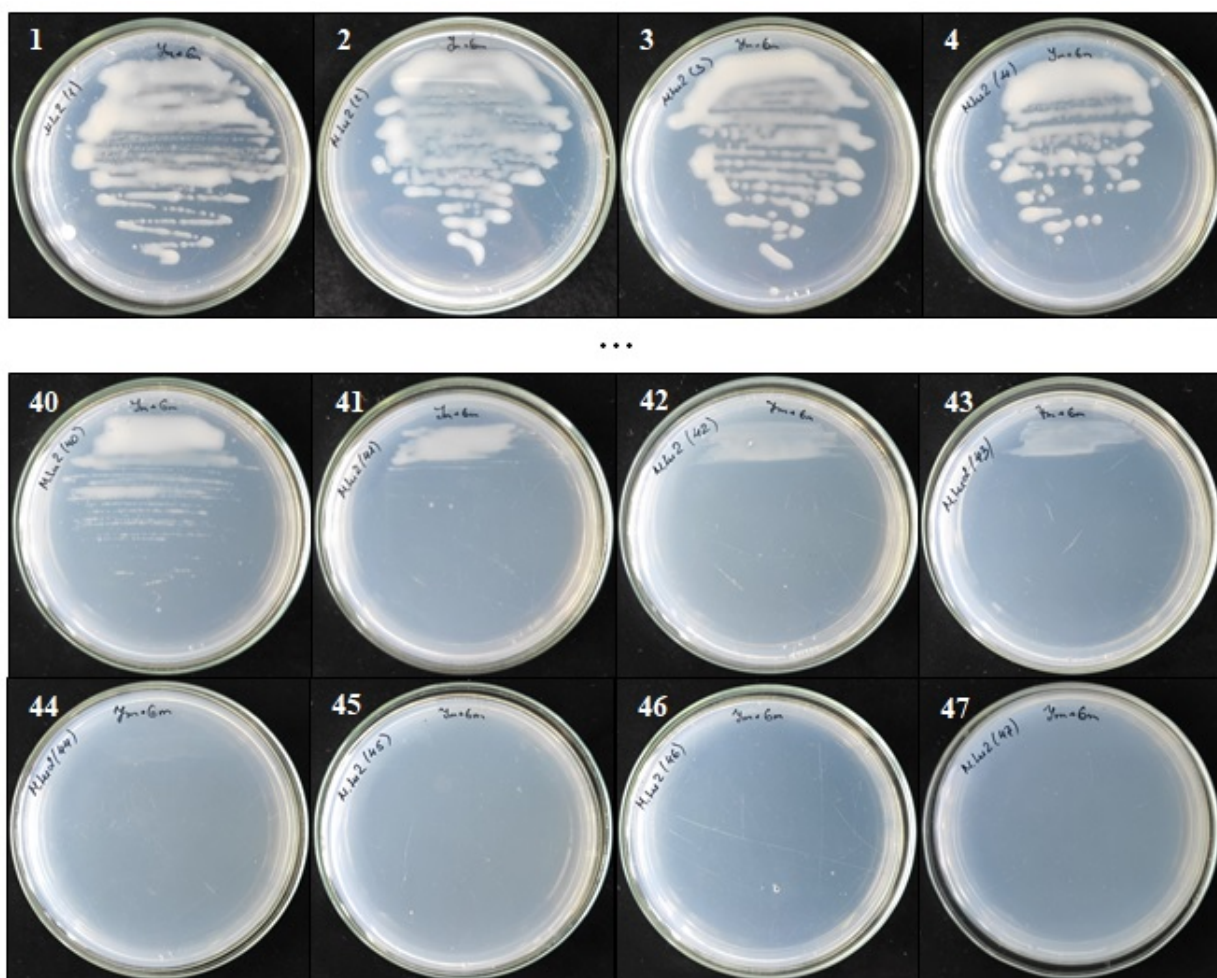


Рисунок 18 – Рост рекомбинантного штамма MLu2ParaBADSino на среде с антибиотиком в течение 47 пассажей.

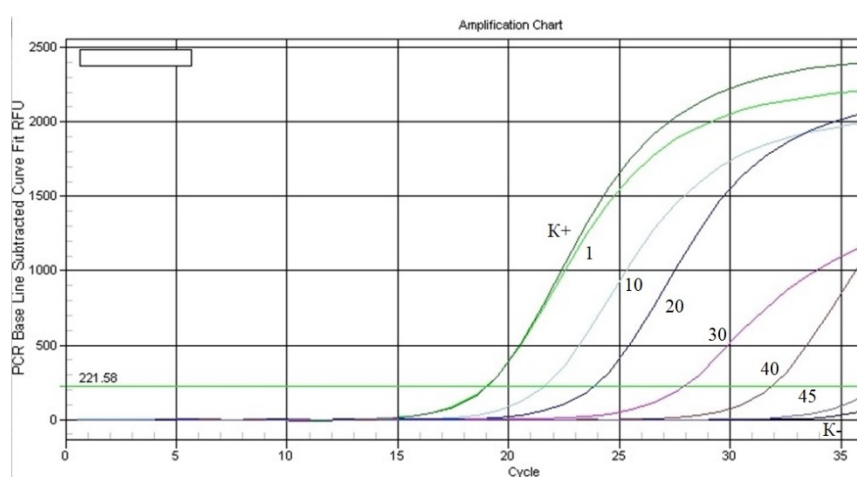


Рисунок 19 – График амплификации ДНК рекомбинантного штамма MLu2ParaBADSino, выращенного в течение 45 пассажей. K⁺ – положительный контроль (исходный рекомбинантный штамм). K⁻ – отрицательный контроль.

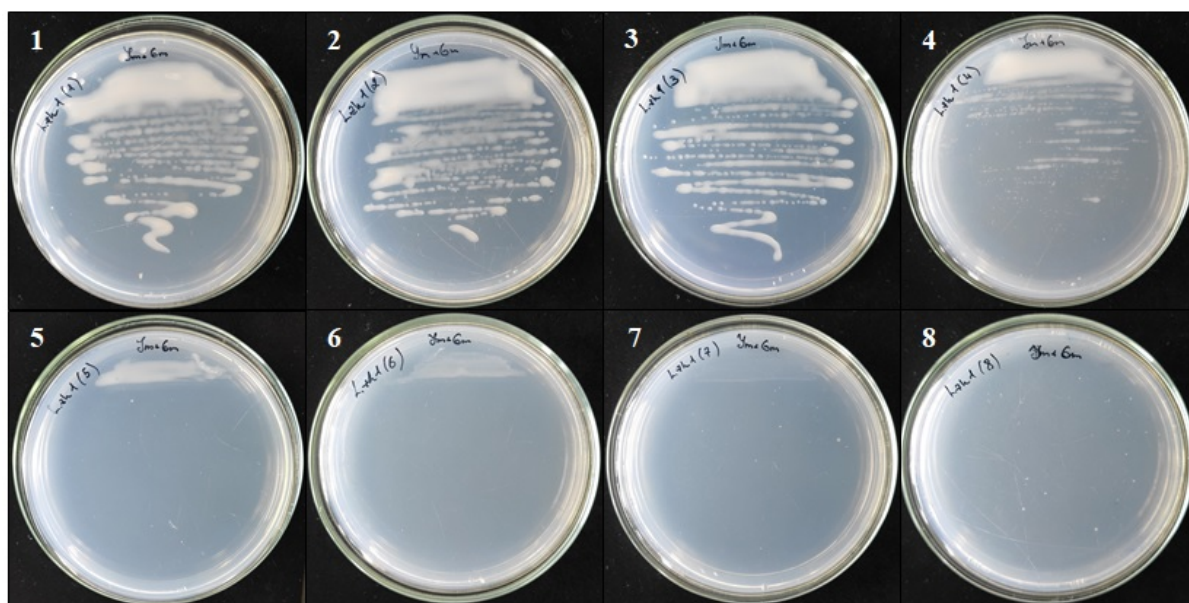


Рисунок 20 – Рост рекомбинантного штамма LZh1ParaBADMeso на среде с антибиотиком в течение 8 пассажей.

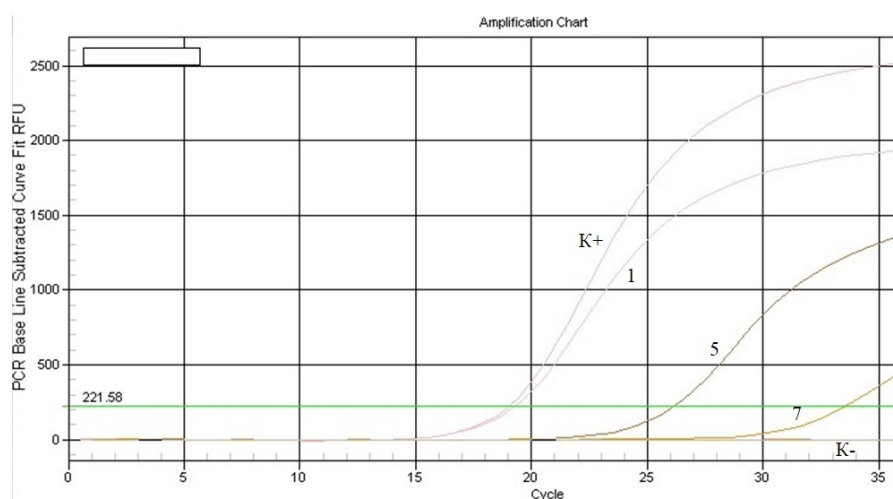


Рисунок 21 – График амплификации ДНК рекомбинантного штамма LZh1ParaBADMeso, выращенного в течение 7 пассажей. K+ – положительный контроль (исходный рекомбинантный штамм). K- – отрицательный контроль.

Таким образом, генно-инженерные конструкции, полученные на основе плазмиды широкого круга с репликоном BBR1 у рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий, имеют разную стабильность наследования. При этом явно прослеживается значение таксономического положения этих штаммов (Владимирова и др., 2021a). Медленнее всего потеря плазмид происходит у

бактерий рода *Ensifer*, где у клеток не прослеживается явной потери плазмиды вплоть до 40-го пассажа. У штаммов рода *Rhizobium* плазида сохраняется немного меньше, и стабильный рост рекомбинантные бактерии на селективной среде показывают в течение 20 пассажей. Наиболее быстрая элиминация плазмиды происходит у бактерий рода *Mesorhizobium*, где они более или менее сохраняются только в течение первых 4 пассажей. Полученные нами данные отражают разное отношение к стабильному наследованию привнесенных в клетку плазмид. Так, например, у быстрорастущих ризобий, к которым относятся бактерии рода *Rhizobium* и *Ensifer* в клетках часто обнаруживается большое количество разных плазмид, которые как часть генома имеют важное значение в определении общего фенотипа данных микроорганизмов. Необходимо отметить, что симбиотические гены, которые делают возможным отнесение данных микроорганизмов к группе клубеньковых бактерий, тоже имеют плазмидную локализацию. Напротив, у бактерий рода *Mesorhizobium* обнаружение в клетках плазмид редкое событие, симбиотические гены у данных микроорганизмов находятся на хромосоме в составе мобильных конъюгативных элементов, так называемых ICESym (Colombi et al., 2021). Разное отношение бактерий к наследованию внехромосомной части генома непременно отражается на стабильности рекомбинантных вариантов штаммов, что обязательно должно учитываться при постановке экспериментов с применением микроорганизмов с привнесенными генно-инженерными конструкциями.

3.6. Оценка влияния рекомбинантных штаммов на рост и развитие растений

Выявленное изменение азотфиксирующего статуса рекомбинантных бактерий в свободноживущем состоянии при индукции дополнительной копии гена *nifA*, а в некоторых случаях и без нее, дает возможность предположить, что привнесение генно-инженерных конструкций с активной копией данного гена

окажет влияние на ростостимулирующие характеристики исследуемых микроорганизмов.

Для ее оценки были проведены ростовые опыты инокулированных и контрольных растений в лабораторных и в естественных условиях. В лабораторных условиях у растений гороха учитывали такие показатели как: содержание растительных пигментов, сухая биомасса и количество клубеньков. В природных условиях оценивали продуктивность растений на основании данных по урожайности, используемых в изучении сельскохозяйственных культур. Опыты проводились на растении гороха посевного (*Pisum sativum*), а также ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare*), как отзывчивой на изменения содержания азота в почве сельскохозяйственной культуры. В качестве контроля сравнения использовали исходные варианты штаммов.

Фотосинтетические пигменты, такие как хлорофилл и каратиноиды, являются одними из наиболее важных химических соединений растений, поскольку они влияют на интенсивность фотосинтеза и производство биомассы. У высших растений хлорофилл представлен двумя типами: а и б. Хлорофилл а играет основную роль в процессах биосинтеза растений, так как обеспечивает преобразование световой энергии в энергию химических связей в процессе фотосинтеза. Хлорофилл б выполняет вспомогательную функцию (Tanaka et al., 1998). Каратиноиды защищают различные органические соединения от разрушения на свету в процессе фотоокисления, а также участвуют в поглощении света и передаче своей энергии возбуждения на хлорофилл (Hashimoto et al., 2016). Содержание данных пигментов считается показателем ответной реакции растений на изменение внешних факторов условий обитания (Selzer and Busso, 2016).

Для данного опыта были выбраны штаммы VSyl3, трансформированные различными вариантами гена *nifA*, поскольку они показали наибольшую азотфиксирующую активность *ex planta* (рисунок 22).

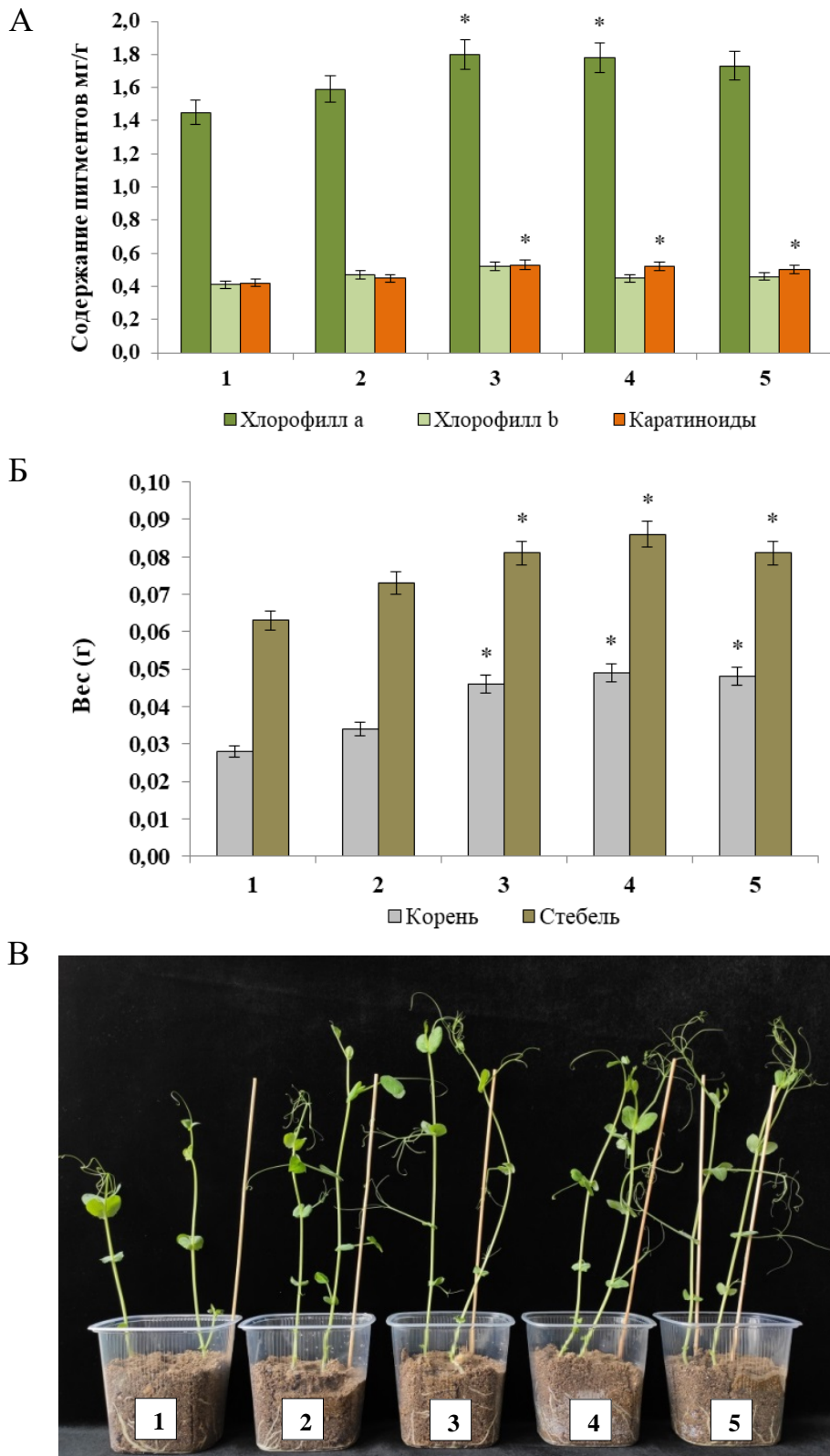


Рисунок 22 – Оценка ростостимулирующего влияния рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий на растения гороха: 1 – растение без обработки; 2 – штамм дикого типа VSyl3; 3 – рекомбинантный штамм VSyl3ParaBADRhizo; 4 –

рекомбинантный штамм VSyl3ParaBADsino; 5 – рекомбинантный штамм VSyl3ParaBADMeso. А – содержание растительных пигментов мг/г; Б – сухая масса (г); В – визуальная оценка. Знак «*» указывает на достоверные различия ($p < 0,05$) между растениями, обработанными рекомбинантными штаммами и штаммом дикого типа.

В результате было отмечено, что уровень хлорофилла **a** и каротиноидов у растений, которые были обработаны рекомбинантными штаммами VSyl3ParaBADRhizo и VSyl3ParaBADsino достоверно был выше, чем у растений обработанными диким вариантом штаммов и без нее. По количеству содержания хлорофилла **b** достоверных данных выявлено не было (рисунок 22А).

При инокуляции гороха обработка всеми исследуемыми штаммами ризобий приводила к формированию клубеньков. Тем не менее статистически значимых результатов различий в их количестве не было получено.

Для исследования влияния полученных бактерий на рост и развитие растений в природных условиях нами были отобраны штаммы, показавшие наибольший уровень азотфиксирующей активности вне растений. Ростостимулирующее влияние на горох оценивали по показателям урожайности. Было обнаружено, что после обработки семян гороха штаммами VSyl3ParaBADRhizo и VSyl8ParaBADsino данный показатель был выше, чем при инокулировании семян штаммами исходного типа и свободноживущего азотфиксатора (рисунок 23).

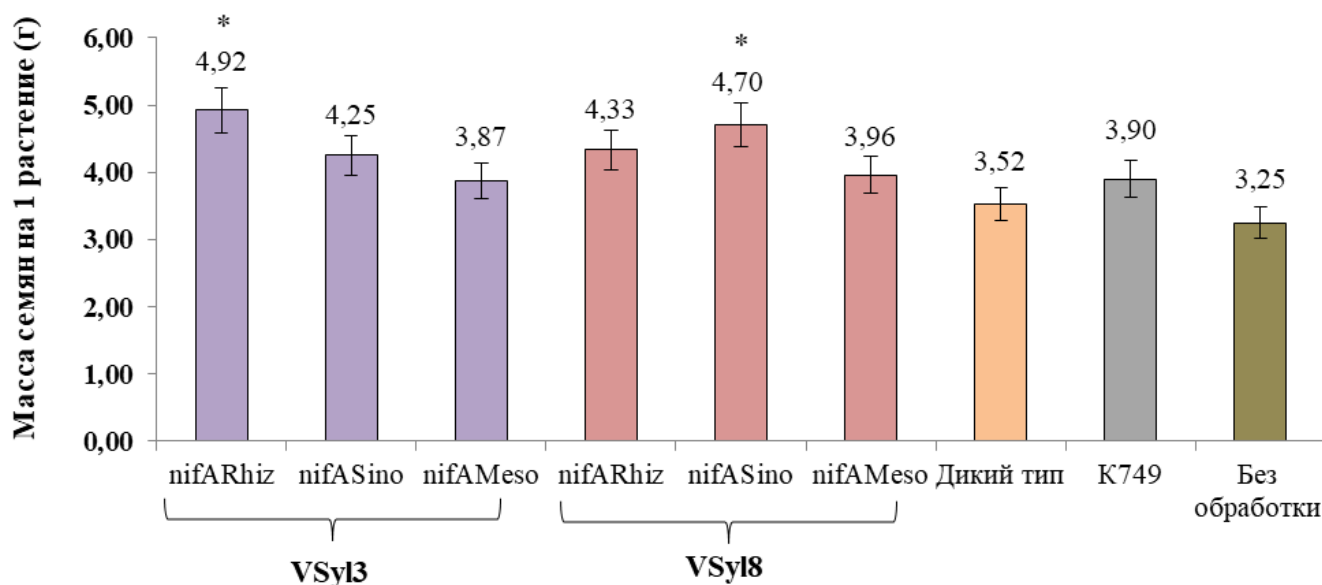


Рисунок 23 – Оценка влияния рекомбинантных штаммов на урожайность растения гороха в естественных условиях. Знак «*» указывает на достоверные различия ($p < 0,05$) между растениями, обработанными рекомбинантными штаммами и штаммом свободноживущего азотфиксатора.

Оценка ассоциативного ростостимулирующего влияния рекомбинантных бактерий на растения была проведена на культуре ячменя обыкновенного. Эксперимент также проводили в естественных условиях. Для инокуляции были выбраны разные варианты рекомбинантных штаммов, принадлежащие к трем основным родам ризобий. Сравнение проводили со штаммом свободноживущего азотфиксатора *Pseudomonas* sp. K749. Было показано, что положительное влияние на продуктивность культуры ячменя оказали не все рекомбинантные штаммы ризобий (рисунок 24). Так, например, штамм MLu2 с привнесенном геном *nifA* собственного рода показал наибольший уровень ростостимулирующего влияния, в то время как с другими вариантами данного гена такого не наблюдалось. Аналогичные данные были получены при инокуляции семян ячменя штаммом VSyl3. Таким образом, бактерии рода *Rhizobium* и *Ensifer*, имеющие дополнительную копию гена *nifA*, которая принадлежит собственному роду, оказывают положительное влияние на продуктивность ячменя. За исключением штамма LZhl с дополнительным геном *nifA* бактерий рода *Rhizobium*. При

обработке семян ячменя исходными типами штаммов изменений уровня урожайности по сравнению с необработанными семенами не было обнаружено.

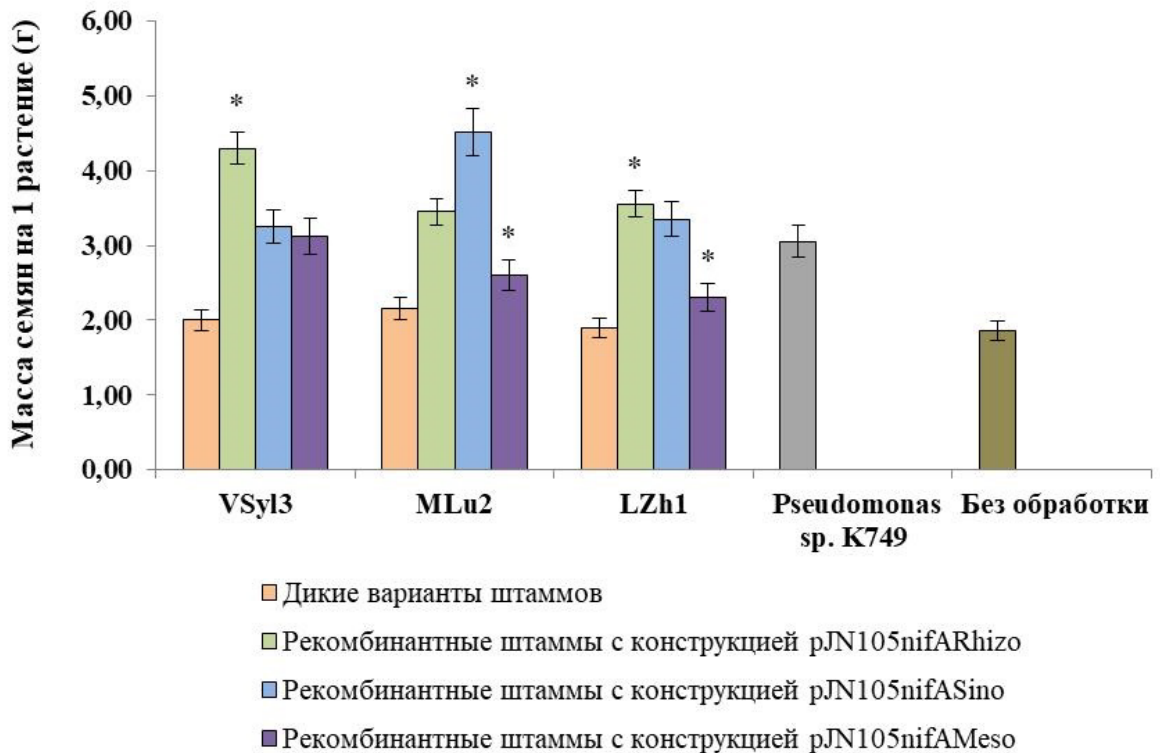


Рисунок 24 – Оценка ростостимулирующего влияния рекомбинантных штаммов ризобий на растения ячменя в естественных условиях. Знак «*» указывает на достоверные различия ($p < 0,05$) между растениями, обработанными рекомбинантными штаммами и штаммом свободноживущего азотфиксатора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактериальная азотфиксация представляет собой сложный процесс, в котором задействованы продукты десятков *nif*-генов. У азотфиксирующих бактерий их количество варьирует не только от вида к виду, но и от штамма к штамму. Это связано с высоким уровнем вовлеченности генов азотфиксации в горизонтальный перенос между бактериями и активном участии их в рекомбинационном процессе, результатом которого является высокое разнообразие различных сочетаний в комбинации *nif*-генов у разных штаммов ризобий. В конечном итоге это приводит к образованию микроорганизмов, имеющих разную эффективность азотфиксации.

Регуляция биологической фиксации азота является многоуровневым процессом. Тем не менее как у симбиотических, так и у свободноживущих азотфиксирующих микроорганизмов продукт гена *nifA* является основным конечным транскрипционным активатором *nif*-генов. Это обстоятельство делает ген *nifA* наравне с генами коровой части нитрогеназы неотъемлемой частью комплекса генов, участвующих в фиксации азота.

По взаиморасположению *nif*-генов в кластере *sum*-генов можно сделать предположение об отсутствии высокой сцепленности *nifA* с генами, кодирующими белки коровой части нитрогеназного комплекса, что дает ему возможность вовлекаться в горизонтальный перенос отдельно от остальных *nif*-генов. Это может привести в дальнейшем к различным сочетаниям регуляторной и коровой части генов, кодирующих нитрогеназу. На сегодняшний день известно достаточно большое количество случаев, когда бактерии одного штамма в составе своего генома содержат разные филогенетические варианты одноименных *nif*-генов, что, скорее всего, является результатом комбинаторной эволюции вследствие горизонтального переноса генов (Barcellos et al., 2007; González et al., 2019; Cavassim et al., 2020). Мы в настоящем исследовании попытались оценить уровень функциональной специфичности ортологов гена *nifA* в клетках бактерий трех родов ризобий, что могло бы пролить свет на возможность комбинаторной

эволюции состава *nif*-генов у разных штаммов клубеньковых бактерий в ходе рекомбинационных процессов.

По результатам работы было выявлено, что индукция азотфиксирующей активности у штаммов клубеньковых бактерий в свободноживущем состоянии путем привнесения в них ортологов гена *nifA* возможна. При этом наблюдается функциональная универсальность NifA внутри бактерий трех взятых в анализ родов ризобий. Уровни активации азотфиксации у штаммов одного вида разными филогенетическими вариантами NifA имеют различные значения, что говорит о том, что кроме эволюционной составляющей большое значение имеет сочетание набора генов, участвующих в процессе азотфиксации. Работы по искусственной комбинаторной эволюции *nif*-генов проводятся регулярно. Но до сих пор не известен механизм совместной работы всех продуктов данных генов, значение разных их сочетаний в эффективности азотфиксации (Smanski et al., 2014). И поскольку в природе встречаются штаммы бактерий даже одного вида с отличающейся эффективностью азотфиксации и соответственно разным набором и локализацией *nif*-генов, то это может означать, что процесс образования разных их комбинаций постоянный и имеет огромное значение в биологической минерализации атмосферного азота. Скорее всего, именно универсальность отдельных компонентов группы *nif*-генов делает возможным участие комбинаторных механизмов в эволюции генов азотфиксации, а также дает объяснение способности образования химерных штаммов ризобий, когда в клетках клубеньковых бактерий обнаруживаются симбиотические гены другой филогенетической принадлежности. Таким образом, еще раз подтверждается ключевая роль ГПГ между клубеньковыми бактериями в формировании большого разнообразия потенциально способных к азотфиксирующему симбиозу генетических вариантов ризобий и главенствующая роль бобового растения в отборе наиболее оптимальных для него штаммов клубеньковых бактерий.

ВЫВОДЫ

1. Методом филогенетического анализа показано, что наряду с параллельной эволюцией гена *nifA* и коровой части генома существуют штаммы бактерий, для которых характерно наличие в геноме ортологов данного гена в качестве единственного варианта или дополнительной копии, что свидетельствует об участии гена *nifA* в комбинаторной эволюции вследствие горизонтального переноса генов.
2. Выявлено, что все исследованные штаммы ризобий при привнесении в их геном дополнительной экспрессирующей копии гена *nifA* других родов клубеньковых бактерий приобретают способность фиксировать азот *ex planta*, что указывает на отсутствие строгой специфичности в активности этого гена в штаммах ризобий внутри группы клубеньковых бактерий.
3. Установлено, что ортологи гена *nifA* в разных штаммах ризобий показывают различные уровни азотфиксирующей активности, которые имеют зависимость не от их родовой принадлежности, а от штамма бактерии-реципиента.
4. Показано, что полученные рекомбинантные штаммы клубеньковых бактерий обладают ростостимулирующим влиянием на культуры гороха (VSyl3ParaBADRhizo, VSyl8ParaBADsino) и ячменя (VSyl3ParaBADRhizo, MLu2ParaBADsino, LZh1ParaBADRhizo).
5. Выявлено, что стабильность привнесенной плазмиды среди рекомбинантных штаммов ризобий варьирует в зависимости от родовой принадлежности штамма-реципиента. Большей стабильностью наследования плазмиды обладали рекомбинантные штаммы рода *Ensifer*, меньшей – род *Mesorhizobium*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ	– аденозиндифосфат
АТФ	– аденозинтрифосфат
ГПГ	– горизонтальный перенос генов
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
КОЕ	– колониобразующая единица
МГЭ	– мобильный генетический элемент
ОТ-ПЦР	– полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
п.н.	– пара нуклеотидов
ПААГ	– полиакриламидный гель
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
т.п.н.	– тысяча пар нуклеотидов
ТАЕ	– трис-ацетат-ЭДТА буфер
ТЕ	– трис-ЭДТА буфер
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
ARN	– специфическая нуклеотидная последовательность, где А представляет собой адениновый нуклеотид, R - пуриновый нуклеотид, а N - любой нуклеотид
DAВ	– 3,3'-диаминобензидин
ЕРВ	– enhancer-binding protein
GAF-домен	– элемент третичной структуры белка
Gm	– антибиотик гентамицин
НТН	– Helix-Turn-Helix (спираль-поворот-спираль)

ICESym	– конъюгативные элементы с генами, необходимыми для симбиоза
IHF	– integration host factor
IS	– insertion sequence
LB	– среда Лурия-Бертани
NEB	– фирма «New England Biolabs»
PMSF	– phenylmethylsulfonyl fluoride
QS	– quorum sensing
RAPD	– random amplification of polymorphic DNA
SDS	– додецилсульфат натрия
sRNA	– small RNA
TEMED	– tetramethylethylenediamine
UAS	– upstream activating sequence
YM	– маннитно-дрожжевая среда

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баймиев, Ан.Х. Влияние интродукции Караганы древовидной на состав ее клубеньковых бактерий / Ан.Х. Баймиев, К.Г. Птицын, Ал.Х. Баймиев // Микробиология. – 2010. – Т. 79. – № 1. – С. 123–128.
2. Баймиев, Ан.Х. Генетическая характеристика клубеньковых бактерий бобовых рода *Lathyrus*, произрастающих на территории Республики Башкортостан / Ан.Х. Баймиев, К.Г. Птицын, А.А. Мулдашев, Ал.Х. Баймиев // Экологическая генетика. – 2011. – Т. 9. – № 2. – С. 3–8.
3. Баймиев, Ан.Х. Генетическая характеристика клубеньковых бактерий эндемичных для южного Урала видов рода *Oxytropis* (Fabaceae-бобовые) / Ан.Х. Баймиев, А.А. Владимирова, Е.С. Акимова и др. // Экологическая генетика. – 2020. – Т. 18. – № 2. – С. 157–167.
4. Баймиев, Ан.Х. Генетическое разнообразие и филогения клубеньковых бактерий выделенных из клубеньков растений рода *Lupinaster*, произрастающих на южном Урале / Ан.Х. Баймиев, Е.С. Акимова, Р.С. Гуменко и др. // Генетика. – 2019а. – Т. 55. – № 1. – С. 52–59.
5. Баймиев, Ан.Х. Искусственная активация экспрессии *nif*-генов у клубеньковых бактерий *ex planta* / Ан.Х. Баймиев, Р.С. Гуменко, А.А. Владимирова и др. // Экологическая генетика. – 2019б. – Т. 17. – № 2. – С. 35–42.
6. Владимирова, А.А. Исследование стабильности наследования рекомбинантных плазмид клубеньковыми бактериями / А.А. Владимирова, Е.С. Акимова, И.С. Коряков и др. // Биомика. – 2021а. – Т. 13. – № 4. – С. 402–408.
7. Владимирова, А.А. Функциональная специфичность продукта гена *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий / А.А. Владимирова, Р.С. Гуменко, Е.С. Акимова и др. // Микробиология. – 2021б. – Т. 90. – № 4. – С. 471–479.
8. Глянько, А.К. Бобово-ризобиальный симбиоз: некоторые современные знания / А.К. Глянько, А.А. Ищенко, Н.В. Филинова // Вестник харьковского

- национального аграрного университета. Серия Биология. – 2017. –Т.3. – № 42. – С. 6–22.
9. Гуменко, Р.С. Генетическая регуляция азотфиксации у бактерий / Р.С. Гуменко, Г.М. Кашапова, А.А. Владимирова, А.С. Кагирова, Ан.Х. Баймиев // Биомика. – 2017. – Т. 9. – № 4. – С. 340–344.
 10. Гуменко, Р.С. Получение штаммов клубеньковых бактерий с измененной регуляцией генов нитрогеназного комплекса: дисс. ...канд. биол. наук: 03.02.07 / Гуменко Роман Сергеевич. – Уфа, 2020. – 120 с.
 11. Иванова, Е.С. Искусственная регуляция генов, кодирующих белки нитрогеназного комплекса ризобияльных бактерий / Е.С. Иванова, Р.С. Гуменко, Ан.Х. Баймиев // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2014. – Т. 174. – № 13. – С. 36–39.
 12. Ключковский, В.М. Агрохимия: учебное пособие / В.М. Ключковский, А.В. Петербургский (ред.) // М: Колос. – 1967. – 683 с.
 13. Лысак, В.В. Микробиология: учебное пособие. / В.В. Лысак // Минск: Изд-во Белорус. гос. ун-та. – 2007. – 426 с.
 14. Сахно, О.Н. Экология микроорганизмов: учебное пособие. В 3-х частях. Часть 1 / О.Н. Сахно, Т.А. Трифонова // Владимир: Изд-во Владим. гос. ун-та. – 2007. – 64 с.
 15. Сытников, Д.М. Биотехнология микроорганизмов-азотфиксаторов и перспективы применения препаратов на их основе / Д.М. Сытников // Биотехнология. – 2012. – Т. 5. – № 4. – С. 34–45.
 16. Тихонович, И.А. Перспективы использования азотфиксирующих и фитостимулирующих микроорганизмов для повышения эффективности агропромышленного комплекса и улучшения агроэкологической ситуации в РФ / И.А. Тихонович, А.А. Завалин // Плодородие. – 2016. – №. 5. – С. 28–32.
 17. Тихонович, И.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего / И.А. Тихонович, Н.А. Проворов // СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та. – 2009. – 210 с.

18. Умаров, М.М. Ассоциативная азотфиксация / М.М. Умаров // М.: Изд-во Моск. ун-та. – 1986. – 136 с.
19. Шеманова, Н.М. Об активности и вирулентности клубеньковых бактерий фасоли / Н.М. Шеманова, Р.Р. Олейников // Новое в изучении биологической фиксации азота. М.: Наука. – 1971.– С. 116–124.
20. Шестаков, С.В. Как происходит и чем регулируется горизонтальный перенос у бактерий / С.В. Шестаков // Экологическая генетика. – 2007. – Т. 5. – № 2. – С. 12–24.
21. Шестаков, С.В. Эволюция систем горизонтального переноса генов у бактерий / С.В. Шестаков, Е.А. Карбышева // Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. – 2017. – С. 14–19.
22. Шлык, А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев / А.А. Шлык // Биохимические методы в физиологии растений. М: Наука. – 1971. – Т 19. – №1– С. 154–170.
23. 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. – V. 163. – №. 2. – P. 173–181.
24. Alcaman, M.E. The cyanobacterium *Mastigocladus* fulfills the nitrogen demand of a terrestrial hot spring microbial mat / M.E. Alcaman, C. Fernandez, A. Delgado et al. // The ISME Journal. – 2015. – V. 9. – № 10. – P. 2290–2303.
25. An, Q. Constitutive expression of the *nifA* gene activates associative nitrogen fixation of *Enterobacter gergoviae* 57-7, an opportunistic endophytic diazotroph / Q. An, Y. Dong, W. Wang et al. // Journal of Applied Microbiology. – 2007. – V. 103. – №3. P. – 613–620.
26. Andrews, M. Horizontal transfer of symbiosis genes within and between rhizobial genera: occurrence and importance / M. Andrews, S. De Meyer, E.K. James et al. // Genes. – 2018. – V. 9. – № 7. – P. 321.

27. Anglade, J. Relationships for estimating N₂ fixation in legumes: incidence for N balance of legume-based cropping systems in Europe / J. Anglade, G. Billen, J. Garnier // *Ecosphere*. – 2015. – V. 6. – № 3. – P. 1–24.
28. Antoine, R. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms / R. Antoine, C. Locht // *Molecular Microbiology*. – 1992. – V. 6. – № 13. – P. 1785–1799.
29. Arnold, W. Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* / W. Arnold, A. Rump, W. Klipp et al. // *Journal of Molecular Biology*. – 1988. – V. 203. – № 3. – P. 715–738.
30. Bailly, X. Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago* species / X. Bailly, I. Olivieri, B. Brunel et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2007. – V. 189. – № 14. – P. 5223–5236.
31. Barcellos, F.G. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil / F.G. Barcellos, P. Menna, J.S. da Silva Batista, M. Hungria // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2007. – V. 73. – № 8. – P. 2635–2643.
32. Barra-Bily, L. The *Sinorhizobium meliloti* RNA chaperone Hfq mediates symbiosis of *S. meliloti* and alfalfa / L. Barra-Bily, S.P. Pandey, A. Trautwetter et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2010. – V. 192. – № 6. – P. 1710–1718.
33. Barran, L.R. *Sinorhizobium meliloti* plasmid pRm1132f replicates by a rolling-circle mechanism / L.R. Barran, N. Ritchot, E.S.P. Bromfield // *Journal of Bacteriology*. – 2001. – V. 183. – № 8. – P. 2704–2708.
34. Barrett, J. Concerted inhibition of the transcriptional activation functions of the enhancer-binding protein NIFA by the anti-activator NIFL / J. Barrett, P. Ray, A. Sobczyk et al. // *Molecular Microbiology*. – 2001. – V. 39. – № 2. – P. 480–494.

35. Bassi, D. Nitrogen supply influences photosynthesis establishment along the sugarcane leaf / D. Bassi, M. Menossi, L. Mattiello // *Scientific Reports*. – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 1–13.
36. Berada, H. Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives / H. Berada, K. Fikri-Benbrahim // *British Microbiology Research Journal*. – 2014. – V. 4. – № 6. – P. 616–639.
37. Berger, D.K. The isolated catalytic domain of NifA, a bacterial enhancer protein, activates transcription in vitro: activation is inhibited by NifL / D.K. Berger, F. Narberhaus, S. Kustu // *PNAS*. – 1994. – V. 91. – № 1 – P. 103–107.
38. Bimboim, H.C. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA / H.C. Bimboim, J. Doly // *Nucleic Acids Research*. – 1979. – V. 7. – № 6. – P. 1513–1523.
39. Bobik, C. FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti* / C. Bobik, E. Meilhoc, J. Batut // *Journal of Bacteriology*. – 2006. – V. 188. – № 13. – P. 4890–4902.
40. Boesten, B. The C-terminal receiver domain of the *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* FixL protein is required for free-living microaerobic induction of the *fnrN* promoter / B. Boesten, U.B. Priefer // *Microbiology*. – 2004. – V. 150. – № 11. – P. 3703–3713.
41. Bosworth, A.H. Alfalfa yield response to inoculation with recombinant strains of *Rhizobium meliloti* with an extra copy of *dctABD* and/or modified *nifA* expression / A.H. Bosworth, M.K. Williams, K.A. Albrecht et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1994. – V. 60. – № 10. – P. 3815–3832.
42. Bothe, H. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria / H. Bothe, O. Schmitz, M.G. Yates, W.E. Newton // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2010. – V. 74. – № 4. – P. 529–551.
43. Boussau, B. Computational inference of scenarios for α -proteobacterial genome evolution / B. Boussau, E.O. Karlberg, A.C. Frank et al. // *PNAS*. – 2004. – V. 101. – № 26. – P. 9722–9727.

44. Boyd, E.S. Evolution of molybdenum nitrogenase during the transition from anaerobic to aerobic metabolism / E.S. Boyd, A.M.G. Costas, T.L. Hamilton et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2015. – V. 197. – № 9. – P. 1690–1699.
45. Boyd, E.S. An alternative path for the evolution of biological nitrogen fixation / E.S. Boyd, T.L. Hamilton, J.W. Peters // *Frontiers in Microbiology*. – 2011. – V. 2. – P. 205.
46. Boyd, E.S. New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation / E.S. Boyd, J.W. Peters // *Frontiers in Microbiology*. – 2013. – V. 4. – P. 201.
47. Brom, S. Transfer of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 requires cointegration with p42a, which may be mediated by site-specific recombination / S. Brom, L. Girard, C. Tun-Garrido et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2004. – V. 186. – № 22. – P. 7538–7548.
48. Buchanan-Wollaston, V. Role of the *nifA* gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumonia* / V. Buchanan-Wollaston, M.C. Cannon, J.L. Beynon, F.C. Cannon // *Nature*. – 1981. – V. 294. – № 5843. – P. 776–778.
49. Buck, M. The bacterial enhancer-dependent $\zeta 54$ (ζN) transcription factor / M. Buck, M.T. Gallegos, D.J. Studholme et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2000. – V. 182. – № 15. – P. 4129–4136.
50. Bueno Batista, M. Manipulating nitrogen regulation in diazotrophic bacteria for agronomic benefit / M. Bueno Batista, R. Dixon // *Biochemical Society Transactions*. – 2019. – V. 47. – № 2. – P. 603–614.
51. Burén, S. State of the art in eukaryotic nitrogenase engineering / S. Burén, L.M. Rubio // *FEMS Microbiology Letters*. – 2018. – V. 365. – № 2. – P. 1–9.
52. Bush, M. The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of $\sigma 54$ -dependent transcription / M. Bush, R. Dixon // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2012. – V. 76. – № 3. – P. 497–529.
53. Cavassim, M.I.A. Symbiosis genes show a unique pattern of introgression and selection within a *Rhizobium leguminosarum* species complex / M.I.A. Cavassim,

- S. Moeskjær, C. Moslemi et al. // *Microbial Genomics*. – 2020. – V. 6. – № 4. – P. e000351.
54. Cervantes, L. The conjugative plasmid of a bean-nodulating *Sinorhizobium fredii* strain is assembled from sequences of two *Rhizobium* plasmids and the chromosome of a *Sinorhizobium* strain / L. Cervantes, P. Bustos, L. Girard et al. // *BMC Microbiology*. – 2011. – V. 11. – № 1. – P. 1–11.
55. Chaney, M. Binding of transcriptional activators to sigma 54 in the presence of the transition state analog ADP-aluminum fluoride: insights into activator mechanochemical action / M. Chaney, R. Grande, S.R. Wigneshweraraj et al. // *Genes Development*. – 2001. – V. 15. – № 17. – P. 2282–2294.
56. Clark, S.R.D. RpoN of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain VF39SM plays a central role in FnrN-dependent microaerobic regulation of genes involved in nitrogen fixation / S.R.D. Clark, I.J. Oresnik, M.F. Hynes // *Molecular and General Genetics*. – 2001. – V. 264. – № 5. – P. 623–633.
57. Clewell, D.B. Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular DNA form / D.B. Clewell, D.R. Helinski // *PNAS*. – 1969. – V. 62. – №4. – P. 1159–1166.
58. Clúa, J. Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis / J. Clúa, C. Roda, M.E. Zanetti, F.A. Blanco // *Genes*. – 2018. – V. 9. – № 3. – P. 125.
59. Cocking, E.C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria / E.C. Cocking // *Plant and Soil*. – 2003. – № 252. – № 1. – P. 169–175.
60. Cohen, S. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria – Genetic Transformation of *E. coli* by R-factor DNA / S. Cohen, A. Chang A, L. Hsu // *PNAS*. – 1972. – V. 69. – № 8. – P. 2110–2114.
61. Colombi, E. Comparative analysis of integrative and conjugative mobile genetic elements in the genus *Mesorhizobium* / E. Colombi, B.J. Perry, J.T. Sullivan et al. // *Microbial Genomics*. – 2021. – V. 7. – № 10. – P. 000657.
62. Cytryn, E.J. Insights learned from pBTai1, a 229-kb accessory plasmid from *Bradyrhizobium* sp. strain BTai1 and prevalence of accessory plasmids in other

- Bradyrhizobium* sp. strains / E.J. Cytryn, S. Jitackson, E. Giraud, M.J. Sadowsky // The ISME Journal. – 2008. – V. 2. – № 2. – P. 158–170.
63. Dai, Z. Identification of nitrogen-fixing genes and gene clusters from metagenomic library of acid mine drainage / Z. Dai, X. Guo, H. Yin et al. // PLoS one. – 2014. – V. 9. – № 2. – P. e87976.
64. de Vries, W. Impacts of nitrogen emissions on ecosystems and human health: A mini review / W. de Vries // Current Opinion in Environmental Science & Health. – 2021. – V. 21. – P. 100249.
65. DeLuca, T. Quantifying nitrogen-fixation in feather moss carpets of boreal forests / T. DeLuca, O. Zackrisson, M.C. Nilsson, A. Sellstedt // Nature. – 2002. – V. 419. – № 6910. – P. 917–920.
66. diCenzo, G. The tRNA^{arg} gene and *engA* are essential genes on the 1.7-Mb pSymb megaplasmid of *Sinorhizobium meliloti* and were translocated together from the chromosome in an ancestral strain / G. diCenzo, B. Milunovic, J. Cheng, T.M. Finan // Journal of Bacteriology. – 2013. – V. 195. – № 2. – P. 202–212.
67. Ding, H. Genetic characterization of a novel rhizobial plasmid conjugation system in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain VF39SM / H. Ding, C.B. Yip, M.F. Hynes // Journal of Bacteriology. – 2013. – V. 195. – № 2. – P. 328–339.
68. Ding, H. Plasmid transfer systems in the rhizobia / H. Ding, M.F. Hynes // Canadian Journal of Microbiology. – 2009. – V. 55. – № 8. – P. 917–927.
69. Dixon, R. Genetic regulation of biological nitrogen fixation / R. Dixon, D. Kahn // Nature Reviews Microbiology. – 2004. – V. 2. – № 8. – P. 621–631.
70. Dixon, R.A. Genetic transfer of nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* / R.A. Dixon, J.R. Postgate // Nature. – 1972. – V. 237. – № 5350. – P. 102–103.
71. Dodsworth, J.A. Regulation of nitrogenase by 2-oxoglutarate-reversible, direct binding of a PII-like nitrogen sensor protein to dinitrogenase / J.A. Dodsworth, J.A. Leigh // PNAS. – 2006. – V. 103. – № 26. – P. 9779–9784.

72. Dos Santos, P.C. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes / P.C. Dos Santos, Z. Fang, S.W. Mason et al. // *BMC Genomics*. – 2012. – V. 13. – № 1. – P. 162.
73. Downie, J.A. Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules / J.A. Downie // *Current biology*. – 2005. – V. 15. – № 6. – P. R196–R198.
74. Drepper, T. The Hfq-like protein NrfA of the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* controls nitrogen fixation via regulation of *nifA* and *anfA* expression / T. Drepper, K. Raabe, D. Giaourakis et al. // *FEMS Microbiology Letters*. – 2002. – V. 215. – № 2. – P. 221–227.
75. Dziewit, L. Diversity and role of plasmids in adaptation of bacteria inhabiting the Lubin copper mine in Poland, an environment rich in heavy metals / L. Dziewit, A. Pyzik, M. Szuplewska et al. // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – V. 6. – P. 152.
76. Elmerich, C. Historical perspective: from bacterization to endophytes / C. Elmerich // *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*. – 2007. – P. 1–20.
77. Elzer, P.H. *In vivo* and *in vitro* stability of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS in six *Brucella* species / P.H. Elzer, M.E. Kovach, R.W. Phillips et al. // *Plasmid*. – 1995. – V. 33. – P. 51–57.
78. Epstein, B. Population genomics of the facultatively mutualistic bacteria *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* / B. Epstein, A. Branca, J. Mudge et al. // *PLoS Genetics*. – 2012. – V. 8. – № 8. – P. e1002868.
79. Erisman, J.W. How a century of ammonia synthesis changed the world / J.W. Erisman, M.A. Sutton, J. Galloway et al. // *Nature Geoscience*. – 2008. – V. 1. – № 10. – P. 636–639.
80. Figueiredo, M.D.V.B. Biological nitrogen fixation: importance, associated diversity, and estimates / M.D.V.B. Figueiredo, A.C.D.E. Santo Mergulhão, J.K. Sobral et al. // *In Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances* – Springer, New Delhi. – 2013. – P. 267–289.
81. Fischer, H.M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia / H.M. Fischer // *Microbiological Reviews*. – 1994. – V. 58. – № 3. – P. 352–386.

82. Fischer, H.M. One member of a *gro-ESL*-like chaperonin multigene family in *Bradyrhizobium japonicum* is co-regulated with symbiotic nitrogen fixation genes / H.M. Fischer, M. Babst, T. Kaspar et al. // The EMBO Journal. – 1993. – V. 12. – № 7. – P. 2901–2912.
83. Flores-Tinoco, C.E. Co-catabolism of arginine and succinate drives symbiotic nitrogen fixation / C.E. Flores-Tinoco, F. Tschan, T. Fuhrer et al. // Molecular Systems Biology. – 2020. – V. 16. – № 6. – P. e9419.
84. Forchhammer, K. Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets / K. Forchhammer // FEMS Microbiology Reviews. – 2004. – V. 28. – № 3. – P. 319–333.
85. Forchhammer, K. Sensory properties of the PII signalling protein family / K. Forchhammer, J. Lüddecke // The FEBS Journal. – 2016. – V. 283. – № 3. – P. 425–437.
86. Franche, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants / C. Franche, K. Lindström, C. Elmerich // Plant and Soil. – 2009. – V. 321. – № 1. – P. 35–59.
87. Frost, L.S. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution / L.S. Frost, R. Leplae, A.O. Summers, A. Toussaint // Nature Reviews Microbiology. – 2005. – V. 3. – № 9. – P. 722–732.
88. Fürnkranz, M. Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica / M. Fürnkranz, W. Wanek, A. Richter et al. // The ISME Journal. – 2008. – V. 2. – № 5. – P. 561–570.
89. Galardini, M. Exploring the symbiotic pangenome of the nitrogen-fixing bacterium *Sinorhizobium meliloti* / M. Galardini, A. Mengoni, M. Brillì et al. // BMC Genomics. – 2011. – V. 12. – № 1. – P. 1–15.
90. Galloway, J.N. A chronology of human understanding of the nitrogen cycle / J.N. Galloway, A.M. Leach, A. Bleeker, J.W. Erisman // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2013. – V. 368. – № 1621. – P. 20130120.

91. Gao, M. Regulation of *fixLJ* by Hfq controls symbiotically important genes in *Sinorhizobium meliloti* / M. Gao, H. Nguyen, I. Salas González, M. Teplitski // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2016. – V. 29. – № 11. – P. 844–853.
92. Gavini, N. Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase-independent functional NifH mutant of *Azotobacter vinelandii* / N. Gavini, S. Tungtur, L. Pulakat // *Journal of Bacteriology*. – 2006. – V.188. – № 16. – P. 6020–6025.
93. Gershoni, J.M. Protein blotting: a manual / J.M. Gershoni // *Methods of Biochemical Analysis*. – 1988. – P. 1–58.
94. 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.
95. Girard, L. Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL—fixK* cascade / L. Girard, S. Brom, A. Dávalos et al. // *Molecular Plant-microbe Interactions*. – 2000. – V. 13. – № 12. – P. 1283–1292.
96. Gong, Z.Y. *Sinorhizobium meliloti nifA* mutant induces different gene expression profile from wild type in Alfalfa nodules / Z.Y. Gong, Z.S. He, J.B. Zhu et al. // *Cell Research*. – 2006. – V. 16. – № 10. – P. 818–829.
97. González, V. Phylogenomic *Rhizobium* Species Are Structured by a Continuum of Diversity and Genomic Clusters / V. González, R.I. Santamaría, P. Bustos et al. // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 10. – P. 910.
98. Graham, D.E. The Isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses / D.E. Graham // *Analytical Biochemistry*. – 1978. – V. 85. – № 2. – P. 609–613.
99. Griffith, F. The Significance of Pneumococcal types / F. Griffith // *Epidemiology Infection*. – 1928. – V. 27. – № 2. – P. 113–159.
100. Gupta, V.V.S.R. Potential for non-symbiotic N₂-fixation in different agroecological zones of southern Australia. / V.V.S.R. Gupta, M. Roper, D. Roget // *Australian Journal Soil Research*. – 2006. – V. 44. – № 4. – P. 343–354.
101. Halbleib, C.M. Regulation of biological nitrogen fixation / C.M. Halbleib, P.W. Ludden // *The Journal of Nutrition*. – 2000. – V. 130. – № 5. – P. 1081–1084.

102. Han, G.F. Dissociating stable nitrogen molecules under mild conditions by cyclic strain engineering / G.F. Han, X.M. Shi, S.J. Kim et al. // *Science Advances*. – 2019. – V. 5. – № 11. – P. eaax8275.
103. Han, Y. Interspecies transfer and regulation of *Pseudomonas stutzeri* A1501 nitrogen fixation island in *Escherichia coli* / Y. Han, N. Lu, Q. Chen et al. // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – V. 25. – № 8. – P. 1339–1348.
104. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids / D. Hanahan // *Journal of Molecular Biology*. – 1983. – V. 166. – № 4. – P. 557–580.
105. Harris, D.F. Kinetic understanding of N₂ reduction versus H₂ evolution at the E4 (4H) Janus state in the three nitrogenases / D.F. Harris, Z.Y. Yang, D.R. Dean et al. // *Biochemistry*. – 2018. – V. 57. – № 39. – P. 5706–5714.
106. Hartmann, L.S. Inferring the evolutionary history of Mo-dependent nitrogen fixation from phylogenetic studies of *nifK* and *nifDK* / L.S. Hartmann, S.R. Barnum // *Journal of Molecular Evolution*. – 2010. – V. 71. – № 1. – P. 70–85.
107. Hashimoto, H. Carotenoids and photosynthesis / H. Hashimoto, C. Uragami, R.J. Cogdell // *Carotenoids in nature*. – 2016. – P. 111–139.
108. Haskett, T. Complete genome sequence of *Mesorhizobium ciceri* strain CC1192, an efficient nitrogen-fixing microsymbiont of *Cicer arietinum* / T. Haskett, P. Wang, J. Ramsay et al. // *Genome Announcements*. – 2016. – V. 4. – № 3. – P. e00516-16.
109. Heller, P. ARBitrator: a software pipeline for on-demand retrieval of auto-curated *nifH* sequences from GenBank / P. Heller, H.J. Tripp, K. Turk-Kubo, J.P. Zehr // *Bioinformatics*. – 2014. – V. 30. – № 20. – P. 2883–2890.
110. Herridge, D.F. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems / D.F. Herridge, M.B. Peoples, R.M. Boddey // *Plant Soil*. – 2008. – V. 311. – № 1. – P. 1–18.
111. Heuer, H. Horizontal gene transfer between bacteria / H. Heuer, K. Smalla // *Environmental Biosafety Research*. – 2007. – V. 6. – № 1–2. – P. 3–13.

112. Heuer, H. Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil / H. Heuer, K. Smalla // FEMS Microbiology Reviews. – 2012. – V. 36. – №. 6. – P. 1083–1104.
113. Hill, S. Physiology of nitrogen fixation in free-living heterotrophs / S. Hill, G. Stacey, R.H. Burris, H.J. Evans H.J. (eds) // In Biological Nitrogen Fixation. Chapman Hall. – 1992. – P. 87–134.
114. Ho, Y.S. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signalling motif and a new class of cyclic GMP receptor / Y.S. Ho, L.M. Burden, J.H. Hurley // The EMBO Journal. – 2000. – V. 19. – № 20 – P. 5288–5299.
115. Hoffman, B.M. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage / B.M. Hoffman, D. Lukoyanov, Z.Y. Yang et al. // Chemical Reviews. – 2014. – V. 114. – №. 8. – P. 4041–4062.
116. Hoffmann, M.C. Coordinated expression of *fdxD* and molybdenum nitrogenase genes promotes nitrogen fixation by *Rhodobacter capsulatus* in the presence of oxygen / M.C. Hoffmann, A. Müller, M. Fehring et al. // Journal of Bacteriology. – 2014. – V. 196. – № 3. – P. 633–640.
117. Hu, Y. Biosynthesis of nitrogenase FeMoco / Y. Hu, M.W. Ribbe // Coordination Chemistry Reviews. – 2011. – V. 255. – № 9–10. – P. 1218–1224.
118. Hu, Y. Vanadium nitrogenase: a two-hit wonder? / Y. Hu, C.C. Lee, M.W. Ribbe // Dalton Transactions. – 2012. – V. 41. – № 4. – P. 1118–1127.
119. Huergo, L.F. PII signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond / L.F. Huergo, G. Chandra, M. Merrick // FEMS Microbiology Reviews. – 2013. – V. 37. – № 2. – P. 251–283.
120. Huergo, L.F. PII signal transduction proteins: pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity / L.F. Huergo, F.O. Pedrosa, M. Muller-Santos et al. // Microbiology. – 2012. – V. 158. – № 1. – P. 176–190.
121. Huerta, J.M. The role of the ncRNA RgsA in the oxidative stress response and biofilm formation in *Azotobacter vinelandii* / J.M. Huerta, I. Aguilar, L. López-Pliego et al. // Current Microbiology – 2016 – V. 72. – № 6. – P. 671–679.

122. Igarashi, R.Y. Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase / R.Y. Igarashi, L.C. Seefeldt // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2003. – V. 38. – № 4. – P. 351–384.
123. Inomura, K. Quantitative models of nitrogen-fixing organisms / K. Inomura, C. Deutsch, T. Masuda et al. // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2020. – V. 18. – P. 3905–3924.
124. Jieping, Z. Extra-copy *nifA* enhances the nodulation efficiency of *Sinorhizobium fredii* / Z. Jieping, D. Xiaomi, X. Ling et al. // *Chinese Science Bulletin*. – 2002. – V. 47. – № 7. – P. 565–567.
125. Joerger, R.D. Bacterial alternative nitrogen fixation systems / R.D. Joerger, P.E. Bishop, H.J. Evans // *Critical Reviews in Microbiology*. – 1988. – V. 16. – № 1. – P. 1–14.
126. Kaminski, P.A. The expression of *nifA* in *Azorhizobium caulinodans* requires a gene product homologous to *Escherichia coli* HF-I, an RNA-binding protein involved in the replication of phage Q beta RNA / P.A. Kaminski, N. Desnoues, C. Elmerich // *PNAS*. – 1994. – V. 91. – № 11. – P. 4663–4667.
127. Kaneko, T. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti* / T. Kaneko, Y. Nakamura, S. Sato et al. // *DNA Research*. – 2000. – V. 7. – № 6. – P. 331–338.
128. Kennedy, C. Activation of *nif* gene expression in *Azotobacter* by the *nifA* gene product of *Klebsiella pneumoniae* / C. Kennedy, R.L. Robson // *Nature*. – 1983. – V. 301. – № 5901. – P. 626–628.
129. Khlebnikov, A. Homogeneous expression of the *PBAD* promoter in *Escherichia coli* by constitutive expression of the low-affinity high-capacity AraE transporter / A. Khlebnikov, K.A. Datsenko, T. Skaug et al. // *Microbiology*. – 2001. – V. 147. – № 12. – P. 3241–3247.
130. Khlebnikov, A. Modulation of gene expression from the arabinose-inducible *araBAD* promoter / A. Khlebnikov, T. Skaug, J.D. Keasling // *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. – 2002. – V. 29. – № 1. – P. 34–37.

131. Khumanthem, N. Isolation and characterization of a *Mastigocladus* species capable of growth, N₂-fixation and N-assimilation at elevated temperature / N. Khumanthem, M.B. Syiem, A.K. Singh, A.N. Rai // Indian Journal of Microbiology. – 2007. – V. 47. – № 4. – P. 345–352.
132. Kneip, C. Nitrogen fixation in eukaryotes–new models for symbiosis / C. Kneip, P. Lockhart, C. Voß, U.G. Maier // BMC Evolutionary Biology. – 2007. – V. 7. – № 1. – P. 1–12.
133. Koonin, E.V. Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification / E.V. Koonin, K.S. Makarova, L. Aravind // Annual Reviews in Microbiology. – 2001. – V. 55. – №. 1. – P. 709–742.
134. Kullik, I. *Bradyrhizobium japonicum* has two differentially regulated, functional homologs of the sigma 54 gene (*rpoN*) / I. Kullik, S. Fritsche, H. Knobel et al. // Journal of Bacteriology. – 1991. – V. 173. – № 3. – P. 1125–1138.
135. Kumar, K. Cyanobacterial Heterocysts / K. Kumar, R.A. Mella-Herrera, J.W. Golden // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2010. – V. 2. – № 4. – P. a000315.
136. Lagares, A. The Plasmid mobilome of the model plant-symbiont *Sinorhizobium meliloti*: coming up with new questions and answers / A. Lagares, J. Sanjuán, M. Pistorio // Microbiology Spectrum. – 2014. – V. 2. – № 5. – P. 2–5.
137. Lefebvre, M.D. Construction and evaluation of plasmid vectors optimized for constitutive and regulated gene expression in *Burkholderia cepacia* complex isolates / M.D. Lefebvre, M.A. Valvano // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – V. 68. – P. 5956–5964.
138. Leplae, R. A first global analysis of plasmid encoded proteins in the ACLAME database / R. Leplae, G. Lima-Mendez, A. Toussaint // FEMS Microbiology Reviews. – 2006. – V. 30. – № 6. – P. 980–994.
139. Li, J. Regulation of *nif* gene expression in an associative diazotroph – *Enterobacter gergoviae* 57-7 / J. Li, Y. Li, H. Jin, J. Wang // Acta Microbiologica. – 1994. – V. 34. – P. 333–338.

140. Li, Q. Transfer of nitrogen fixation (*nif*) genes to non-diazotrophic hosts / Q. Li, S. Chen // *ChemBioChem*. – 2020. – V. 21. – № 12. – P. 1717–1722.
141. Li, X.X. Using synthetic biology to increase nitrogenase activity / X.X. Li, Q. Liu, X.M. Liu et al. // *Microbial Cell Factories*. – 2016. – V. 15. – № 1. – P. 1–11.
142. Lichtenthaler, H.K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes / H.K. Lichtenthaler // *Methods in Enzymology*. – 1987. – V. 148. – P. 331–382.
143. Lin, J.J. Electrotransformation of *Agrobacterium* / J.J. Lin // *Electroporation Protocols for Microorganisms. Methods in Molecular Biology*. – 1995. – V. 47. – P. 171–178.
144. López-Guerrero, M.G. Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches / M.G. López-Guerrero, E. Ormeño-Orrillo, J.L. Acosta et al. // *Plasmid*. – 2012. – V. 68. – № 3. – P. 149–158.
145. Lucas, R.W. A meta-analysis of the effects of nitrogen additions on base cations: implications for plants, soils, and streams / R.W. Lucas, J. Klaminder, M.N. Futter et al. // *Forest Ecology and Management*. – 2011. – V. 262. – № 2. – P. 95–104.
146. Ma, L. Green fluorescent protein labeling of *Listeria*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157: H7 for safety-related studies / L. Ma, G. Zhang, M.P. Doyle // *PLoS one*. – 2011. – V. 6. – № 4. – P. e18083.
147. MacKellar, D. *Streptomyces thermoautotrophicus* does not fix nitrogen / D. MacKellar, L. Lieber, J.S. Norman et al. // *Scientific Reports*. – 2016. – V. 6. – № 1. – P. 1–12.
148. MacLean, A.M. Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes / A.M. MacLean, T.M. Finan, M.J. Sadowsky // *Plant Physiology*. – 2007. – V. 144. – № 2. – P. 615–622.
149. Maróti, G. Nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? / G. Maróti, É. Kondorosi // *Frontiers in Microbiology*. – 2014. – V. 5. – № . – P. 1–6.

150. Martínez, M. Novel arrangement of enhancer sequences for NifA-dependent activation of the hydrogenase gene promoter in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* / M. Martínez, M.V. Colombo, J.M. Palacios et al. // Journal of Bacteriology. – 2008. – V.190. – № 9. – P. 3185–3191.
151. Martínez, M. Symbiotic autoregulation of *nifA* expression in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* / M. Martínez, J.M. Palacios, J. Imperial, T. Ruiz-Argüeso // Journal of Bacteriology. – 2004. – V. 186. – № 19. – P. 6586–6594.
152. Mazur, A. Rhizobial plasmids-replication, structure and biological role / A. Mazur, P. Koper // Open Life Sciences. – 2012. – V. 7. – № 4. – P. 571–586.
153. Mehta, M.P. Nitrogen fixation at 92 degrees C by a hydrothermal vent archaeon / M.P. Mehta, J.A. Baross // Science. – 2006. – V. 314. – № 5806. – P. 1783–1786.
154. Merrick, M.J. Nitrogen control in bacteria / M.J. Merrick, R. Edwards // Microbiological Reviews. – 1995. – V. 59. – № 4. – P. 604–622.
155. Mesa, S. *Bradyrhizobium japonicum* NnrR, a denitrification regulator, expands the FixLJ-FixK2 regulatory cascade / S. Mesa, E.J. Bedmar, A. Chanfon et al. // Journal of Bacteriology. – 2003. – V. 185. – № 13. – P. 3978–3982.
156. Mesa, S. Comprehensive assessment of the regulons controlled by the FixLJ-FixK2-FixK1 cascade in *Bradyrhizobium japonicum* / S. Mesa, F. Hauser, M. Friberg et al. // Journal of Bacteriology. – 2008. – V. 190. – № 20. – P. 6568–6579.
157. Michiels, J. Differential regulation of *Rhizobium etli rpoN2* gene expression during symbiosis and free-living growth / J. Michiels, M. Moris, B. Dombrecht et al. // Journal of Bacteriology. – 1998. – V. 180. – № 14. – P. 3620–3628.
158. Million-Weaver, S. Mechanisms of plasmid segregation: have multicopy plasmids been overlooked? / S. Million-Weaver, M. Camps // Plasmid. – 2014. – V. 75. – P. 27–36.
159. 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 Microbiology Ecology. – 2008. – V. 65. – № 2. – P. 279–288.

160. Moure, V.R. The nitrogenase regulatory enzyme dinitrogenase reductase ADP-riboseyltransferase (DraT) is activated by direct interaction with the signal transduction protein GlnB / V.R. Moure, K. Danyal, Z.Y. Yang et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2013. – V. 195. – № 2. – P. 279–286.
161. Mus, F. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes // F. Mus, M.B. Crook, K. Garcia et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2016. – V. 82. – № 13. – P. 3698–3710.
162. Neelson, K.H. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system / K.H. Neelson, T. Platt, J.W. Hastings // *Journal of Bacteriology*. – 1970. – V. 104. – № 1. – P. 313–322.
163. Neuwald, A.F. AAA+: a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes / A.F. Neuwald, L. Aravind, J.L. Spouge, E.V. Koonin // *Genome Research*. – 1999. – V. 9. – № 1. – P. 27–43.
164. Newman, J.R. Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* *araBAD* promoter and the *araC* regulator / J.R. Newman, C. Fuqua // *Gene*. – 1999. – V. 227. – № 2. – P. 197–203.
165. Ninfa, A.J. PII signal transduction proteins: sensors of α -ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism / A.J. Ninfa, P. Jiang // *Current Opinion in Microbiology*. – 2005. – V. 8. – № 2. – P. 168–173.
166. Nogales, J. Conjugal transfer of the *Sinorhizobium meliloti* 1021 symbiotic plasmid is governed through the concerted action of one- and two-component signal transduction regulators / J. Nogales, H. Blanca-Ordóñez, J. Olivares, J. Sanjuán // *Environmental Microbiology*. – 2013. – V. 15. – № . – P. 811–821.
167. Nukui, N. Expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase gene requires symbiotic nitrogen-fixing regulator gene *nifA2* in *Mesorhizobium loti* MAFF303099 / N. Nukui, K. Minamisawa, S.I. Ayabe, T. Aoki // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – V. 72. – № 7. – P. 4964–4969.
168. Oda, Y. Functional genomic analysis of three nitrogenase isozymes in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* / Y. Oda, S.K. Samanta,

- F.E. Rey et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2005. – V. 187. – № 22. – P. 7784–7794.
169. Oelze, J. Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence? / J. Oelze // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2000. – V. 24. – № 4. – P. 321–333.
170. Oldroyd, G.E. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis / G.E. Oldroyd, J.D. Murray, P.S. Poole, J.A. Downie // *Annual Review of Genetics*. – 2011. – V. 45. – P. 119–144.
171. Ormeno-Orrillo, E. Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the *Rhizobiaceae* family in light of genomics / E. Ormeno-Orrillo, L.E. Servín-Garcidueñas, M.A. Rogel et al. // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2015. – V. 38. – № 4. – P. 287–291.
172. Paget, M.S. The σ 70 family of sigma factors / M.S. Paget, J.D. Helmann // *Genome Biology*. – 2003. – V. 4. – № 1. – P. 1–6.
173. Patschkowski, T. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* contains a second *fnr/fixK*-like gene and an unusual *fixL* homologue / T. Patschkowski, A. Schlüter, U.B. Priefer // *Molecular Microbiology*. – 1996. – V. 21. – № 2. – P. 267–280.
174. Peloquin, J.J. Transformation of internal extracellular bacteria isolated from *Rhagoletis completa* Cresson gut with enhanced green fluorescent protein / J.J. Peloquin, L. Kuzina, C.R. Lauzon, T.A. Miller // *Current Microbiology*. – 2000. – V. 40. – № 6. – P. 367–371.
175. Peoples, M.B. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? / M.B. Peoples, D.F. Herridge, J.K. Ladha // *Plant and Soil*. – 1995. – V. 174. – P. 3–28.
176. Pérez-Mendoza, D. Identification of the *rctA* gene, which is required for repression of conjugative transfer of rhizobial symbiotic megaplasmids / D. Pérez-Mendoza, E. Sepúlveda, V. Pando et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2005. – № 21. – V. 187. – P. 7341–7350.
177. Pohlman, A.A. Nitrogen fixation in the rhizosphere and rhizoplane of barley / A.A. Pohlman, J.G. McColl // *Plant and Soil*. – 1982. – V. 69. – № 3. – P. 341–352.

178. Polz, M.F. Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure / M.F. Polz, E.J. Alm, W.P. Hanage // Trends in Genetics. – 2013. – V. 29. – № 3. – P. 170–175.
179. Porra, R.A. Recent advances and re-assessment in chlorophyll extraction and assay procedures for terrestrial, aquatic, and marine organisms, including recalcitrant algae / R.A. Porra // Chlorophylls. – 1991. – P. 31–57.
180. Porse, A. Survival and evolution of a large multidrug resistance plasmid in new clinical bacterial hosts / A. Porse, K. Schønning, C. Munck, M.O. Sommer // Molecular Biology and Evolution. – 2016. – V. 33. – № 11. – P. 2860–2873.
181. Provorov, N.A. Evolutionary genetics of nodule bacteria: molecular and population aspects / N.A. Provorov, N.I. Vorob'Ev // Russian Journal of Genetics. – 2000. – V. 36. – № 12. – P. 1323–1335.
182. Ray, P. Secondary structure and DNA binding by the C-terminal domain of the transcriptional activator NifA from *Klebsiella pneumoniae* / P. Ray, K.J. Smith, R.A. Parslow et al. // Nucleic Acids Research. – 2002. – V. 30. – № 18. – P. 3972–3980.
183. Reed, S.C. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective / S.C. Reed, C.C. Cleveland, A.R. Townsend // Annual Review of Ecology Evolution and Systematics. – 2011. – V. 42. – P. 489–512.
184. Rehder, D. Vanadium nitrogenase / D. Rehder // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2000. – V. 80. – № 1–2. – P. 133–136.
185. Reinhold-Hurek, B. Living inside plants: bacterial endophytes / B. Reinhold-Hurek, T. Hurek // Current Opinion in Plant Biology. – 2011. – V. 14. – № 4. – P. 435–443.
186. Rey, F.E. FixK, a global regulator of microaerobic growth, controls photosynthesis in *Rhodospseudomonas palustris* / F.E. Rey, C.S. Harwood // Molecular Microbiology. – 2010. – V. 75. – № 4. – P. 1007–1020.
187. Reyes-González, A. Expanding the regulatory network that controls nitrogen fixation in *Sinorhizobium meliloti*: elucidating the role of the two-component

- system hFixL-FxkR / A. Reyes-González, C. Talbi, S. Rodríguez et al. // *Microbiology*. – 2016. – V. 162. – № 6. – P. 979–988.
188. Ribbe, M. N₂ fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced from O₂ by a molybdenum-CO dehydrogenase / M. Ribbe, D. Gadkari, O. Meyer // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – V. 272. – № 42. – P. 26627–26633.
189. Roberts, C.P. Regulation and characterization of protein products coded by the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae* / C.P. Roberts, T. Macnell, D. Macnell, W.J. Brill // *Journal of Bacteriology*. – 1978. – V. 136. – № 1. – P. 267–279.
190. Rogel, M.A. Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adhaerens* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids / M.A. Rogel, I. Hernández-Lucas, L.D. Kuykendall et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – V. 67. – № 7. – P. 3264–3268.
191. Ronson, C.W. *Rhizobium meliloti ntrA (rpoN)* gene is required for diverse metabolic functions / C.W. Ronson, B.T. Nixon, L.M. Albright, F.M. Ausubel // *Journal of Bacteriology*. – 1987. – V. 169. – № 6. – P. 2424–2431.
192. Rosenblueth, M. Nitrogen Fixation in Cereals / M. Rosenblueth, E. Ormeño-Orrillo, A. López-López et al. // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 1794.
193. Rubio, L.M. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase / L.M. Rubio, P.W. Ludden // *Annual Review of Microbiology*. – 2008. – V. 62. – P. 93–111.
194. Rubio, L.M. The gene products of the *nif* regulon. Nitrogen fixation at the millennium / L.M. Rubio, P.W. Ludden // Elsevier, Amsterdam. – 2002. – P. 101–130.
195. Sabra, W. Effect of phosphate and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic

- conditions / W. Sabra, A.P. Zeng, S. Sabry et al. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1999. – V. 52. – № 6. – P. 773–780.
196. Sainz, M. Leghemoglobin is nitrated in functional legume nodules in a tyrosine residue within the heme cavity by a nitrite/peroxide-dependent mechanism / M. Sainz, L. Calvo-Begueria, C. Pérez-Rontomé et al. // *The Plant Journal*. – 2015. – V. 81. – № 5. – P. 723–735.
197. Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory manual* / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1989. – 479 p.
198. Sandh, G. Temporal separation of cell division and diazotrophy in the marine diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* IMS101 / G. Sandh, R. El-Shehawy, B. Díez, B. Bergman // *FEMS Microbiology Letters*. – 2009. – V. 295. – № 2. – P. 281–288.
199. Santi, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants / C. Santi, D. Bogusz, C. Franche // *Annals of Botany*. – 2013. – V. 111. – № 5. – P. 743–767.
200. Sciotti, M.A. Disparate oxygen responsiveness of two regulatory cascades that control expression of symbiotic genes in *Bradyrhizobium japonicum* / M.A. Sciotti, A. Chanfon, H. Hennecke, H.M. Fischer // *Journal of Bacteriology*. – 2003. – V. 185. – № 18. – P. 5639–5642.
201. Sealey, P.G. Gel electrophoresis of DNA / P.G. Sealey, E.M. Southern / In: *Gel electrophoresis of nucleic acids. A Practical Approach*. IRL Press. Oxford. – 1982. – P. 3976.
202. Seefeldt, L.C. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase / L.C. Seefeldt, B.M. Hoffman, D.R. Dean // *Annual Review of Microbiology*. – 2009. – V. 78. – P. 701–722.
203. Selzer, L.J. Pigments and photosynthesis of understory grasses: Light irradiance and soil moisture effects / L.J. Selzer, C.A. Busso // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2016. – V. 63. – № 2. – P. 224–234.
204. Setubal, J.C. Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes / J.C. Setubal, P. Dos

- Santos, B.S. Goldman et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2009. – V. 191. – № 14. – P. 4534–4545.
205. Singh, S. Structure, function, and estimation of leghemoglobin / S. Singh, A. Varma // *In Rhizobium Biology and Biotechnology* – Springer, Cham. – 2017. – P. 309–330.
206. Sippel, D. Production and isolation of vanadium nitrogenase from *Azotobacter vinelandii* by molybdenum depletion / D. Sippel, J. Schlesier, M. Rohde et al. // *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. – 2017. – V. 22. – № 1. – P. 161–168.
207. Smanski, M.J. Functional optimization of gene clusters by combinatorial design and assembly / M.J. Smanski, S. Bhatia, D. Zhao et al. // *Nature Biotechnology*. – 2014. – V. 32. – № 12. – P. 1241–1249.
208. Smith, V.H. Eutrophication: Impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems / V.H. Smith, G.D. Tilman, J.C. Nekola // *Environmental Pollution*. – 1999. – V. 100. – № 1–3. – P. 179–196.
209. Somasegaran, P. Quantifying the growth of rhizobia. / P. Somasegaran, H.J. Hoben // *Handbook for rhizobia*. Springer. – 1994. – P. 47–57.
210. Soto-Urzúa, L. Mecanismos de protección de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno / L. Soto-Urzúa, B.E. Baca // *Revista Latinoamericana de Microbiología*. – 2001. – V. 43. – №1. – P. 37–49.
211. Sousa, F.L. AlloRep: a repository of sequence, structural and mutagenesis data for the LacI/GalR transcription regulators / F.L. Sousa, D.J. Parente, D.I. Shis et al. // *Journal of Molecular Biology*. – 2016. – V. 428. – № 4. – P. 671–678.
212. Stam, H. Hydrogen oxidation and efficiency of nitrogen fixation in succinate-limited chemostat cultures of *Rhizobium* ORS 571 / H. Stam, H.W. van Verseveld, W. de Vries, A.H. Stouthamer // *Archives of Microbiology*. – 1984. – V. 139. – № 1. – P. 53–60.
213. Steenhoudt, O. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects / O. Steenhoudt, J. Vanderleyden // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2000. – V. 24. – № 4. – P. 487–506.

214. Stott, D.I. Immunoblotting and dot blotting / D.I. Stott // *Journal of Immunological Methods*. – 1989. – V. 119. – №. 2. – P. 153–187.
215. Sullivan, J.T. Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A / J.T. Sullivan, J.R. Trzebiatowski, R.W. Cruickshank et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – V. 184. – № 11. – P. 3086–3095.
216. Sullivan, J.T. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene / J.T. Sullivan, C.W. Ronson // *PNAS*. – 1998. – V. 95. – №. 9. – P. 5145–5149.
217. Sullivan, J.T. The NifA-RpoN regulon of *Mesorhizobium loti* strain R7A and its symbiotic activation by a novel LacI/GalR-family regulator / J.T. Sullivan, S.D. Brown, C.W. Ronson // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – № 1. – P. e53762.
218. Sutherland, C. An introduction to the structure and function of the catalytic core enzyme of *Escherichia coli* RNA polymerase / C. Sutherland, K.S. Murakami // *EcoSal Plus*. – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 1–14.
219. Tanaka, A. Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a / A. Tanaka, H. Ito, R. Tanaka et al. // *PNAS*. – 1998. – V. 95. – № 21. – P. 12719–12723.
220. Temme, K. Refactoring the nitrogen fixation gene cluster from *Klebsiella oxytoca* / K. Temme, D. Zhao, C.A. Voigt // *PNAS*. – 2012. – V. 109. – №. 18. – P. 7085–7090.
221. Thomas, C.M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria / C.M. Thomas, K.M. Nielsen // *Nature Reviews Microbiology*. – 2005. – V. 3. – №. 9. – P. 711–721.
222. Tian, C.F. Comparative genomics of rhizobia nodulating soybean suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations / C.F. Tian, Y.J. Zhou, Y.M. Zhang et al. // *PNAS*. – 2012. – V. 109. – № 22. – P. 8629–8634.
223. Tian, G. Colonization of the nitrogen-fixing bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* in a large number of Canadian corn plants / G. Tian, P. Pauls, Z.

- Dong // Canadian Journal of Plant Science. – 2009. – V. 89. – № 6. – P. 1009–1016.
224. Toepel, J. Differential transcriptional analysis of the cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142 during light-dark and continuous-light growth / J. Toepel, E. Welsh, T.C. Summerfield et al. // Journal of Bacteriology. – 2008. – V. 190. – № 11. – P. 3904–3913.
225. Torres Tejerizo, G. Rhizobial plasmid pLPU83a is able to switch between different transfer machineries depending on its genomic background / G. Torres Tejerizo, M. Pistorio, M.J. Althabegoiti et al. // FEMS Microbiology Ecology. – 2014. – V. 88. – № 3. – P. 565–578.
226. Torres, M. J. Emerging complexity in the denitrification regulatory network of *Bradyrhizobium japonicum* / M.J. Torres, E. Bueno, S. Mesa et al. // Biochemical Society Transactions. – 2011. – V. 39. – № 1. – P. 284–288.
227. Torres-Quesada, O. Genome-wide profiling of Hfq-binding RNAs uncovers extensive post-transcriptional rewiring of major stress response and symbiotic regulons in *Sinorhizobium meliloti* / O. Torres-Quesada, J. Reinkensmeier, J.P. Schlüter et al. // RNA Biology. – 2014. – V. 11. – № 5. – P. 563–579.
228. Towbin, H. Biochemistry Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications / H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon // PNAS. – 1979. – V. 76. – № 9. – P. 4350–4354.
229. Townsend, A.R. Human health effects of a changing global nitrogen cycle / A.R. Townsend, R.W. Howarth, F.A. Bazzaz et al. // Frontiers in Ecology and the Environment. – 2003. – V. 1. – № 5. – P. 240–246.
230. Tsoy, O.V. Nitrogen fixation and molecular oxygen: comparative genomic reconstruction of transcription regulation in *Alphaproteobacteria* / O.V. Tsoy, D.A. Ravcheev, J. Čuklina, M.S. Gelfand // Frontiers in Microbiology. – 2016. – V. 7. – P. 1343.
231. Tsujimoto, R. Functional expression of an oxygen-labile nitrogenase in an oxygenic photosynthetic organism / R. Tsujimoto, H. Kotani, K. Yokomizo et al. // Scientific Reports. – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 1–10.

232. Uozumi, T. Cloning and Expression of the *nifA* Gene of *Klebsiella oxytoca* in *K. pneumoniae* and *Azospirillum lipoferum* / T. Uozumi, P.L. Wang, N. Tonouchi et al. // Agricultural and Biological Chemistry. – 1986. – V. 50. – № 6. – P. 1539–1544.
233. Urquiaga, S. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties / S. Urquiaga, R.P. Xavier, R.F. de Moraes et al. // Plant Soil. – 2012. – V. 356. – № 1. – P. 5–21.
234. Van Kessel, C. Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation? / C. Van Kessel, C. Hartley // Field Crops Research. – 2000. – V. 65. – № 2-3. – P. 165–181.
235. Vercruyse, M. Genome-wide detection of predicted non-coding RNAs in *Rhizobium etli* expressed during free-living and host-associated growth using a high-resolution tiling array / M. Vercruyse, M. Fauvart, L. Cloots et al. // BMC Genomics. – 2010. – V. 11. – № 1. – P. 1–12.
236. Vincent, J.M. A manual for the practical study of root nodule bacteria / J.M. Vincent // Oxford: Blackwell Scientific. – 1970. – P. 164.
237. Walker, S.A. Entry of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* into root hairs requires minimal Nod factor specificity, but subsequent infection thread growth requires *nodO* or *nodE* / S.A. Walker, J.A. Downie // Molecular Plant-Microbe Interaction. – 2000. – V. 13. – № 7. – P. 54–62.
238. Wang, D. Symbiosis specificity in the legume–rhizobial mutualism / D. Wang, S. Yang, F. Tang, H. Zhu // Cellular Microbiology. – 2012. – V. 14. – № 3. – P. 334–342.
239. Wang, L. A minimal nitrogen fixation gene cluster from *Paenibacillus* sp. WLY78 enables expression of active nitrogenase in *Escherichia coli* / L. Wang, L. Zhang, Z. Liu et al. // PLoS Genetics. – 2013. – V. 9. – №. 10. – P. e1003865.
240. Wang, S. Evolutionary Timeline and Genomic Plasticity Underlying the Lifestyle Diversity in *Rhizobiales* / S. Wang, A. Meade, H.M. Lam, H. Luo // MSystems. – 2020. – V. 5. – № 4. – P. e00438-20.

241. Wathugala, N.D. Defining the requirements for the conjugative transfer of *Rhizobium leguminosarum* plasmid pRleVF39b / N.D. Wathugala, K.M. Hemananda, C.B. Yip, M.F. Hynes // *Microbiology*. – 2020. – V. 166. – № 3. – P. 318–331.
242. Weaver, R.W. Stability of plasmids in *Rhizobium phaseoli* during culture / R.W. Weaver, G.R. Wei, D.L. Berryhill // *Soil Biology and Biochemistry*. – 1990. – V. 22. – № 4. – P. 465–469.
243. Werner, F. Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life / F. Werner, D. Grohmann // *Nature Reviews Microbiology*. – 2011. – V. 9. – № 2. – P. 85–98.
244. Williams P.A. Catabolic plasmids: fast-track bacterial evolution to combat pollution / P.A. Williams // *Microbiology Today*. – 2004. – V. 31. – P. 168–170.
245. Wongdee, J. Regulation of nitrogen fixation in *Bradyrhizobium* sp. strain DOA9 involves two distinct NifA regulatory proteins that are functionally redundant during symbiosis but not during free-living growth / J. Wongdee, N. Boonkerd, N. Teaumroong et al. // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 1644.
246. Yan, Y. Global transcriptional analysis of nitrogen fixation and ammonium repression in root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501 / Y. Yan, S. Ping, J. Peng et al. // *BMC Genomics*. – 2010. – V. 11. – № 1. – P. 1–13.
247. 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 et al. // *Genome Biology*. – 2006. – V. 7. – № 4. – P. 1–20.
248. Zamorano-Sanchez, D. FxkR provides the missing link in the *fixL-fixK* signal transduction cascade in *Rhizobium etli* CFN42 / D. Zamorano-Sanchez, A. Reyes-González, N. Gomez-Hernandez et al. // *Molecular Plant Microbe Interactions*. – 2012. – V. 25. – № 11. – P. 1506–1517.
249. Zhan, J. Diversity of free-living nitrogen-fixing microorganisms in wastelands of copper mine tailings during the process of natural ecological restoration / J. Zhan, Q. Sun // *Journal of Environmental Sciences*. – 2011. – V. 23. – № 3. – P. 476–487.

250. Zhan, Y. The novel regulatory ncRNA, NfiS, optimizes nitrogen fixation via base pairing with the nitrogenase gene *nifK* mRNA in *Pseudomonas stutzeri* A1501 / Y. Zhan, Y. Yan, Z. Deng et al. // PNAS. – 2016. – V. 113. – № 30. – P. E4348–E4356.
251. Zhang, Y. GlnD is essential for NifA activation, NtrB/NtrC-regulated gene expression, and posttranslational regulation of nitrogenase activity in the photosynthetic, nitrogen-fixing bacterium *Rhodospirillum rubrum* / Y. Zhang, E.L. Pohlmann, G. P. Roberts // Journal of Bacteriology. – 2005. – V. 187. – № 4. – P. 1254–1265.
252. Zhang, Y. Mutagenesis and functional characterization of the four domains of GlnD, a bifunctional nitrogen sensor protein / Y. Zhang, E.L. Pohlmann, J. Serate et al. // Journal of Bacteriology. – 2010. – V. 192. – № 11. – P. 2711–2721.
253. Zhang, Y. Post-transcriptional regulation of NifA expression by Hfq and RNase E complex in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* / Y. Zhang, G. Hong // Acta Biochimica et Biophysica Sinica. – 2009. – V. 41. – № 9. – P. 719–730.
254. Zhao, Y. Diversity of nitrogenase systems in diazotrophs / Y. Zhao, S.M. Bian, H.N. Zhou, J.F. Huang // Journal of Integrative Plant Biology. – 2006. – V. 48. – № 7. – P. 745–755.
255. Zhu, J.B. Effect of *nifA* product on suppression of Nif-phenotype of *gln* mutation and constitutive synthesis of nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae* / J.B. Zhu, G.Q. Yu, Q.Y. Jiang et al. // Scientia Sinica. Series B, Chemical, Biological, Agricultural, Medical & Earth sciences. – 1983. – V. 26. – № 12. – P.1258–1268.
256. Zuberer, D.A. Nitrogen fixation in soils-free-living microbes / D.A. Zuberer // Encyclopedia of Environmental Microbiology. – G. Bitton, Canada, 2002. – P. 2188–2201.