

ВЛАДИМИРОВА АНАСТАСИЯ АНДРЕЕВНА

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

1.5.7. Генетика (биологические науки)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа – 2022

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

Научный руководитель:

Баймиев Андрей Ханифович доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Топунов Алексей Федорович Заведующий лабораторией биохимии азотфиксации и метаболизма азота Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт биохимии имени А.Н. Баха.
Доктор биологических наук

Гоголев Юрий Викторович Заведующий лабораторией молекулярной биологии Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук».
Доктор биологических наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии».

Защита диссертации состоится «21» сентября 2022 г. в «___» часов на заседании Диссертационного совета 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по адресу: 450054, Уфа, проспект Октября 71, конференц-зал ИБГ УФИЦ РАН (ком. № 406).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке УФИЦ РАН (450054, Уфа, проспект Октября, 71), на сайте УФИЦ РАН http://ufaras.ru/?page_id=9758, e-mail: molgen@anrb.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.218.01
доктор биологических наук, доцент



Гульназ Фаритовна Корытина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы и степень ее разработанности. Существование всех живых организмов всецело зависит от усвоения элементов необходимых для построения биомолекул и их функционирования. Одним из важнейших соединений является азот (N_2), тем не менее, в атмосферном воздухе он находится в инертной форме. Бактерии, способные переводить такую форму в усвояемую, относятся к группе азотфиксаторов. Наиболее эффективными азотфиксирующими микроорганизмами являются клубеньковые бактерии (ризобии) в симбиозе только с бобовыми растениями (за некоторым исключением).

У всех азотфиксирующих бактерий процесс преобразования молекулярного азота находится под контролем комплекса *nif*-генов (от англ. nitrogen fixation), который кодирует фермент – нитрогеназу (Rubio, 2002). В геноме клубеньковых бактерий данные гены собраны в несколько оперонов. Причем гены, кодирующие белки коровой части нитрогеназы, локализованы в одном опероне и преимущественно наследуются вместе, в то время как гены вспомогательных белков имеют наименьшую сцепленность генов. Тем не менее, такая организация *nif*-генов делает возможным осуществление обмена ими в ходе горизонтального переноса генов (ГПГ) между бактериями (Sullivan and Ronson, 1998; Koonin et al., 2001; Bailly et al., 2007; Epstein et al., 2012). Так 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.

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). Так же другими исследователями было показано, 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 гена *nifA* было продемонстрировано как на свободноживущем (*Enterobacter gergoviae*), так и на симбиотическом (*Ensifer fredii*) штаммах микроорганизмов (Jieping et al., 2002; An et al., 2007). Ранее в наших работах мы исследовали влияние 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 приводит к изменению уровня азотфиксации *ex planta* (Иванова и др., 2014; Баймиев и др., 2019).

Не смотря 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, оказывающие положительное влияние как на бобовые, так и на другие сельскохозяйственные культуры.

Цель работы – анализ специфичности продукта гена *nifA* – активатора генов нитрогеназного комплекса – внутри группы клубеньковых бактерий.

Задачи исследования:

1. Провести анализ полиморфизма генов *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий.
2. Создать экспрессирующие конструкции с геном *nifA*, принадлежащим 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 работы. 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.

Практическая значимость работы. 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, кодирующих нитрогеназный комплекс, 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.

Основные 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.

Личный вклад соискателя. Личный вклад соискателя заключается в выполнении основного объема теоретических и экспериментальных работ, обработке и анализе полученных данных, подготовке материалов для публикаций.

Степень достоверности. Достоверность полученных данных подтверждается воспроизводимостью и многочисленностью проведенных экспериментов, а также наличием положительных и отрицательных контролей.

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.

Апробация работы. 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» (Пущино, 2016), 21-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 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).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, из которых 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК РФ, в том числе 2

статьи, индексируемые в международных базах Web of Science и Scopus, 2 – в журнале, индексируемом в Scopus. Результаты работы были представлены на 10 конференциях в виде тезисов, стендовых и устных докладов.

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 родам *Rhizobium*, *Ensifer* и *Mesorhizobium*.

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

Место проведения работы и благодарности. Работа выполнена в лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН (г. Уфа). Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н., в.н.с., доц. Баймиеву Ан.Х. за неоценимую помощь в выполнении данной работы. Автор благодарит заведующего лабораторией биоинженерии растений и микроорганизмов Баймиева Ал.Х., а также весь коллектив лаборатории, коллег за помощь и поддержку.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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 трибам *Fabeae*, *Trifolieae* и *Loteae*: горошка лесного (*Vicia sylvatica* L) – VSyl1, VSyl3, VSyl17, VSyl8, чины гороховидной (*Lathyrus pisiformis* L) – LPis4, люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina* L) – MLu2, MLu10 и лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L) – LZh1, LZh3. Штамм *Pseudomonas* sp. K749 из коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН был использован в качестве контроля. В экспериментах по клонированию применялись штаммы ризобий и *E.coli* – NEB10, плаزمиды 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, принадлежащих к трем основным родам ризобий: *Rhizobium*, *Ensifer* и *Mesorhizobium*.

Методы исследования. В работе использовались современные молекулярно-генетические методы. Выделение бактериальной ДНК с помощью ионнообменной смолы Chelex. Постановку ПЦР классической и в реальном времени проводили с использованием стандартных наборов для амплификации ДНК. Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК осуществляли на автоматических

секвенаторах ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, США). Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета компьютерных программ Lasergene (DNASTAR, США). Выделение плазмидной ДНК, клонирование, подготовку компетентных клеток (для электропорации и химической трансформации), бактериальную трансформацию, электрофорез ДНК выполняли по прописям, изложенным в лабораторном руководстве Сэмбрука с соавт. (Sambrook et al., 1989). Выделение РНК из рекомбинантных штаммов бактерий проводили с помощью набора FastRNA Pro Blue Kit (США). Комплементарную мРНК получали при помощи фермента MMLV-ревертазы. В качестве вещества индуктора промотора *ParaBAD* (вектор *pJN105*) использовали арабинозу в концентрации 0,1 – 2 мМ. Выделение и анализ белков проводили согласно методике Towbin (Towbin et al., 1979). Азотфиксирующую активность бактерий определяли «ацетиленовым» методом на газовом хроматографе Shimadzu-GC 2014 (Умаров, 1986; Минеев, 2001). Исследование стабильности привнесенных плазмид в бактериях проводили путем последовательного размножения рекомбинантных штаммов в отсутствие давления отбора (антибиотика) (Peloquin et al., 2002; Ma et al., 2011). Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием программы Microsoft Office Excel 2010. Для сравнения независимых выборок использовали критерий Краскела-Уоллиса. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Работа выполнена частично на оборудовании РЦКП «Агидель» и УНУ «КОДИНК».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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 клубенкообразующую 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, относящихся к родам *Rhizobium*, *Ensifer* и *Mesorhizobium*, на способность формировать функционирующие клубеньки и на наличие устойчивости к антибиотику (таблица 1). Данные штаммы были взяты из коллекции симбиотических микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН «Симбионт».

Таблица 1 – Оценка устойчивости эффективных штаммов ризобий к антибиотику

Род бактерий	Количество исследуемых штаммов	Количество резистентных штаммов (гентамицин, 15 мкг/мл)
<i>Rhizobium</i>	34	0
<i>Ensifer</i>	58	50
<i>Mesorhizobium</i>	42	2

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 1).

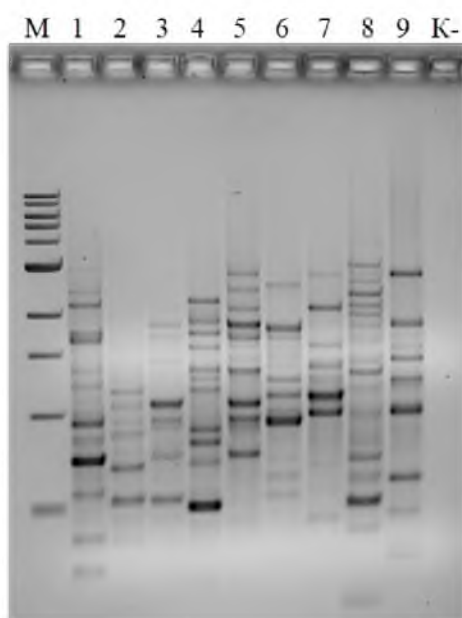


Рисунок 1 – Электрофоретические спектры RAPD – анализа диких штаммов клубеньковых бактерий: 1 – штамм VSyl1; 2 – штамм VSyl3; 3 – штамм VSyl7; 4 – штамм VSyl8; 5 – штамм LPis4; 6 – штамм MLu2; 7 – штамм MLu10; 8 – штамм LZh1; 9 – штамм LZh3. М – маркер. К- – отрицательный контроль.

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 плаزمидах (*pSym*), или в составе интегрированных конъюгативных мобильных генетических элементов (ICESym) в составе хромосомы (Frost et al., 2005; Шестаков 2007; Colombi et al., 2021). За счет такой локализации они часто вовлекаются в процесс горизонтального переноса. Для оценки вероятности 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 2).

В ходе проведенного исследования была обнаружена следующая закономерность: 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.

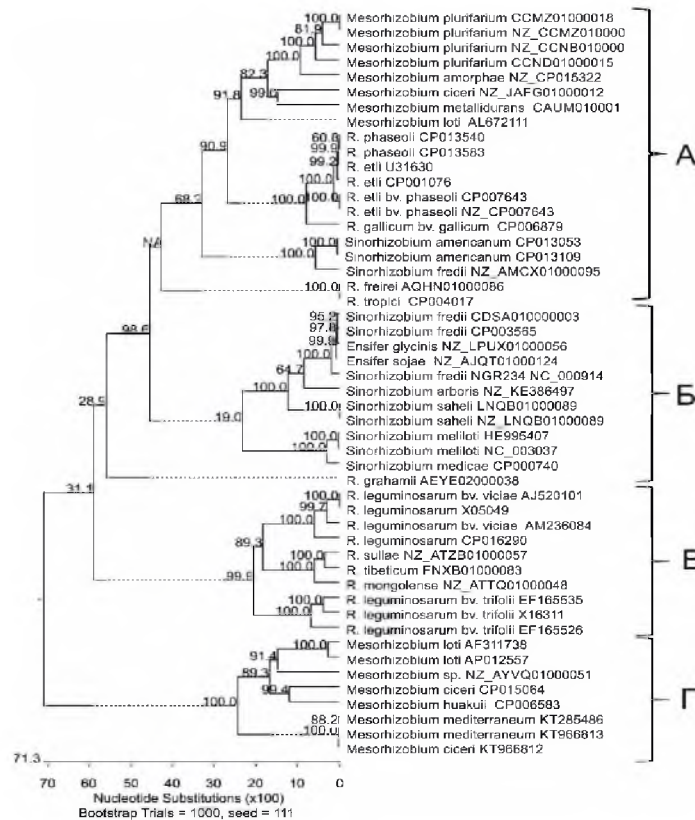


Рисунок 2 – Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основе сравнительного анализа последовательностей гена *nifA*. А – кластер, образованный тремя родами клубеньковых бактерий; Б – кластер, образованный ризобиями рода *Ensifer*; В – кластер, образованный клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium*; Г – кластер, образованный бактериями рода *Mesorhizobium*.

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, кодирующих нитрогеназный комплекс, и наработки 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 (Buchanan-Wollaston et al., 1981; Kennedy and Robson 1983; Zhu et al., 1983; 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 привнесение дополнительной активной копии данного гена приводило к появлению азотфиксации в свободноживущем состоянии среди клубеньковых бактерий (Баймиев и др., 2019). 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). В создаваемую конструкцию различные варианты гена *nifA* встраивались под управление индуцибельного промотора *ParaBAD*, который активируется сахаром арабинозой (рисунок 3). Согласно литературным данным гены под регуляцией данного промотора имеют 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 – индуктор промотора *Pm* *m*-толуоловая кислота. Поскольку 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.

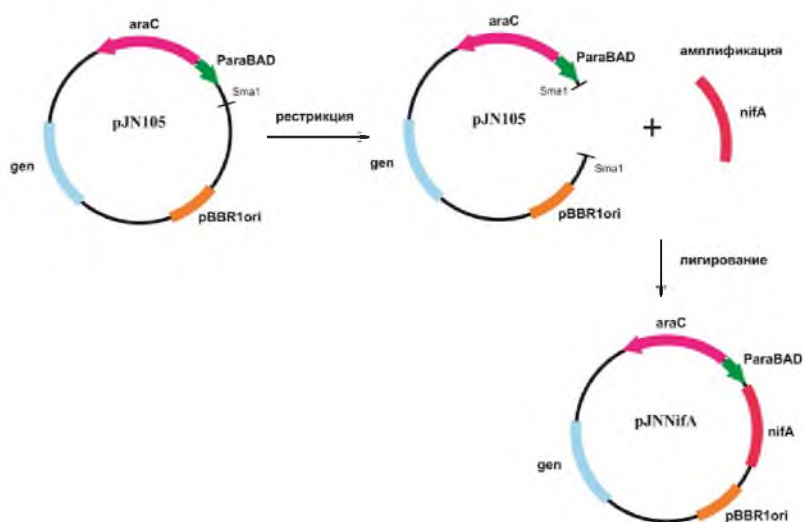


Рисунок 3 – Схема клонирования гена *nifA* в вектор *pJN105*.

Хотя по результатам сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов *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*. 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).

На следующем этапе работы 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 2). 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 штамма, а с другими вариантами по одному.

Таблица 2 – 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

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 4).



Рисунок 4 – Пример вестерн-блот анализа белков NifH, выделенных из штаммов клубеньковых бактерий дикого типа и их рекомбинантных вариантов. 1 – гибридизационный профиль белка NifH, полученный из клубеньков гороха посевного; 2-4 – белок NifH, выделенный из штаммов дикого типа VSyl7, MLu2 и LZh1, соответственно; 5-7 – белок NifH, полученный из рекомбинантных штаммов VSyl7ParaBADRhizo, MLu2ParaBADsino и LZh1ParaBADMeso, 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 5).

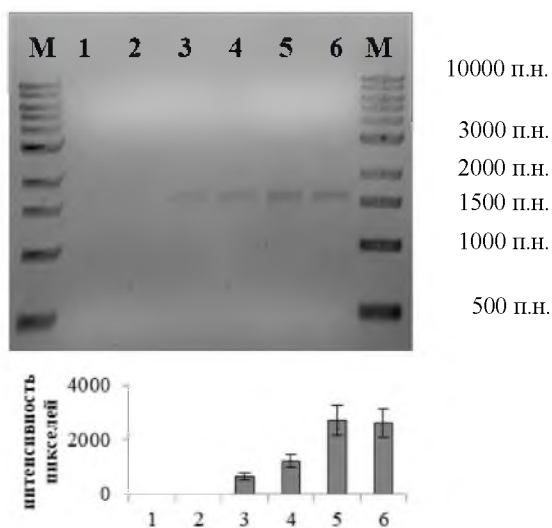


Рисунок 5. Анализ транскрипционной активности гена *nifA* методом ОТ-ПЦР у рекомбинантного штамма бактерий *Rhizobium* sp. VSyl7 с дополнительной копией данного гена рода *Rhizobium* при воздействии различных концентраций индуктора арабинозы: 1 – без индуктора; 2 – 0,1 мМ; 3 – 0,5 мМ; 4 – 1 мМ; 5 – 1,5 мМ; 6 – 2 мМ.

Вместе с этим, например, у рекомбинантных штаммов *R. leguminosarum* VSyl7 с конструкцией *pJN105nifARhizo* и *Mesorhizobium* sp. LZhl 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 6).

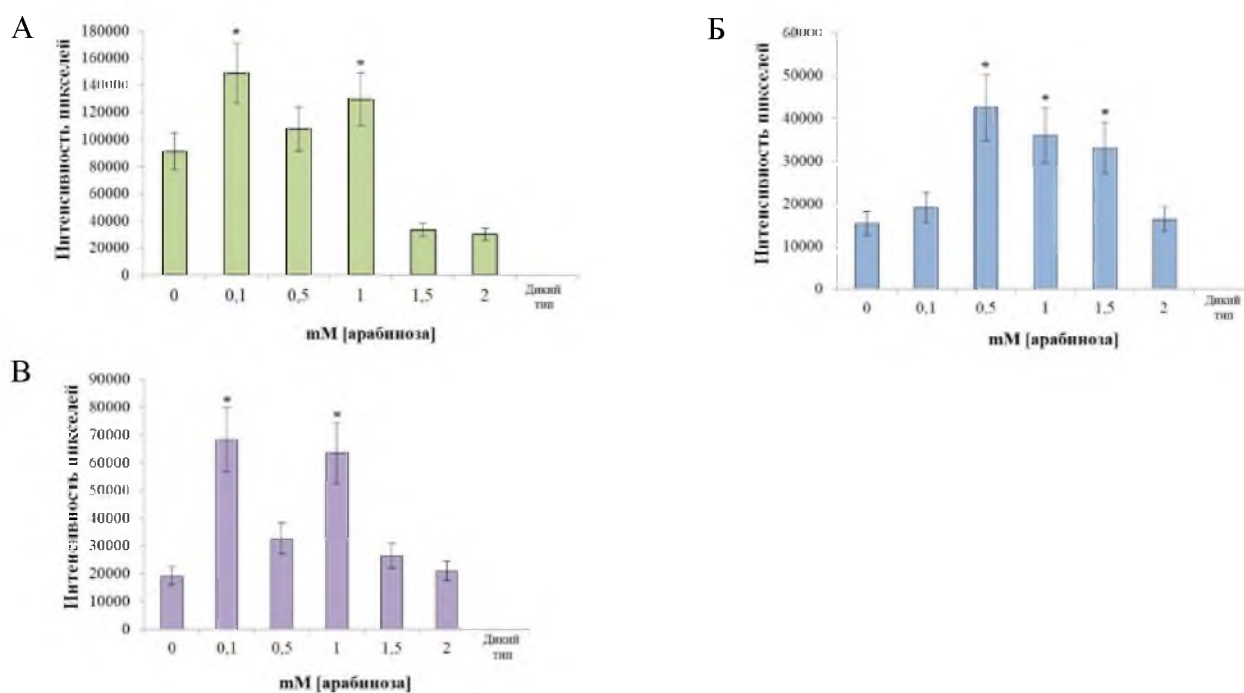


Рисунок 6 – Гистограммы анализа наработки белка NifH рекомбинантными бактериями и штаммами дикого типа дот-блот-методом, выращенными на питательной среде в присутствии/отсутствии индуктора – арабинозы в диапазоне концентраций 0,1 – 2 мМ. А. Рекомбинантный штамм бактерий *Rhizobium* sp. VSyl7 с дополнительной активной копией *nifA* гена рода *Rhizobium*, штамм дикого типа – VSyl7. 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. LZhl с дополнительной активной копией *nifA* гена рода *Mesorhizobium*, штамм дикого типа – LZhl. 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.

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 ответа при воздействии на них индуктором.

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 . В результате было показано, что концентрация 1 мМ арабинозы оказывает наибольший эффект на уровень азотфиксации у рекомбинантных штаммов, принадлежащим к трем основным родам клубеньковых бактерий (рисунок 7). 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. Это может быть связано с повышенной нагрузкой на бактериальную клетку при увеличении выработки целевого белка. Для дальнейшей работы нами была выбрана концентрация индуктора равная 1 мМ.

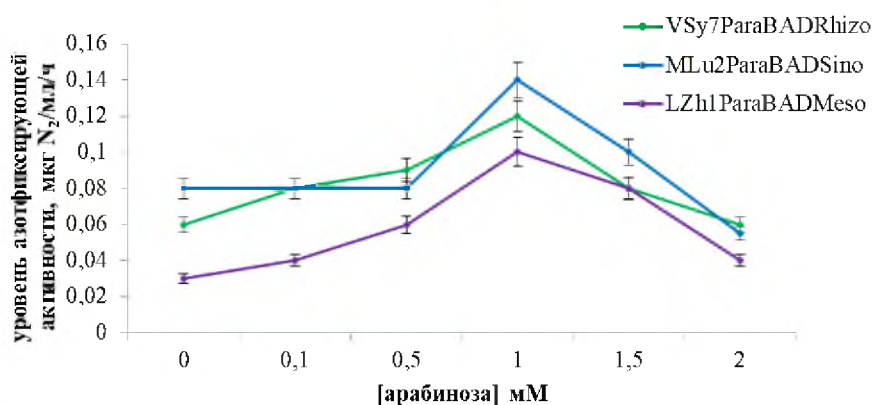


Рисунок 7 – Влияние различной концентрации индуктора на уровень азотфиксации.

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 на питательной среде как 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 8). При этом азотфиксирующая активность данных бактерий наблюдалась как при наличии конструкций с геном *nifA*, который характерен бактериям своего рода, так и с ортологами, клонированными из ризобий других родов. Это свидетельствует о том, что продукты генов *nifA* обладают универсальностью среди исследованных родов симбиотических азотфиксаторов. 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.

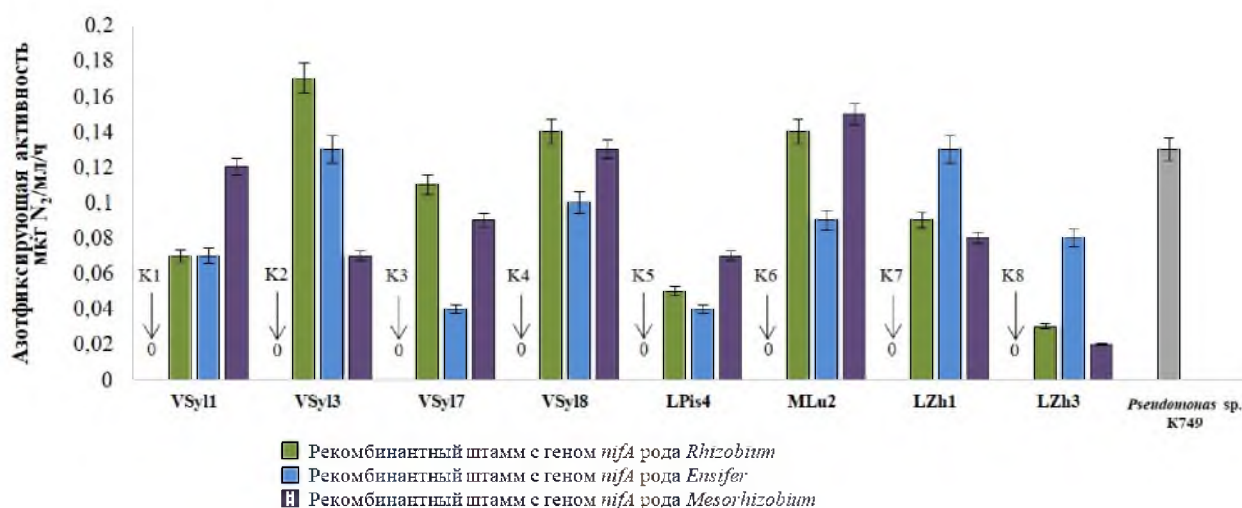


Рисунок 8 – Анализ азотфиксирующей активности рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий. В качестве образца для сравнения взяты дикие варианты штаммов клубеньковых бактерий K1 – K8.

Исследование стабильности привнесенного вектора среди клубеньковых бактерий

Необходимо отметить, что данная работа проводилась на диких штаммах клубеньковых бактерий, с неизвестными рекомбинационными характеристиками, поэтому важным этапом в исследовании 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.

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* (VSy13, VSy17, LPis4) и по два штамма *Ensifer* sp. (MLu2 и MLu10) и *Mesorhizobium* sp. (LZh1 и LZh3), несущие дополнительную копию *nifA* гена своего рода.

Было обнаружено, что среди трансформированных ризобий наблюдается потеря вектора при долговременном культивировании данных микроорганизмов, причем

отличия имеются даже среди штаммов одного вида бактерии (рисунок 9). Так рекомбинантные штаммы *R. leguminosarum* VSy13 и VSy17, трансформированные конструкцией *pJN105ParaBADRhizo*, стабильно растут в течение 20 – 22 пассажей на среде с антибиотиком, что подтверждается также ПЦР-анализом (рисунок 10). 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 9).

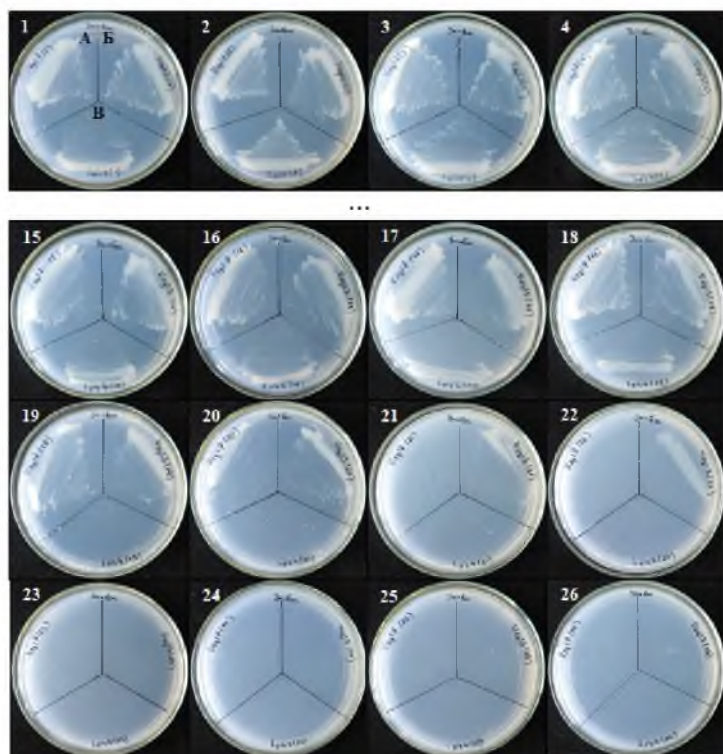


Рисунок 9 – Рост рекомбинантных штаммов на среде с антибиотиком в течение 26 пассажей.

А – рекомбинантный штамм VSy17ParaBADRhizo;

Б – рекомбинантный штамм VSy13ParaBADRhizo;

В – рекомбинантный штамм LPis4ParaBADRhizo.

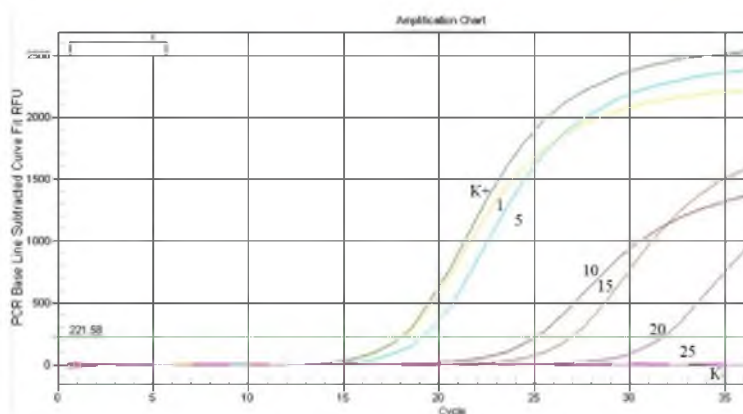


Рисунок 10 – График амплификации ДНК рекомбинантного штамма VSy17ParaBADRhizo, выращенного в течение 25 пассажей. K+ – положительный контроль (исходный рекомбинантный штамм). K- – отрицательный контроль.

Совсем иные результаты выявляются при рассмотрении рекомбинантных штаммов, относящихся к другим родам клубеньковых бактерий. Так, рекомбинантный штамм MLu2ParaBADSinO, относящийся к роду *Ensifer*, стабильно рос на среде с селективным маркером в течение 40 пассажей (рисунок 11). 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 (рисунок 12).

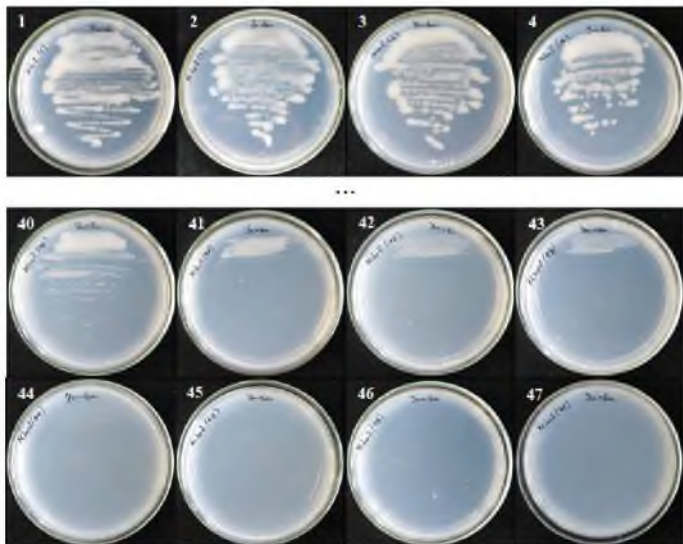


Рисунок 11 – Рост рекомбинантного штамма MLu2ParaBADsino на среде с антибиотиком в течение 47 пассажей.

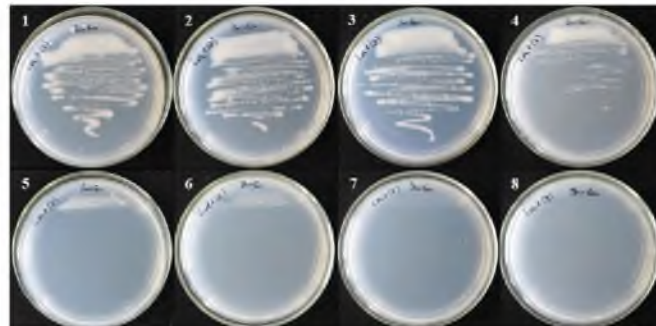


Рисунок 12 – Рост рекомбинантного штамма LZh1ParaBADMeso на среде с антибиотиком в течение 8 пассажей.

Таким образом, генно-инженерные конструкции, полученные на основе плазмиды широкого круга с репликоном BBR1, у рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий имеют разную стабильность наследования, что в свою очередь непременно отражается на стабильности рекомбинантных вариантов штаммов. Это обязательно должно учитываться при постановке экспериментов с применением микроорганизмов с привнесенными генно-инженерными конструкциями.

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.

Для данного опыта были выбраны штаммы VSyl3, трансформированные различными вариантами гена *nifA*, поскольку данные варианты показали наибольшую азотфиксирующую активность *ex planta*. В результате было отмечено, что уровень хлорофилла **a** и каротиноидов у растений, обработанных рекомбинантными штаммами VSyl3ParaBADRhizo и VSyl3ParaBADSino достоверно был выше, чем у растений обработанных диким вариантом штаммов и без нее. По количеству содержания хлорофилла **b** достоверных данных выявлено не было (рисунок 13А).

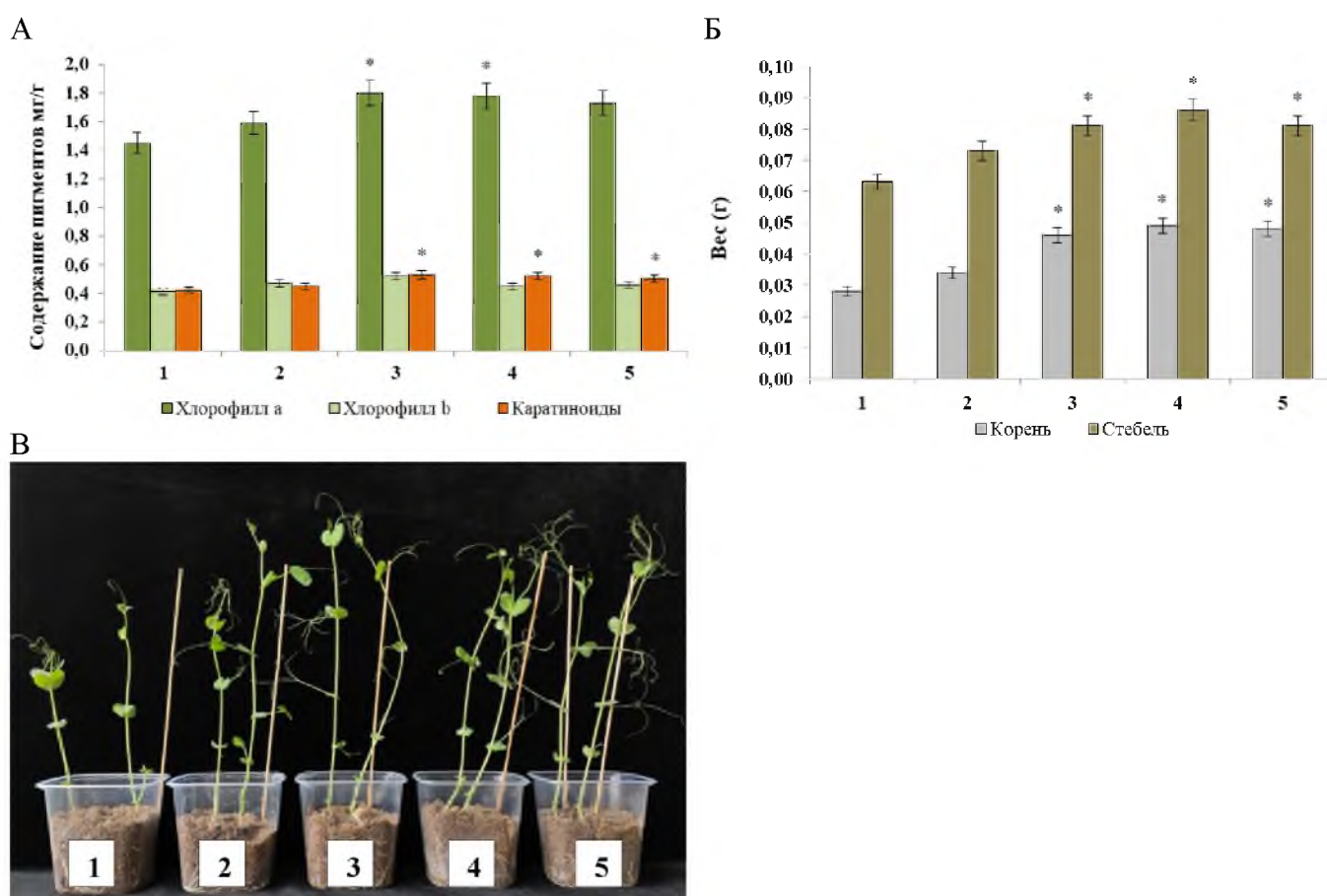


Рисунок 13 – Оценка ростостимулирующего влияния рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий на растения гороха: 1 – растение без обработки; 2 – штамм дикого типа VSyl3; 3 – рекомбинантный штамм VSyl3ParaBADRhizo; 4–рекомбинантный штамм VSyl3ParaBADSino; 5 – рекомбинантный штамм VSyl3ParaBADMeso. А – 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.

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 растение гороха оценивали по показателям урожайности. Было обнаружено, что после обработки семян гороха штаммами VSy13ParaBADRhizo и VSy18ParaBADsino данный показатель был выше, чем после инокуляции семян штаммами исходного типа и свободноживущего азотфиксатора (рисунок 14).

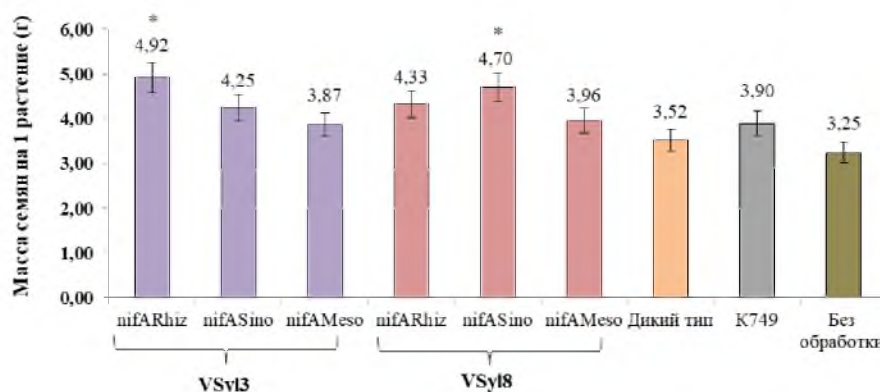


Рисунок 14 – Оценка влияния рекомбинантных штаммов на урожайность растения гороха в естественных условиях. Знак «*» указывает на достоверные различия ($p < 0,05$) между растениями, обработанными рекомбинантными штаммами и штаммом свободноживущего азотфиксатора.

Оценка ассоциативного ростостимулирующего влияния рекомбинантных бактерий на растения была проведена на культуре ячменя обыкновенного. Эксперимент так же проводили в естественных условиях. Для инокуляции были выбраны разные варианты рекомбинантных штаммов, принадлежащих 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 15). Так, например, штамм MLu2 с привнесенным 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 VSy13. 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 LZh1 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.

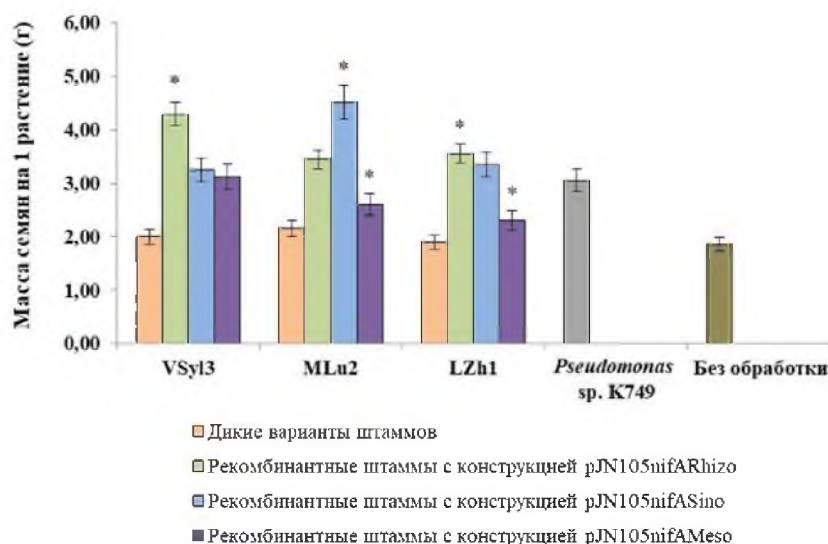


Рисунок 15 – Оценка ростостимулирующего влияния рекомбинантных штаммов ризобий на растения ячменя в естественных условиях. Знак «*» указывает на достоверные различия ($p < 0,05$) между растениями, обработанными рекомбинантными штаммами и штаммом свободноживущего азотфиксатора.

Таким образом, по результатам данной работы было выявлено, что индукция азотфиксирующей активности у штаммов ризобий 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 генетическое сочетание набора генов, участвующих в процессе фиксации азота. При этом еще раз подтверждается ключевая роль горизонтального переноса генов 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 ризобий.

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 ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Баймиев Ан.Х., Акимова Е.С., Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Мулдашев А.А., Чемерис А.В., Баймиев Ал.Х. Генетическое разнообразие и филогения клубеньковых бактерий выделенных из клубеньков растений рода *Lupinaster*, произрастающих на южном Урале // Генетика. – 2019. – Т. 55. – № 1. – С. 52-59. (WoS, Scopus, ВАК, IF 0,581, Q4)
2. Баймиев Ан.Х., Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Акимова Е.С., Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х. Искусственная активация экспрессии *nif*-генов у клубеньковых бактерий *ex planta* // Экологическая генетика. – 2019. – Т. 17. – № 2. – С. 35-42. (Scopus, ВАК)
3. Баймиев Ан.Х., Владимирова А.А., Акимова Е.С., Гуменко Р.С., Мулдашев А.А., Чемерис А.В., Баймиев Ал.Х. Генетическая характеристика клубеньковых бактерий эндемичных для южного Урала видов рода *Oxytropis* (Fabaceae-бобовые) // Экологическая генетика. – 2020. – Т. 18. – № 2. – С. 157-167. (Scopus, ВАК)
4. Владимирова А.А., Гуменко Р.С., Акимова Е.С., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ан.Х. Функциональная специфичность продукта гена *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий // Микробиология. – 2021. – Т. 90. – № 4. – С. 471-479. (WoS, Scopus, ВАК, IF 1,156, Q4)
5. Гуменко Р.С., Кашапова Г.М., Владимирова А.А., Кагирова А.С., Баймиев Ан.Х. Генетическая регуляция азотфиксация у бактерий // Биомика. – 2017. – Т. 9. – № 4. – С. 340-344. (РИНЦ, IF 0,977)
6. Владимирова А.А., Акимова Е.С., Коряков И.С., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ан.Х. Исследование стабильности наследования рекомбинантных плазмид клубеньковыми бактериями // Биомика. – 2021. – Т. 13. – № 4. – С. 402-408. (РИНЦ, IF 0,977)

Материалы конференций

1. Гуменко Р.С., Саргалиева Г.М., Симахина А.С., Владимирова А.А., Акимова Е.С., Баймиев Ан.Х. Изучение искусственной регуляции экспрессии генов белков нитрогеназного комплекса для создания высокоэффективных биоудобрений на основе клубеньковых бактерий // В сборнике тезисов: X Всероссийской научной интернет-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии». – Уфа. – 2016. – С. 113.

2. Саргалиева Г.М., Симахина А.С., Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Акимова Е.С., Баймиев Ан.Х. Искусственная регуляция экспрессии генов белков нитрогеназного комплекса путем создания экспрессирующих конструкций на основе плазмиды *pJN105* // В сборнике тезисов: III Пущинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». – Пущино. – 2016. – С. 33-34.
3. Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Саргалиева Г.М., Акимова Е.С., Баймиев Ан.Х. Получение штаммов клубеньковых бактерий с измененной регуляцией генов нитрогеназного комплекса // В сборнике тезисов: 21-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино. – 2017. – С. 17.
4. Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Саргалиева Г.М., Симахина А.С., Баймиев Ан.Х. Искусственная регуляция экспрессии генов белков нитрогеназного комплекса ризобий // В сборнике тезисов: I российского микробиологического конгресса. – Пущино. – 2017. – С. 102-103.
5. Баймиев Ан.Х., Гуменко Р.С., Акимова Е.С., Владимирова А.А., Саргалиева Г.М., Баймиев Ал.Х. Бобово-ризобиальный симбиоз: что выбирают растения? // В сборнике тезисов: Годичного собрания Общества физиологов растений России, научной конференции и школе молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты». – Судак, Крым – 2017. – С. 21.
6. Баймиев Ан.Х., Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Баймиев Ал.Х. Горизонтальный перенос генов и нетипичные клубеньковые бактерии // В сборнике тезисов: Международной научной конференции «PLAMIC2018». – Уфа. – 2018. – С. 96.
7. Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ан.Х. Модификация регуляции генов азотфиксации у клубеньковых бактерий // В сборнике тезисов: Международной научной конференции «PLAMIC2018». – Уфа. – 2018. – С. 130.
8. Владимирова А.А., Гуменко Р.С., Акимова Е.С., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х. Функциональная специфичность регуляторного белка NifA внутри группы клубеньковых бактерий // В сборнике тезисов: Всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания». – Иркутск. – 2019. – С. 47.
9. Владимирова А.А., Гуменко Р.С., Акимова Е.С., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ан.Х. Специфичность белка NifA, активатора генов нитрогеназного комплекса, внутри группы клубеньковых бактерий // В сборнике тезисов: IX Всероссийская конференция молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой». – Саратов. – 2019. – С. 6.
10. Владимирова А.А., Акимова Е.С., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х. Функциональная специфичность белка NifA среди клубеньковых бактерий // В сборнике тезисов: Второй международной научной конференции «PLAMIC2020». – Саратов. – 2020. – С. 38.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГПГ – горизонтальный перенос генов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ICESym – конъюгативные элементы с генами, необходимыми для симбиоза