

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**

03.01.03 – молекулярная биология

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

Уфа 2020

Работа выполнена в Институте 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, ведущий научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН

Рецензенты: – Кулуев Булат Разяпович

доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии и биотехнологии БашГУ

– Акимова Екатерина Сергеевна

кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. 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 и другие соединения. Однако, ни растения, ни животные, ни человек не способны самостоятельно усваивать данный элемент, несмотря на его достаточное обилие в атмосферном воздухе (порядка 78%). Существуют почвенные 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 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. Так же и организация *nif*-генов у ризобий разных видов сильно варьирует. Эти гены локализованы либо на симбиотических плаزمиде рSym (*Rhizobium*, *Ensifer*), либо на хромосомных островках (*Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*). Многими авторами показано, что симбиотические гены активно участвуют в горизонтальном переносе генов (ГПГ), это может приводить к появлению новых азотфиксирующих бактерий, до этого не являющихся таковыми (Sullivan et al., 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 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*. 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 клубеньковых бактерий не наблюдается.

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

Задачи. В соответствии с поставленной целью работы были сформулированы следующие задачи:

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 продукта гена *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий на основании появления нитрогеназной активности в

свободноживущем состоянии у рекомбинантных вариантов штаммов клубеньковых бактерий.

5. Исследовать ростостимулирующее влияние полученных рекомбинантных вариантов штаммов ризобий на сельскохозяйственные культуры.

Научная новизна и практическая значимость. В данной работе впервые проводится исследование специфичности продукта гена *nifA* среди клубеньковых бактерий. 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.

Апробация работы. 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).

Публикации. По материалам НКР опубликовано 17 печатных работ, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Личный вклад автора. Личный вклад автора заключается в планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных данных, подготовке публикаций.

Структура и объем НКР. НКР представлена на 93 страницах, содержит 3 таблицы и 14 рисунков. Включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждения, заключение, выводы, список сокращений и список литературы. Библиографический список включает 150 источников, среди них 18 – отечественных, 132 – зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Выбор объектов исследования

Клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *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 для клонирования осуществлялся из числа представителей перечисленных родов ризобий по следующим критериям: во-первых, штаммы должны были быть эффективными, т.е. должны иметь хорошую клубенкообразующую и азотфиксирующую активности, что свидетельствовало бы о присутствии полного набора необходимых для азотфиксирующего симбиоза генов, во-вторых, неустойчивыми к действию антибиотиков для возможности селекции рекомбинантных штаммов после их трансформации. Штаммы, удовлетворяющие нас по условиям эффективности, были отобраны из коллекции симбиотических микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН «Симбионт». Далее, более 130 штаммов были проверены на устойчивость к действию антибиотика гентамицина (Gm), используемого в качестве маркера при скрининге рекомбинантных клонов. Было выявлено, что клубеньковые бактерии разных родов имеют значительные различия в резистентности к его действию. Наименее устойчивыми к гентамицину оказались бактерии рода *Rhizobium*. Большинство штаммов бактерий рода *Mesorhizobium* и *Ensifer* обладали устойчивостью, однако, последние имели наибольшую резистентность к данному антибиотику. Таким образом, для данного исследования были выбраны отобраны штаммы не резистентные к гентамицину и имеющие высокую азотфиксирующую активность: V.syl1, V.syl3, V.syl7, V.syl8, L.pis8 (под *Rhizobium*), M.lu2 (под *Ensifer*), L.zh1 и L.zh3 (под *Mesorhizobium*).

Анализ полиморфизма *nifA* гена среди клубеньковых бактерий

Для оценки вероятности приобретения *nifA* гена разными видами ризобий в ходе эволюции был проведен общий филогенетический анализ (рис. 1).

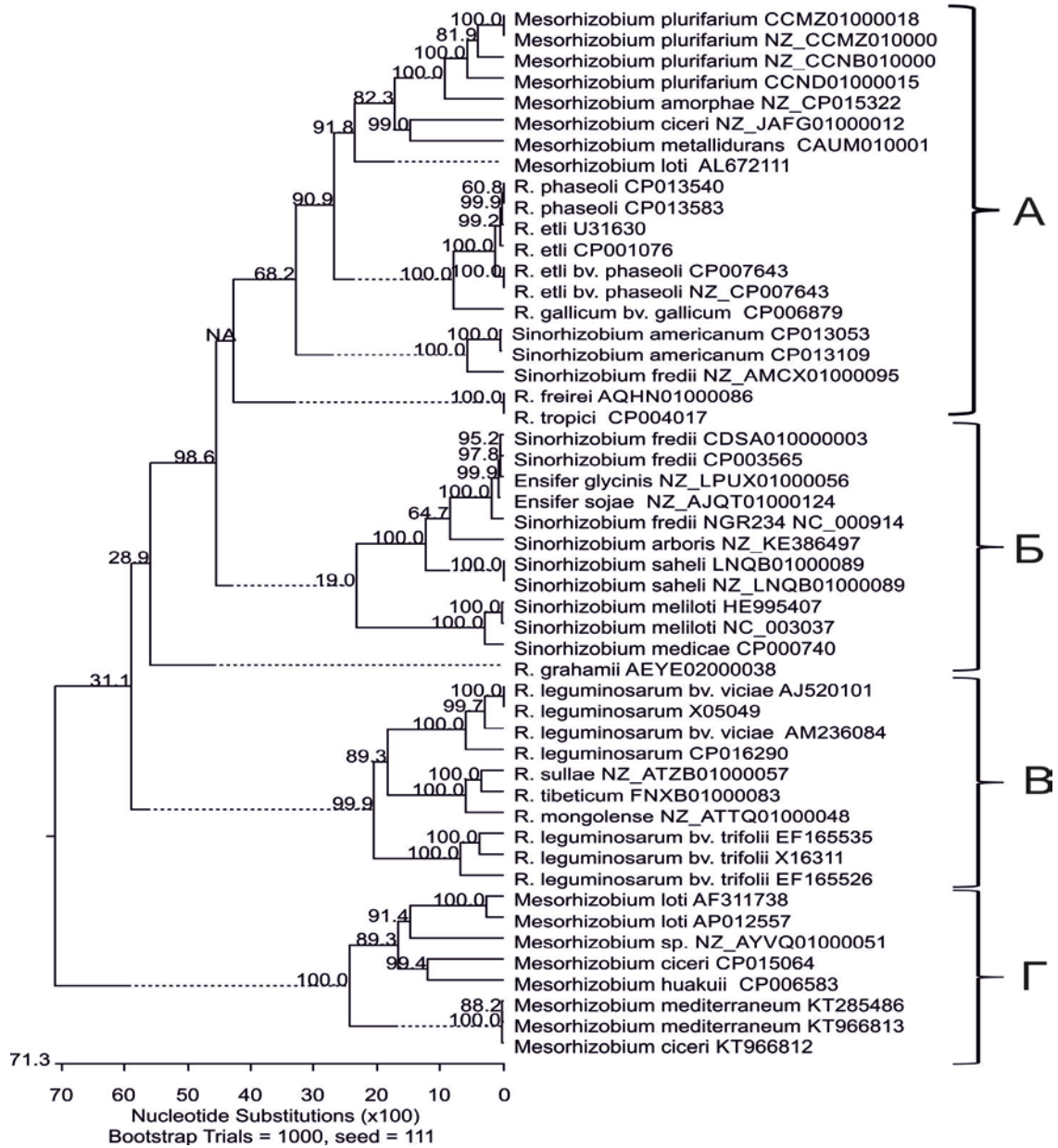


Рисунок 1. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основе сравнительного анализа последовательностей гена *nifA*. А – кластер, образованный тремя родами клубеньковых бактерий; Б – кластер, образованный ризобиями рода *Ensifer* (*Sinorhizobium*); В – кластер, образованный клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium*; Г – кластер, образованный бактериями рода *Mesorhizobium*.

При общем филогенетическом анализе последовательностей гена *nifA* разных родов клубеньковых бактерий были обнаружены следующие закономерности: часть взятых последовательностей генов *nifA* кластеризуются согласно родовой принадлежности микроорганизмов, что свидетельствует о параллельной эволюции данных типовых групп исследуемого гена 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 активном их участии в горизонтальном переносе генов.

Создание генно-инженерной конструкции с целевым геном *nifA*

Для выявления степени функциональной специфичности генов *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий нами были созданы генно-инженерные плазмидные конструкции с геном *nifA* под управлением бактериального промотора. В качестве основы была выбрана плазида широкого круга хозяев *pJN105* на основе репликона *pBBR1* (рис. 2).

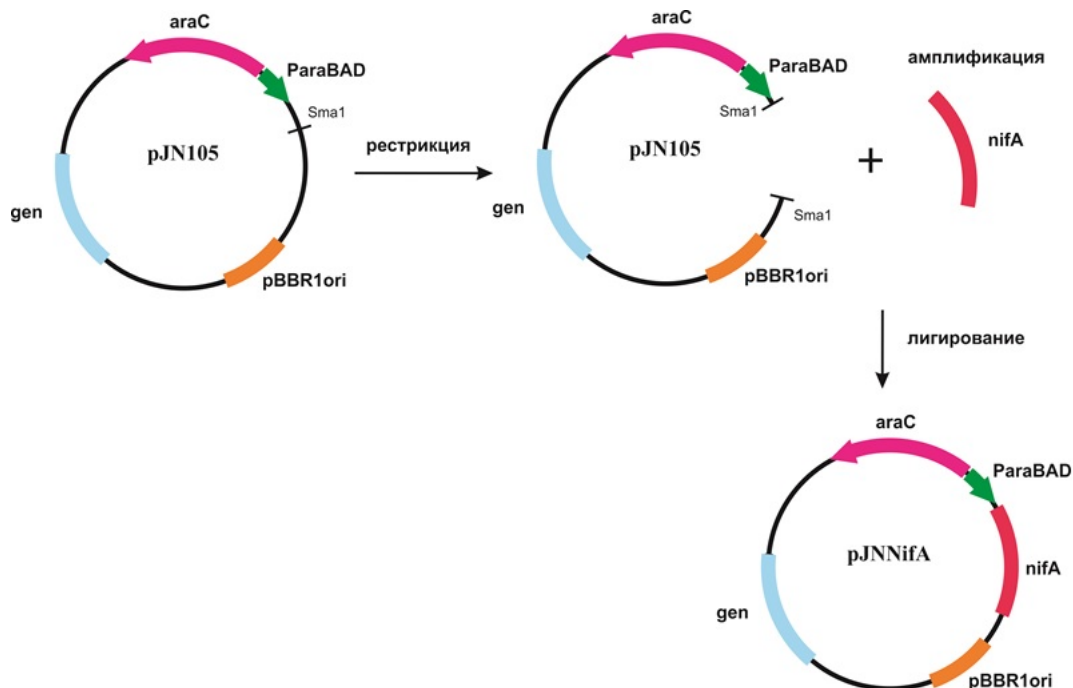


Рисунок 2. Схема клонирования гена *nifA* в вектор *pJN105*.

Поскольку при сравнительном анализе последовательностей генов *nifA* клубеньковых бактерий хотя и была обнаружена высокая гетерогенность, но тем не менее наблюдалось филогенетическое разделение по группам в зависимости от принадлежности к основным родам ризобий. В этой связи нами в качестве целевых генов при получении генно-инженерных конструкций были использованы три гена *nifA*, принадлежащих преимущественно бактериям родов *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*, которые в плазмиде *pJN105* были встроены под управление промотора *ParaBAD*, индуцируемого сахаром арабинозой. Известно, что бактерии рода *Mesorhizobium* содержат две копии гена регуляторного белка NifA: *nifA1* и *nifA2*. Нами для работы была клонирована последовательность гена, которая соответствует варианту гена *nifA2* (рис. 3).

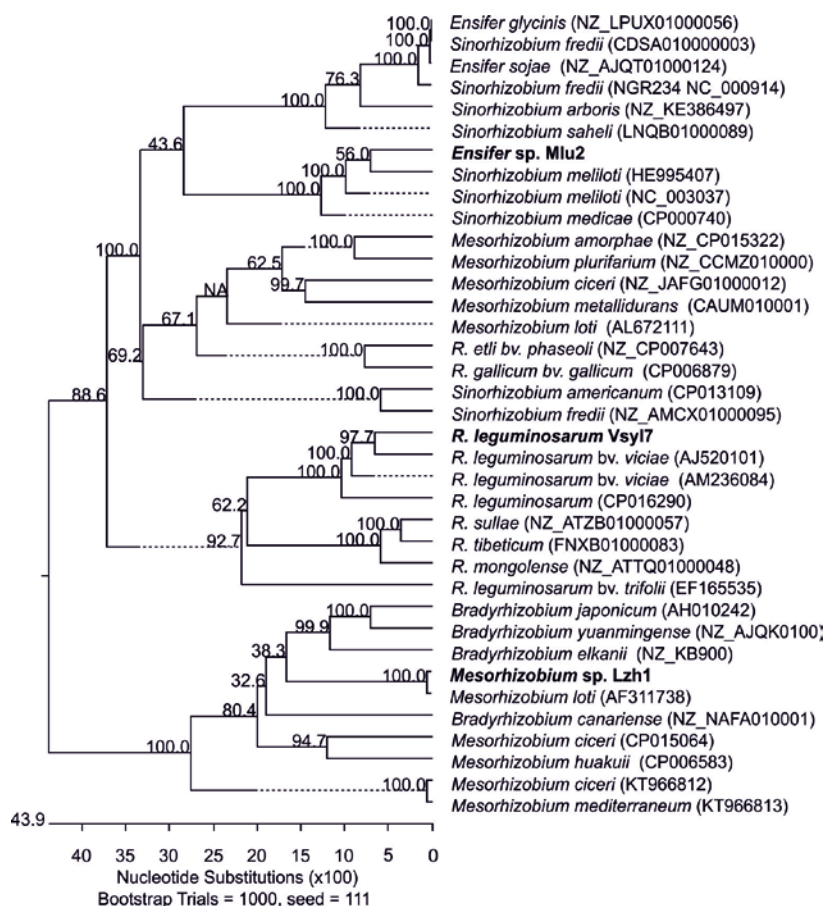


Рисунок 3. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена *nifA*. Жирным шрифтом отмечены нами исследованные штаммы микроорганизмов.

Для того чтобы удостовериться, что конструкции функциональны в штаммах ризобий нами параллельно были создана подобная же конструкция, где вместо целевого гена был вставлен репортерный ген зеленого флуоресцентного белка. При трансформации данной конструкцией ризобий образовывались зелено окрашенные клоны бактерий, что доказывает функциональность полученных конструкций в клубеньковых бактериях. В дальнейшем конструкции с генами *nifA* были трансформированы в штаммы клубеньковых бактерий.

Таким образом, для оценки специфичности продукта гена *nifA* нами были получены серии рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий, содержащих дополнительные копии гена *nifA*. Так были получены рекомбинантные варианты штаммов ризобий *R.leguminosarum* VSyl1, *R.leguminosarum* VSyl3, *R.leguminosarum* VSyl7, *R.leguminosarum* VSyl8, *R.leguminosarum* LPis4, *Ensifer* sp. MLu2, *Mesorhizobium* sp. LZh1, *Mesorhizobium* sp. LZh3 со всеми тремя полученными плазмидными конструкциями, несущими различные варианты дополнительной копии гена *nifA*, принадлежащими родам *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*. Штаммы рода *Bradyrhizobium* из работы были исключены ввиду крайней сложности получения у бактерий данного рода рекомбинантных клонов.

Анализ функциональной активности гена *nifA* у рекомбинантных штаммов

Поскольку белок NifA является основным активатором генов нитрогеназного комплекса, функциональную активность привнесенных копий его гена проверяли определением индукции наработки корового белка нитрогеназы NifH методом дот-блот анализа с использованием поликлональных куриных антител, полученных к данному белку. В данном случае был использован дот-блот вариант, поскольку при проведении вестерн-блот метода с разделением белков в полиакриламидном геле при анализе тотального белка рекомбинантных штаммов проявлялась только одна целевая полоса (рис. 4).



Рисунок 4. Анализ белка NifH вестер-блот методом, выделенных у штаммов клубеньковых бактерий дикого типа и рекомбинантов. 1 – белок NifH, выделенный из клубеньков гороха посевного; 2-3 – белок NifH, выделенный у штаммов дикого типа *V.syl7*, *M.lu2* и *L.zh1*, соответственно; 5-6 – белок NifH, выделенный из рекомбинантных штаммов *V.syl7ParaBADVic*, *M.lu2ParaBADsino* и *L.zh1ParaBADMeso*, соответственно.

Таким образом, было показано, что NifH отсутствует у диких штаммов в свободноживущем состоянии, а во всех рекомбинантных штаммах белок NifH обнаруживается. Также было проверено влияние концентрации индуктора бактериального промотора *ParaBAD*, под регуляцией которого находятся привнесенные копии генов *nifA*, на уровень наработки белка NifH (рис. 5). Были исследованы концентрации индуктора арабинозы в диапазоне от 0,1мМ до 2мМ. Показано, что наибольший уровень наработки целевого белка у разных рекомбинантных штаммов происходит при разных концентрациях индуктора. Наибольший ответ происходит при концентрациях близких к 1 мМ. Хотя есть и исключения. Так, например у рекомбинантного штамма *R.leguminosarum* *Vsyl7* с конструкцией *pJN105RhizonifA* и *Mesorhizobium* sp. с конструкцией *pJN105SinonifA* было обнаружено повышение индукции гена *nifH* уже при концентрации 0,1 мМ, которая при 0,5 мМ падала и опять повышалась при 1 мМ. Выявить какую-то закономерность влияния определенных концентраций индуктора гена *nifA* на активацию генов нитрогеназного комплекса на данном этапе пока не получилось, поскольку индуктор на конечный белок воздействует опосредовано через продукт гена *nifA*, который, в свою очередь может

подвергаться различным воздействиям, например действию ингибиторов. Поэтому каждый вариант штаммов имеет свою особенность при ответе на воздействие на них индуктором. Но тем не менее, было показано, что у всех штаммов при воздействии индуктором арабинозой в концентрации 1 мМ происходит наработка белка NifH на близких к максимальному или на максимальных уровнях. Поэтому при выполнении следующего этапа работы была использована именно эта концентрация индуктора.

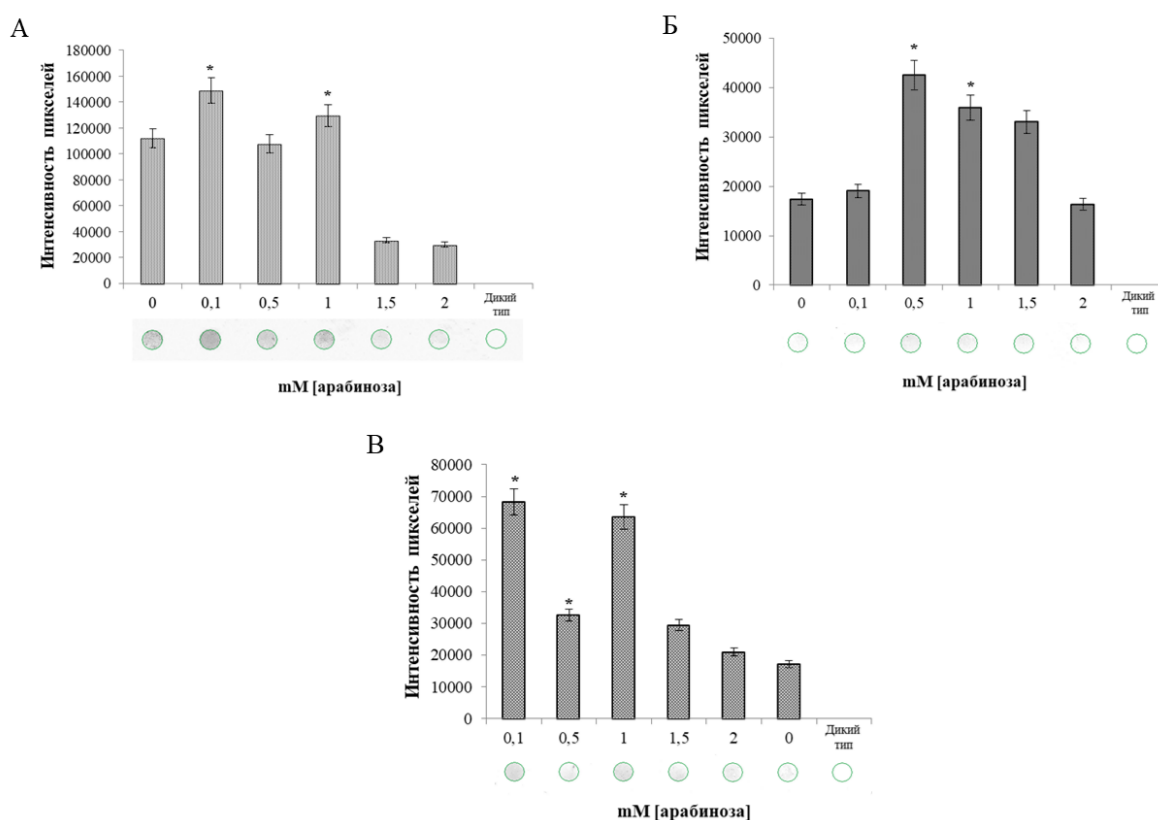


Рисунок 5. Гистограммы анализа наработки белка NifH рекомбинантными бактериями и штаммами дикого типа дот-блот-методом, выращенными на питательной среде в присутствии/отсутствии индуктора – арабинозы в диапазоне концентраций 0,1 – 2 мМ. А. Рекомбинантный штамм бактерий *Rhizobium* sp. VSy17 с дополнительной активной копией *nifA* гена рода *Rhizobium*, Б. Рекомбинантный штамм бактерий *Ensifer* sp. MLu2 с дополнительной активной копией *nifA* гена рода *Ensifer*, В. Рекомбинантный штамм бактерий *Mesorhizobium* sp. LZh1 с дополнительной активной копией *nifA* гена рода *Mesorhizobium*. Дот-блот-анализ проводился в трех повторностях. Средняя интенсивность пикселей по точкам представлена в графическом режиме. Знаком «*» помечены столбцы, где данные представляют статистическую значимость при $p < 0.05$.

Далее, все полученные рекомбинантные штаммы были проанализированы на наличие азотфиксирующей активности методом редукции ацетилена без добавления индуктора (рис. 6). В результате этого было выявлено, что привнесение активной дополнительной копии *nifA* гена у ризобий приводит к появлению процесса фиксации молекулярного азота *ex planta*. Так же, как и в предыдущем этапе, азотфиксирующая активность рекомбинантных штаммов в свободноживущем состоянии наблюдалась как при внесении конструкций с геном *nifA*, характерным бактериям своего рода, так и аналогичными генами, клонированными из бактерий других родов ризобий. Это говорит о том, что продукты генов *nifA* имеют универсальность среди исследованных родов клубеньковых бактерий. Но тем не менее нами были обнаружены и некоторые различия в активности при разных сочетаниях *nifA* и штаммов бактерий. При этом большее значение имел именно штамм, а не родовая принадлежность бактерий. Так, наибольшая азотфиксирующая активность нами была обнаружена у штамма *R. leguminosarum* Vsy13 при привнесении гена *nifA*, характерного для бактерий рода *Rhizobium*. В то же время другой штамм *R. leguminosarum* - Vsy11, трансформированный той же конструкцией, показал значительно меньшие значения. При этом у этого штамма наибольшую азотфиксирующую активность вызывала трансформация конструкцией, содержащей ген *nifA*, бактерий рода *Mesorhizobium*. Интересные данные были получены по штамму *Ensifer* sp. Штамм Mlu2 показал наименьшую азотфиксирующую активность при привнесении в клетки дополнительной активной копии гена *nifA* характерной для своего рода, тогда как рекомбинантные штаммы, трансформированные конструкциями, содержащими ген *nifA* бактерий рода *Rhizobium* и *Mesorhizobium* отличались более высокой нитрогеназной активностью. Рекомбинантные штаммы рода *Mesorhizobium* также характеризовались тем, что привнесение в их клетки гена *nifA* бактерии своего же рода приводила к меньшей степени активации азотфиксации по сравнению с привнесением гена *nifA* других родов ризобий.

Наибольшие показатели нитрогеназной активности у штаммов рода *Mesorhizobium* наблюдалось при трансформации их конструкциями с геном *nifA* бактерий рода *Ensifer*.

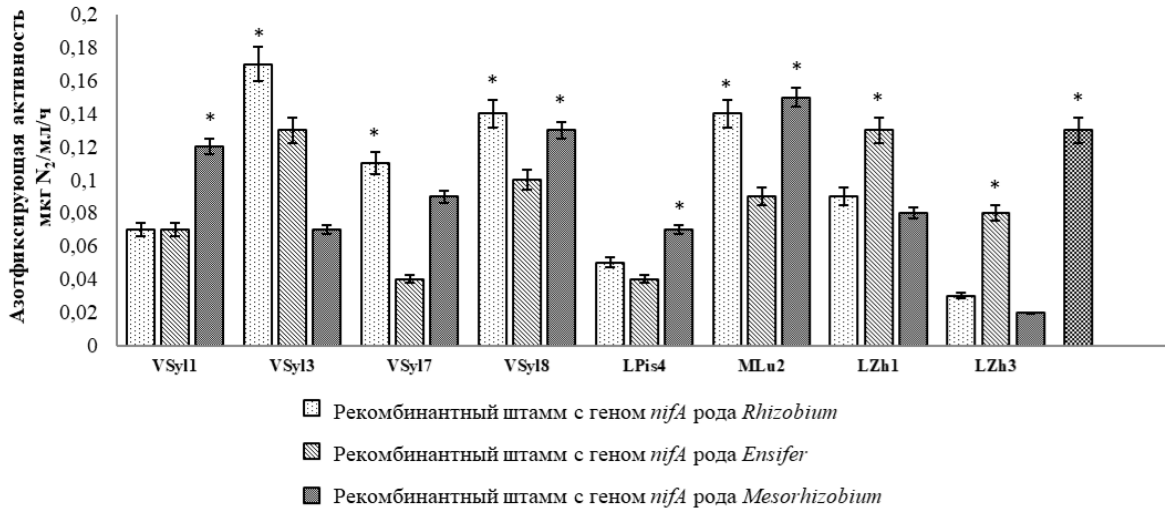


Рисунок 6. Анализ азотфиксирующей активности рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий. В качестве образца для сравнения взят штамм *Pseudomonas* sp. K749.

Оценка ростостимулирующего влияния рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий на сельскохозяйственные культуры

Для оценки ростостимулирующего влияния модифицированных штаммов клубеньковых бактерий на растения нами были поставлены мелкоделяночные опыты в лабораторных условиях. Было выявлено, что штамм *M.lu2nifASino* оказывает стимулирующее действие на рост и развитие люцерны (*Medicago sativa* L.) с образованием на корнях функционирующих клубеньков (рис. 7). Рекомбинантные штаммы, которые не оказали ростостимулирующее влияние, не образовывали клубеньки на корнях растения - люцерны. Рекомбинантный штамм *V.syl7* оказывал различное ростостимулирующее влияние на растение гороха (*Pisum sativum* L.) в зависимости от родовой принадлежности привнесенной копии *nifA* гена (рис. 8).

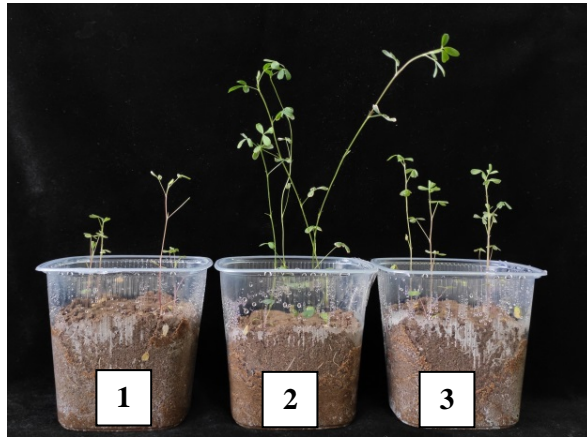


Рисунок 7. Оценка ростостимулирующего влияния рекомбинантного штамма *M.lu2ParaBAD* на растение люцерну. 1 – растение без обработки; 2 – растение обработанное рекомбинантным штаммом *M.lu2ParaBAD*; 3 – растение обработанное штаммом дикого типа *M.lu2*.

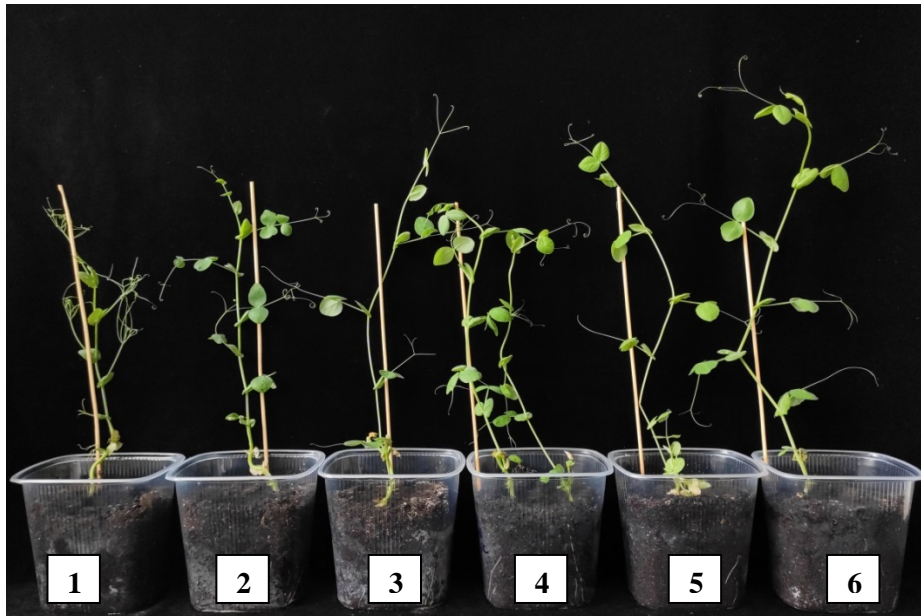


Рисунок 8. Оценка ростостимулирующего влияния рекомбинантных штаммов рода *Rhizobium*, содержащие различные копии *nifA* гена на растения гороха. 1 – растение без обработки; 2 – растение обработанное штаммом дикого типа *V.syl1*; 3 – растение обработанное штаммом *Pseudomonas* sp. K749; 4 – растение обработанное рекомбинантным штаммом *V.syl1* с дополнительной копией *nifA* гена рода *Rhizobium*; 5 – растение обработанное рекомбинантным штаммом *V.syl1* с дополнительной копией *nifA* гена рода *Ensifer*; 6 – растение обработанное рекомбинантным штаммом *V.syl1* с дополнительной копией *nifA* гена рода *Mesorhizobium*.

Было отмечено, что положительный эффект улучшенных штаммов на рост и развитие растений наблюдался при дефиците питательных элементов (выращивание растений в песке). В грунте, содержащем полный набор питательных веществ, макро- и микроэлементов, такого эффекта не наблюдалось.

Для исследования влияния рекомбинантных штаммов ризобий в естественных условиях осуществляли обработку семян ячменя, как наиболее отзывчивых растений на изменение содержания азота в почве. Было показано, что рекомбинантные штаммы оказывали ростостимулирующее влияние на растения ячменя по сравнению с контрольными штаммами (рис.8).

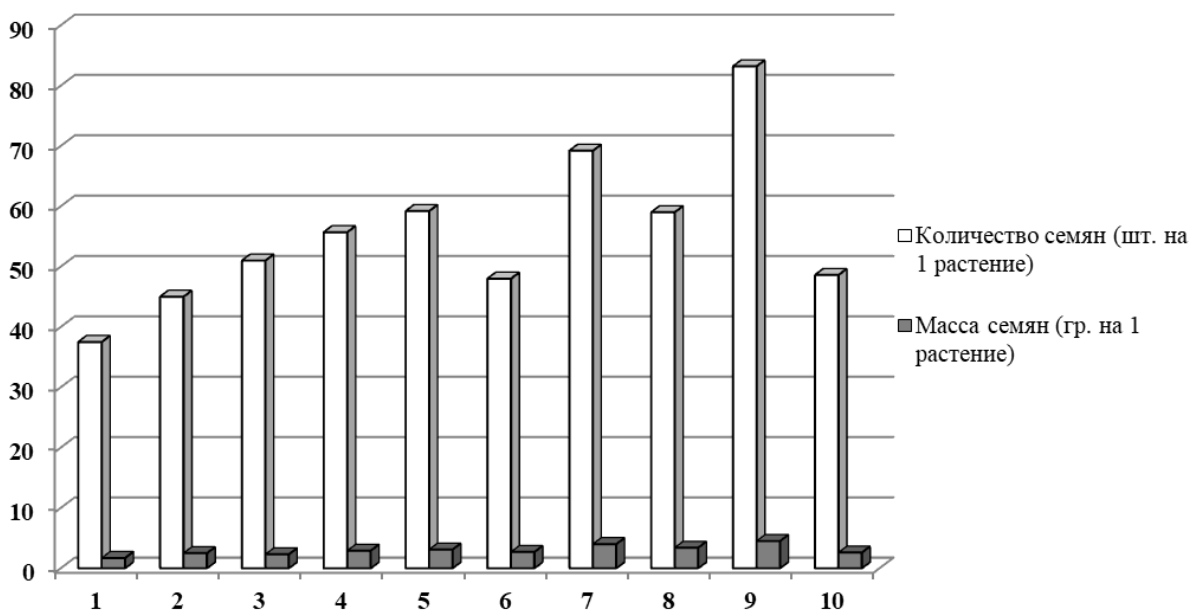


Рисунок 8. Диаграмма анализа ростостимулирующего влияния модифицированных штаммов клубеньковых бактерий на растения ячменя в естественных условиях. 1 – растение без обработки, 2 – растение обработанное штаммом дикого типа *V.syl7*, 3 – растение обработанное штаммом дикого типа *M.lu2*, 4 – растение обработанное штаммом свободноживущего азотфиксатора *Pseudomonas* sp. K749, 5 – растение обработанное рекомбинантным штаммом *V.syl7* с дополнительной копией *nifA* гена рода *Rhizobium*, 6 – растение обработанное рекомбинантным штаммом *V.syl7* с дополнительной копией *nifA* гена рода *Ensifer*, 7 – растение обработанное рекомбинантным штаммом *V.syl7* с дополнительной копией

nifA гена рода *Mesorhizobium*, 8 – растение обработанное рекомбинантным штаммом M.lu2 с дополнительной копией *nifA* гена рода *Rhizobium*, 9 – растение обработанное рекомбинантным штаммом M.lu2 с дополнительной копией *nifA* гена рода *Ensifer*, 10 – растение обработанное рекомбинантным штаммом M.lu2 с дополнительной копией *nifA* гена рода *Mesorhizobium*.

Поскольку у полученных рекомбинантных штаммов ризобий была обнаружена азотфиксирующая активность, то в последующем было проведено анализ количества аммонийного и нитратного азота в почве как при внесении исследуемых штаммов, так и без них. Показано, что после 30 дней инокуляции данными бактериями почвы в большинстве случаев достоверных отличий с контролем не было выявлено. За исключением одного штамма M.lu2ParaBADNifA. При инокуляции им в почве обнаружено накопление аммонийного азота (табл. 1). Однако у всех проанализированных штаммов наблюдалось снижение концентрации нитратного азота в почве.

Таблица 1.

Анализ состава и количества азотных соединений в почве

Образец	NH_4^+ , мг/кг	NO_3 , мг/кг
Почва без обработки (контроль)	11,2±3,6	176,1±14,2
Инокуляция штаммом <i>Pseudomonas</i> sp. K749	9,1±3,2	135,5±13,1
Инокуляция диким штаммом V.syl7	6,9±3,2	138,3±13,8
Инокуляция диким штаммом M.lu2	7,12±3,3	127,1±13,1
Инокуляция диким штаммом L.zh1	4,2±3,2	131,2±13,3
Инокуляция рекомбинантным штаммом Vsy7ParaBADNifA	8,2±3,6	122,3±13,2
Инокуляция рекомбинантным штаммом M.lu2ParaBADNifA	18,2±1,8*	124,7±13,2
Инокуляция рекомбинантным штаммом LZh1ParaBADNifA	7,5±3,2	133,3±13,2

ВЫВОДЫ

1. С помощью филогенетического анализа показано, что существуют штаммы клубеньковых бактерий всех 3-х родов (*Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*), содержащие как родоспецифичные варианты генов *nifA*, так и штаммы у которых отсутствует совпадение филогений данного гена с коровой частью генома. Это свидетельствует об активном участии гена *nifA* в горизонтальном переносе среди клубеньковых бактерий.
2. Выявлено, что все исследованные штаммы ризобий при привнесении в них 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 генетические варианты гена *nifA* в разных штаммах ризобий показывают различные уровни проявления (появления азотфиксирующей активности), которые имеют большую зависимость от штамма бактерии-реципиента, нежели от его родовой принадлежности.
4. Показано, что полученные рекомбинантные штаммы клубеньковых бактерий обладают ростостимулирующим влиянием на культуры люцерны, гороха и ячменя.

Список публикаций по теме научно-квалификационной работы

Статьи в рецензируемых журналах

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.
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.
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.
4. Гуменко Р.С., **Владимирова А.А.**, Саргалиева Г.М., Симахина А.С., Зайнуллина Л.Ф., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ан.Х. Исследование конъюгативной активности клубеньковых бактерий с помощью маркирования штаммов флуоресцентными белками//Биомика. – 2017. – Т.9. –№1. – С.55-58.
5. Гуменко Р.С., Кашапова Г.М., **Владимирова А.А.**, Кагирова А.С., Баймиев Ан.Х. Генетическая регуляция азотфиксации у бактерий//Биомика. – 2017. – Т.9. – №4. –С. 340-344.

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» // Пушино. – 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 Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» // Пушино. – 2017. – С. 17.

4. Саргалиева Г.М., Владимирова А.А., Гуменко Р.С., Акимова Е.С., Баймиев Ан.Х. Использование флуоресцентных белков для детекции конъюгативного взаимодействия клубеньковых бактерий // В сборнике тезисов: 21-й Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» // Пушино. – 2017. – С. 40.

5. 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 // Пушино. – 2017. – С. 102-103.

6. 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.

7. **Владимирова А.А.**, Саргалиева Г.М., Гуменко Р.С., Акимова Е.С., Баймиев Ал.Х. Флуоресцентные белки как маркеры конъюгативного взаимодействия клубеньковых бактерий. 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.127.

8. 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.

9. **Владимирова А.А.**, Гуменко Р.С., Кашапова Г.М., Баймиев Ан.Х. Оценка конъюгативной активности у некоторых видов ризобий. В сборнике тезисов: Международной научной конференции «PLAMIC2018» // Уфа. – 2018. – С.114.

10. 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.

11. **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.

12. **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.