

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА *rosR* НА ОБРАЗОВАНИЕ
БИОПЛЕНОК БАКТЕРИЯМИ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM***

© 2021 г. З. Р. Вершинина^а, *, О. В. Чубукова^а, Ю. М. Никоноров^а, Л. Р. Хакимова^а,
А. М. Лавина^а, Л. Р. Каримова^а, Ан. Х. Баймиев^а, Ал. Х. Баймиев^а

^аИнститут биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального
исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450098 Россия

*e-mail: zilyaver@mail.ru

Поступила в редакцию 02.09.2020 г.

После доработки 20.11.2020 г.

Принята к публикации 30.11.2020 г.

Кодируемый геном *rosR* регуляторный белок участвует в процессах, связанных с адаптацией клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* к изменяющимся условиям окружающей среды. Он влияет на экспрессию многих генов, связанных с синтезом экзополисахаридов, которые играют критическую роль в формировании биопленок бактериями на различных поверхностях. Целью данной работы являлось изучение влияния сверхэкспрессии гена *rosR* у ризобий *R. leguminosarum* на образование биопленок на инертных поверхностях и корнях гетерологичных растений-макросимбионтов путем получения рекомбинантных вариантов штаммов с дополнительной копией гена *rosR* под управлением промотора Pm. Проведенный анализ рекомбинантных штаммов показал, что дополнительные экспрессируемые копии гена *rosR* позволяли ризобиям преодолевать ингибирующее воздействие на биопленкообразование низких концентраций кальция в среде, воздействие протеаз, детергентов и более эффективно формировать биопленки на поверхности корней томата и клевера. Полученные результаты открывают перспективы для использования *rosR* в качестве инструмента как для повышения эффективности эндосимбиоза ризобий с бобовыми растениями, так и для формирования устойчивых ассоциативных взаимодействий с другими сельскохозяйственными культурами.

Ключевые слова: *Rhizobium leguminosarum*, ген *rosR*, доза гена, биопленка, растительно-микробное взаимодействие, клевер, томат

DOI: 10.31857/S0026365621020154

Одним из наиболее изученных взаимодействий между растениями и микроорганизмами является бобово-ризобияльный симбиоз. Ризобии – это граммотрицательные бактерии, формирующие азотфиксирующие клубеньки на корнях бобовых растений. Симбиоз растений с этими бактериями играет значительную роль в круговороте азота в биосфере, а бобовые растения являются одними из самых важных сельскохозяйственных растений в мире. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* в природе вступает в симбиоз с растениями клевера (*Trifolium* spp.) (Корусиńska et al., 2018). В свободноживущем состоянии этот микросимбионт подвергается воздействию, в том числе и негативному, различных факторов окружающей среды. Чтобы приспособиться к изменяющимся условиям существования, ризобии выработали ряд эффективных стратегий защиты, которые позволяют им выживать в почве. Важнейшей адаптационной формой развития этих беспоровых бактерий является фор-

мирование биопленок на различных поверхностях (Rinaudi et al., 2006; Rachwał et al., 2017).

Биопленки служат для многих бактерий физическим барьером от токсичных соединений и защитой от неблагоприятных условий окружающей среды. Кроме того, для клубеньковых бактерий (ризобий) биопленкообразование является фактором, определяющим конкурентоспособность штаммов ризобий в почвенных условиях. В этом процессе немаловажную роль играют экзополисахариды (ЭПС), биосинтез и функции которых для *R. leguminosarum*, в отличие, например, от *Sinorhizobium meliloti*, изучены на сегодняшний день недостаточно. У *R. leguminosarum* основной набор генов биосинтеза ЭПС (более 20 генов) образует кластер Pss-I в хромосоме (González et al., 2006; Вершинина и соавт., 2020). Данные о регуляции биосинтеза ЭПС в *R. leguminosarum* очень фрагментарны. До сих пор было описано лишь несколько регуляторных генов, участвующих в

этом процессе. К ним относятся гены *psIA* и *psrA*, расположенные на симбиотической мегаплазмиде (pSym), и гены *exoR*, *pssB*, *rosR* и *expR*, расположенные на хромосоме *R. leguminosarum* (Reeve et al., 1996; Janczarek et al., 1999; Janczarek, Skorupska, 2007; Edwards et al., 2009).

Регуляторный белок, кодируемый геном *rosR*, необходим для адаптации *R. leguminosarum* к изменяющимся условиям окружающей среды. Этот белок влияет на экспрессию многих генов, связанных с синтезом ЭПС и поверхностных компонентов клеточной стенки ризобий, выделением внеклеточных белков и другими процессами. Было показано, что RosR, массой 15.7 кДа, содержит структурный мотив “цинковый палец” C₂H₂, ответственный за связывание с промоторными областями таких генов, как *exoB*, *exoR*, *prsD*, *pssA*, *pssB*, *pssK* и *plyA* (Janczarek, Skorupska, 2007; Jaszek et al., 2014; Rachwał et al., 2017). Продукт гена *rosR* *R. leguminosarum* bv. *trifolii* принадлежит к семейству регуляторов транскрипции Ros/MucR, которые участвуют в регуляции синтеза ЭПС у нескольких видов ризобий, включая *S. meliloti*, *Rhizobium etli* и *Agrobacterium tumefaciens* (D’Souza-Ault et al., 1993; Keller et al., 1995; Bittinger et al., 1997; Chou et al., 1998). Мутации в *rosR* и *mucR* влияют на образование биопленок как свободноживущих ризобий, так и на начальных этапах симбиоза с растениями-хозяевами. Так экспрессия гена *rosR* необходима *R. etli* не только для производства ЭПС, а также для колонизации и образования клубеньков на фасоли (*Phaseolus* spp.) (Bittinger et al., 1997). Мутантный по *rosR* штамм *R. leguminosarum* продуцирует значительно меньшее количество ЭПС, чем дикий тип, он более чувствителен к поверхностно-активным веществам (ПАВ), проявляет пониженную подвижность и образует не фиксирующие азот клубеньки на корнях клевера (Rachwał et al., 2015, 2016, 2017). Все эти данные свидетельствуют о том, что RosR является важным белком, участвующим в клеточных процессах на различных этапах становления и функционирования бобово-ризобиального симбиоза.

Целью данной работы являлось изучение влияния сверхэкспрессии *rosR* на образование биопленок рекомбинантными по данному гену штаммами *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* на инертных поверхностях и корнях гетерологичных растений макросимбионтов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы и растения. В качестве объектов были использованы штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSy12 и VSy3 из коллекции клубеньковых и ризосферных бактерий “Симбионт” ИБГ УФИЦ РАН, выделенные из клубеньков дикорастущего бобового растения Южного Урала горошка лесного (*Vicia sylvatica* L.). Бактерии культи-

вировали на среде YM (масс. % в водном растворе: маннитол – 1, дрожжевой экстракт – 0.04, NaCl – 0.01, MgSO₄ – 0.01, K₂HPO₄ · 3H₂O – 0.05) и RDM (Vincent, 1970) при оптимальной температуре 28°C.

Escherichia coli XL1-Blue выращивали на среде LB (масс. % в водном растворе: бактотриптон – 1, дрожжевой экстракт – 0.5, NaCl – 0.5) при температуре 37°C.

В качестве селективного антибиотика для трансформированных штаммов использовали ампициллин в конечной концентрации 100 мг/л (“Fisher scientific”, США). Экспрессию гена *rosR*, находящегося в составе плазмиды pJB658 под контролем индуцируемого промотора Pm, активировали 1 mM *m*-толуиловой кислотой (“Sigma Aldrich”, США).

В качестве макросимбионтов были выбраны клевер белый (*Trifolium repens* L.) сорта Ривендел (“DLF”, Дания) и томат сорта Грунтовый Грибовский 1180 (“СибНИИРС”, Россия). Выбор клевера белого был обусловлен тем, что фенотипические проявления штаммов, трансформированных дополнительной копией гена *rosR*, ранее изучались на растениях клевера. Это позволило провести сравнения активностей колонизации корней и образования биопленок полученных нами рекомбинантных штаммов с литературными данными. Выбор томата объясняется тем, что ранее была разработана система агробактериальной трансформации томата промышленного сорта Грунтовый Грибовский 1180 геном лектина гороха посевного *psl*, что позволило получить устойчивые корневые ассоциации этой важной для сельского хозяйства культуры с ризобиями, защищающими от фитопатогенных грибов (Вершинина и соавт., 2015). Кроме того, трансформация томата ризобиальным агглютинином RapA1 способствовала созданию эффективных симбиотических систем для фиторемедиации почв, загрязненных кадмием (Вершинина и соавт., 2019).

Получение генно-инженерной конструкции, несущей ген *rosR*, на основе вектора pJB658GFP. В рамках данного исследования были получены векторные конструкции на основе плазмиды широкого круга хозяев pJB658 с копийностью 5–7 на клетку (Blatny et al., 1997). В вектор pJB658 был клонирован ген зеленого флуоресцентного белка *gfp* под контролем конститутивного промотора T5. Для этого фрагмент ДНК, включающий промотор T5 и ген *gfp* был вырезан рестриктазой *Hind*III из полученного ранее вектора pJN105TurboGFP (Баймиев и соавт., 2011) и клонирован по аналогичному сайту в вектор pJB658 (рис. 1). Ризобии, трансформированные полученной плазмидой pJB658GFP, имели устойчивое зеленое окрашивание, что значительно облегчало отбор рекомбинантных штаммов и позво-

ляло отслеживать стабильность данной плазмиды в процессе культивирования бактерий.

Для секвенирования и амплификации полноразмерной последовательности гена *rosR* из *R. leguminosarum* VSy3 были использованы праймеры 5'-TACG-TACATATGACGGATATAGCGACCCGGCAA-3' (с сайтом для рестриктазы *NdeI*), 5'-TACGATGAAT-TCTTCGCACGTTCCCTGACTGGCT-3' (с сайтом для рестриктазы *EcoRI*). Праймеры были подобраны к последовательности ДНК *R. leguminosarum* bv. *trifoli* штамм 24.1. (AY683453.1). Последующее секвенирование показало идентичность генов *rosR* для изучаемых штаммов ризобий. Амплификация проводилась с помощью высокоточной термостабильной ДНК полимеразы Q5 ("NEB", Великобритания). Размер полученного амплификата составил 564 п.н., который включал полноразмерную последовательность гена *rosR* и 111 п.н. из 3'-нетранслируемой области. Затем плазмиду pJB658GFP и ПЦР продукт расщепляли соответствующими рестрикционными эндонуклеазами *NdeI* и *EcoRI* ("NEB", Великобритания) и лигировали фрагменты ДНК с помощью T4 ДНК лигазы ("NEB", Великобритания) (рис. 1). Таким образом, в плазмиду pJB658GFP был направлен клонирован ген *rosR* под регуляцией индуцируемого промотора Pm. Полученная конструкция была проверена секвенированием, и в дальнейшем ей были трансформированы путем электропорации штаммы *R. leguminosarum* VSy12 и VSy3.

Выделение бактериальной ДНК, подготовка компетентных клеток и их трансформация, а также электрофорез фрагментов ДНК проводились согласно (Sambrook et al., 1989).

Исследование уровня экспрессии гена *rosR* в контрольных и рекомбинантных штаммах методом ПЦР в реальном времени. РНК из бактерий выделяли с применением набора FastRNA Pro BlueKit ("MP Bio-medicals", США). Для активации экспрессии гена *rosR* культура клеток *R. leguminosarum* предварительно выращивалась в течение 1 сут на среде RDM с добавлением *m*-толуиловой кислоты (1 мМ) до OD₆₆₀ 0.9–1.0. Для построения кДНК использовали MMLV-ревертазу ("Евроген", Россия). Для постановки ПЦР в реальном времени использовали праймеры 5'-GTGGAAGTACAGCCGACATTG-3' и 5'-GTGACGCTTGAGGGACTTGAA-3'. В качестве референсного гена (*housekeeping*) был использован ген *recA*, кодирующий белок, необходимый для гомологичной рекомбинации, с праймерами 5'-GGC-GAGGGTGTTCCTCAAGAC-3' и 5'-GACGCTG-GCTGTTATAGGAGAAC-3' согласно исследованию (Rachwał et al., 2017). Для анализа относительного уровня экспрессии генов применяли 2-ΔΔCT метод (Livak, Schmittgen, 2001).

Анализ ризобияльных биопленок, формируемых на инертных поверхностях. Для получения биопленок использовали среды YM и RDM (Vincent,

1970) с применением 24-луночных пластиковых планшетов (полистирол) ("Corning Inc.", США). Для этого исходные и рекомбинантные штаммы *R. leguminosarum* выращивали 48 ч в жидкой среде на качалке при 28°C и 140 об./мин до концентрации 10⁸–10⁹ КОЕ/мл. Концентрация ризобий измерялась на спектрофотометре Benchmark Plus ("BioRad", США). Затем культуру разводили свежей средой до 10⁶ КОЕ/мл и переносили по 1 мл в лунки 24-луночного пластикового планшета. На данном этапе также добавляли ампициллин, индуктор *m*-толуиловую кислоту в случае трансформированных штаммов, а также хлорид кальция (Ca²⁺ 0–4.5 мМ) или додецилсульфат натрия (ДДС) (0.05%, об.) в экспериментах по влиянию Ca²⁺ и ДДС на относительное количество биомассы в биопленках. Планшеты герметизировали Parafilm ("Amcor", США) и инкубировали при температуре 18–37°C и 50 об./мин в течение 7 сут. После культивирования из лунок удаляли среду с планктонными клетками. Биопленки промывали 1 М фосфатносолевым буфером (PBS, pH 6.5), окрашивали 5 мин 0.1% об. раствором генциан фиолетового ("Агат-Мед", Россия) и осторожно промывали водой. Связавшийся с биомассой биопленки краситель растворяли в этаноле и измеряли оптическую плотность при длине волны 590 нм (O'Toole, Kolter, 1998). Оптическую плотность образцов измеряли с помощью прибора Enspire Model 2300 Multilabel Microplate Reader ("PerkinElmer", США).

Исследование влияния бактерий на ростовые параметры растений. Семена растений в течение 1 мин стерилизовали в 70% спирте, а после – 20 мин в 5% растворе гипохлорита натрия. Далее семена были обработаны трехсуточными культурами ризобий, которые предварительно выращивали на качалках в жидкой среде RDM (перед инокуляцией плотность суспензии ризобий была измерена на спектрофотометре и доведена до 10⁵ КОЕ/мл). Затем инокулированные семена раскладывали на влажную фильтровальную бумагу в чашки Петри. Часть семян оставили неинокулированными в качестве контроля. Неделю инкубировали при комнатной температуре и проводили расчет проросших и не проросших семян.

Для определения ростостимулирующего эффекта ризобактерий на корневую систему проростков измеряли длину корня опытных проростков и сравнивали с длиной контрольных проростков.

Исследование ростовых параметров и биомассы растений. Стерильные семена выращивали в течение 2 нед. в предварительно прокаленном вермикулите в условиях светоплощадки (освещение 5000 Лк, световой день 16 ч). После этого отмытые от вермикулита корни растений обрабатывали штаммами бактерий, которые выращивали до плотности OD₆₆₀ 0.75 при 28°C на среде RDM. Проростки

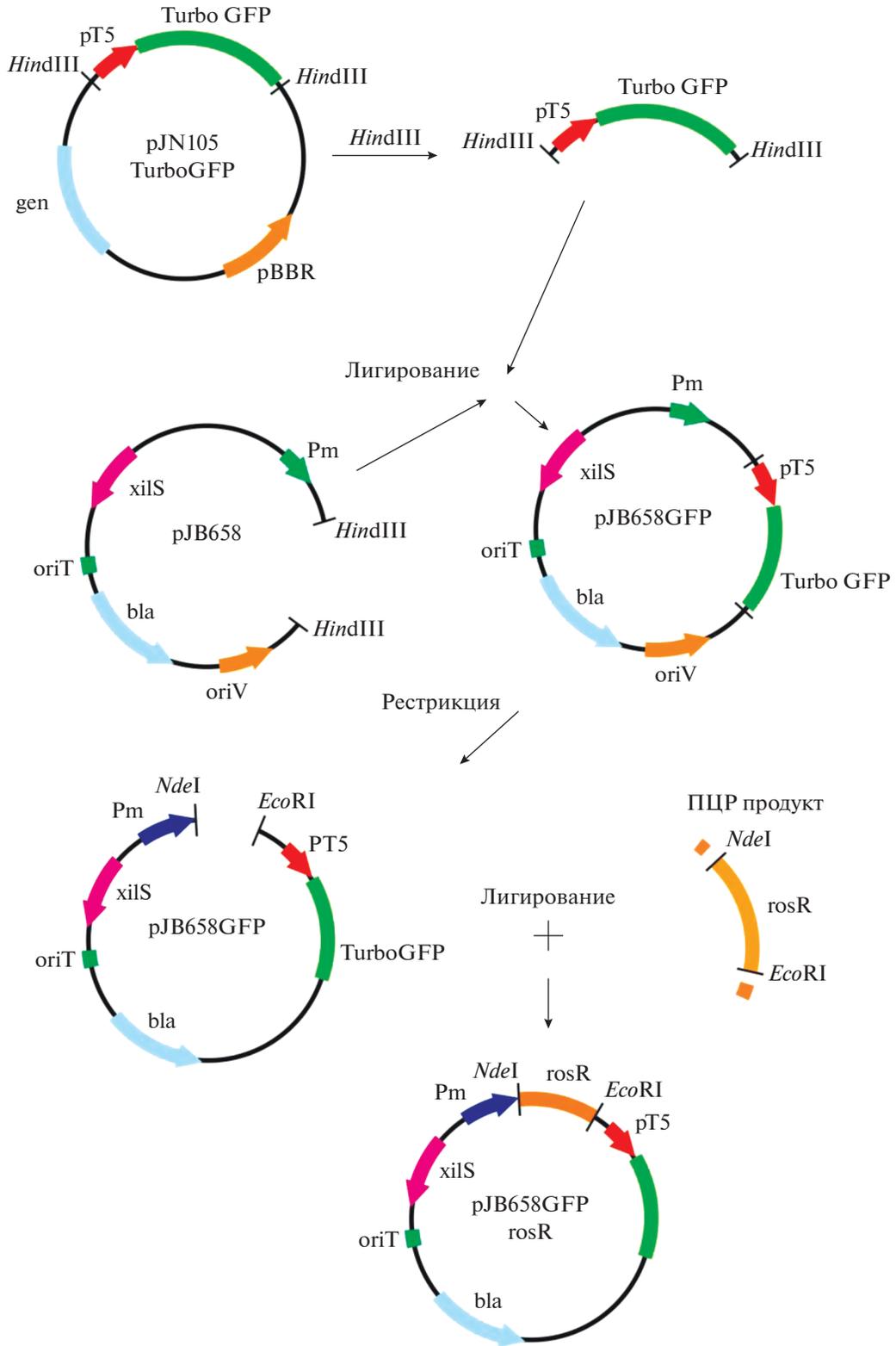


Рис. 1. Этапы получения генно-инженерных конструкций pJB658GFP и pJB658GFP-rosR для экспрессии генов *gfp* и *rosR* в клетках ризобий.

высаживали в торфяной грунт (“Terra Vita”, Россия), прогретый в течение 1 ч при 70°C, и культивировали в теплице. Ростовые параметры и биомассу определяли после роста растений в течение 1 мес. Для анализа использовали по 50 проростков.

Микроскопирование корней растений и обработка корней протеазами. Стерильные семена проращивали в течение 1 нед. на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Далее проростки выдерживали при покачивании (25 об./мин) в суспензии ризобий (10^5 КОЕ/мл) в 50 мМ PBS (рН 7.2). Для приготовления суспензий использовали двухсуточные культуры бактерий, выращенные в жидкой среде RDM и отмытые от PBS. Через 3 ч проростки промывали стерильным PBS и помещали в пробирки, содержащие 10 мл жидкой среды MS (Murashige, Skoog, 1962). Растения выращивали в стерильных условиях 3 сут при 25°C и естественном освещении. Затем проростки однократно отмывали стерильным PBS (5 мин при покачивании 25 об./мин) и корни нарезали на фрагменты длиной 10–15 мм для микроскопирования или обработки протеазами.

Пепсин (“Sigma-Aldrich”, США) растворяли в 10 мМ HCl до концентрации 10 мг/мл. Для эксперимента фермент разводили 1 : 1 дистиллированной водой, проводили через бактофильтр и выдерживали в этом растворе корни растений в течение 2 ч при 37°C. Для оценки количества адгезированных на корнях растений бактерий, фрагменты корней, предварительно взвесив, трижды отмывали стерильной водой по 5 мин на микрошейкере и гомогенизировали в 50 мкл среды RDM. Полученный объем разбавляли в 1000 раз и 50 мкл этой суспензии рассеивали на агаризованную RDM среду с ампициллином (100 мг/л) или без антибиотиков и выращивали в термостате при 28°C в течение 2 сут. Количество адгезированных бактерий определяли по числу выросших колоний.

Визуальное наблюдение меченых бактерий на корнях растений проводили на флуоресцентном микроскопе AxioImagerM1 (“CarlZeiss”, Германия).

Статистическая обработка результатов. На всех этапах исследования проводили не менее пяти независимых экспериментов как минимум в пяти повторностях. Результаты обрабатывали с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010, доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение трансформированных штаммов бактерий и ПЦР в реальном времени. Для контроль-

ных и рекомбинантных по гену *rosR* штаммов был исследован уровень экспрессии гена *rosR* в условиях индукции Pm промотора и без индуктора методом ПЦР в реальном времени. Было показано, что относительное содержание мРНК гена *rosR* превышает таковое в контрольных штаммах более чем в 5–7 раз даже в отсутствии индуктора (рис. 2а). Этот факт может объясняться в данном случае присутствием, так называемого эффекта “протекания”, т.е. неполным блокированием операторной области Pm промотора, в результате чего РНК-полимераза постоянно транскрибирует ген *rosR*, находящийся под контролем Pm промотора.

Отсутствие реакции на использование индуктора, выраженной в виде повышения экспрессии гена, требует дальнейшего изучения и может частично объясняться тем, что белок RosR распознает и связывается с мотивом RosR-box на хромосоме и негативно регулирует транскрипцию собственного гена *rosR* у изучаемых штаммов бактерий (Janczarek, Skorupska, 2007; Rachwał et al., 2017).

Подбор оптимальных условий для оценки эффективности биопленкообразования на инертных поверхностях. Была изучена эффективность образования биопленок дикими штаммами ризобий *R. leguminosarum* VSy12 и VSy3 и штаммами, трансформированных плазмидой pJBGFP_{rosR}, на инертных поверхностях: 24-луночных пластиковых планшетах и пластиковых чашках Петри на различных питательных средах. Для формирования биопленок использовались углеводные, безбелковые среды YM и RDM. Проведенные исследования показали, что как контрольные, так и трансформированные бактерии эффективно образовывали биопленки на инертных поверхностях в обеих средах. Однако относительное количество биомассы в биопленках диких и трансформированных штаммов ризобий при культивировании на среде RDM превышало соответствующие показатели на среде YM более чем в два раза (рис. 2б, 2в).

Ранее было показано, что ризобии эффективнее образуют биопленки при росте в бедной на питательные вещества среде RDM, а не в более богатых средах, таких как LB или TY (Fujishige et al., 2006). Для ризобий формирование биопленок является стратегией выживания в условиях ограниченного питания, поскольку подобная организация клеток обеспечивает ряд преимуществ, таких как, например, повышение концентрации необходимых для роста питательных веществ, которые могут поглощаться поверхностью биопленки (Wimpenny, Colasanti, 1997; Rinaudi et al., 2006).

В статье Janczarek et al. (2009) было обнаружено, что введение дополнительной копии гена *rosR*, клонированного в плазмиду pBBR1MCS-2 под управлением собственного промотора, значитель-

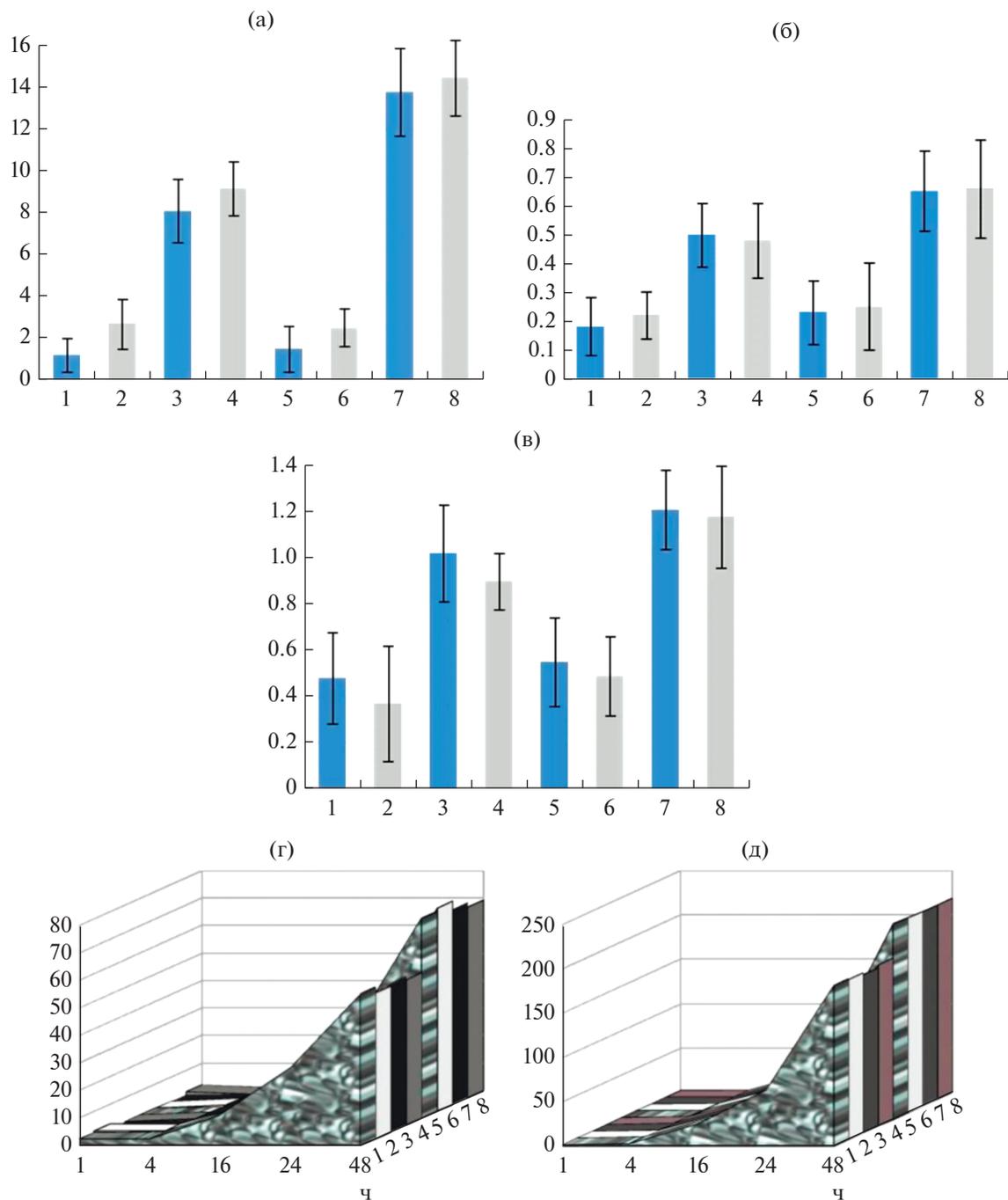


Рис. 2. (а) – Количественный ПЦР анализ уровня транскрипции гена *rosR*. По оси *Y* – условные единицы, обозначающие уровень транскрипции гена *rosR* в рекомбинантных штаммах относительно дикого штамма. (б, в) – Относительная биомасса биопленок исходных и трансформированных штаммов бактерий после 7 сут культивирования. По оси *Y* – оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок, образованных на пластиковых планшетах; (б) – среда YM; (в) – среда RDM. (г, д) – Скорость роста штаммов на разных питательных средах. По оси *Y* – 10^7 КОЕ/мл; (г) – среда YM; (д) – среда RDM. Обозначения штаммов *R. leguminosarum* (1–8): 1 – VSy3; 2 – VSy3 при воздействии индуктора; 3 – VSy3 (pJBGFPProR); 4 – VSy3 (pJBGFPProR) при воздействии индуктора; 5 – VSy12; 6 – VSy12 при воздействии индуктора; 7 – VSy12 (pJBGFPProR); 8 – VSy12 (pJBGFPProR) при воздействии индуктора.

но увеличивает скорость роста ризобий. В настоящей работе не было зафиксировано разницы в скорости роста между трансформированными и контрольными бактериями, что, возможно, объясняется особенностями использованных в экспериментах штаммов или конструкции pJB658GFP и требует дальнейшего изучения (рис. 2г, 2д).

Влияние содержания кальция в питательной среде и температуры на образование биопленок исходными и трансформированными штаммами бактерий. Проведенные исследования выявили, что эффективность образования биопленок напрямую зависит от концентрации кальция Ca^{2+} в культуральной среде. Было показано, что добавление в среду 4.5 мМ Ca^{2+} увеличивает относительное количество биомассы в биопленках на 80% в среде YM и на 65% в среде RDM (рис. 3а). В связи с этим в экспериментах с воздействием температурного режима была использована концентрация Ca^{2+} в среде 4.5 мМ. Проведенные исследования показали зависимость биопленкообразования штаммов *R. leguminosarum* VSy12 и VSy3 от температурных условий. Как контрольные, так и трансформированные бактерии эффективно образовывали биопленки при температуре 28°C. При культивировании в условиях более низкой температуры, способность штаммов формировать биопленки снижалась более чем в 2 раза. При повышении температуры до 38°C статистически значимых различий в эффективности формирования биопленок по сравнению со штаммами, выращенными при 28°C, найдено не было (рис. 3б).

Ранее было показано, что оптимальная концентрация Ca^{2+} для роста *S. meliloti* в RDM составляет 0.7 мМ (Flemming et al., 2000). Увеличение концентрации Ca^{2+} выше этого оптимума стимулировало биопленкообразование, незначительно ингибируя скорость размножения бактериальных клеток. Связано это с тем, что двухвалентные катионы, такие как Ca^{2+} и Mg^{2+} , неспецифически связываются с отрицательно заряженными группами полисахаридных цепей ЭПС, тем самым обеспечивая большую стабильность образуемой биопленки (Flemming et al., 2000). Известно, что у бактерий Ca^{2+} принимает непосредственное участие не только в формировании внешнего липополисахаридного слоя и клеточной стенки, но и во многих процессах клеточного цикла и деления. Полученные в настоящей работе результаты объясняются тем, что снижение скорости размножения клеток могло способствовать образованию биопленок, как ответ на стресс, или, наоборот, изначальное присутствие высокого уровня Ca^{2+} могло стабилизировать ЭПС, способствуя формированию “зрелой” биопленки (Smith, 1995; Rinaudi et al., 2006).

Одним из критически важных абиотических факторов как для размножения ризобий, так и для формирования биопленок является температура.

Для большинства ризобий оптимум роста находится между 28 и 31°C, и многие не растут при 37°C. Несмотря на то, что экстремальные температуры отрицательно влияют на рост и биопленкообразование, существуют работы, описывающие устойчивые к высоким температурам штаммы ризобий (Rinaudi et al., 2006). Изучение устойчивости ризобий к повышенным или пониженным температурам необходимо для подбора оптимальных микросимбионтов для растений, обитающих в зоне пустынь и тундр. Штаммы *R. leguminosarum*, использованные в настоящей работе, растут и эффективно образуют биопленки при 37°C, что в сочетании с их ростостимулирующим эффектом открывает дополнительные перспективы для применения этих микросимбионтов для производства биоудобрений.

Анализ эффективности использования генов, регулирующих биосинтез ЭПС, для изменения биопленкообразования ризобий. Проведенные исследования выявили, что трансформация штаммов *R. leguminosarum* VSy12 и VSy3 дополнительной копией гена *rosR* положительно влияет на эффективность образования биопленок. В экспериментах с трансформированными геном *rosR* штаммами относительное количество биомассы в биопленках увеличивалось в среднем в 1.4 раза по сравнению с контрольными штаммами (при 28°C и 4.5 мМ Ca^{2+} в среде). Полученные результаты также выявили, что использование индуктора Pm не влияет на этот показатель у трансформированных штаммов ризобий (рис. 2б, 2в, 3а–3в). Данный факт согласуется с результатами ПЦР в реальном времени, описанными выше (рис. 2а).

Ранее было показано, что дополнительные копии гена *rosR* увеличивают выработку ЭПС у *R. leguminosarum* bv. *trifolii* в 1.5–2 раза. Объясняется это тем, что RosR положительно регулирует экспрессию гена *pssA*, кодирующего ключевой фермент в синтезе ЭПС. При этом интересно, что увеличение копий гена *pssA* не несет столь же положительного эффекта на количество ЭПС, как дополнительные копии гена *rosR* (Bittinger et al., 1997; Janczarek, Skorupska, 2007; Janczarek et al., 2009).

Анализ устойчивости исследуемых штаммов к ДДС показал, что данный детергент практически не влияет на образование биопленок трансформированными штаммами, хотя в случае контрольных штаммов относительное количество биомассы в биопленках уменьшалось в среднем в 2 раза (рис. 3в). Ранее было показано, что мутации в гене *rosR* приводят к повышенной чувствительности штаммов к воздействию детергентов, гипер- и гипосмотического стресса и бета-лактамных антибиотиков. Связано это, по всей видимости, с тем, что RosR регулирует синтез белков, участвующих в формировании клеточной мембраны. К таким белкам у

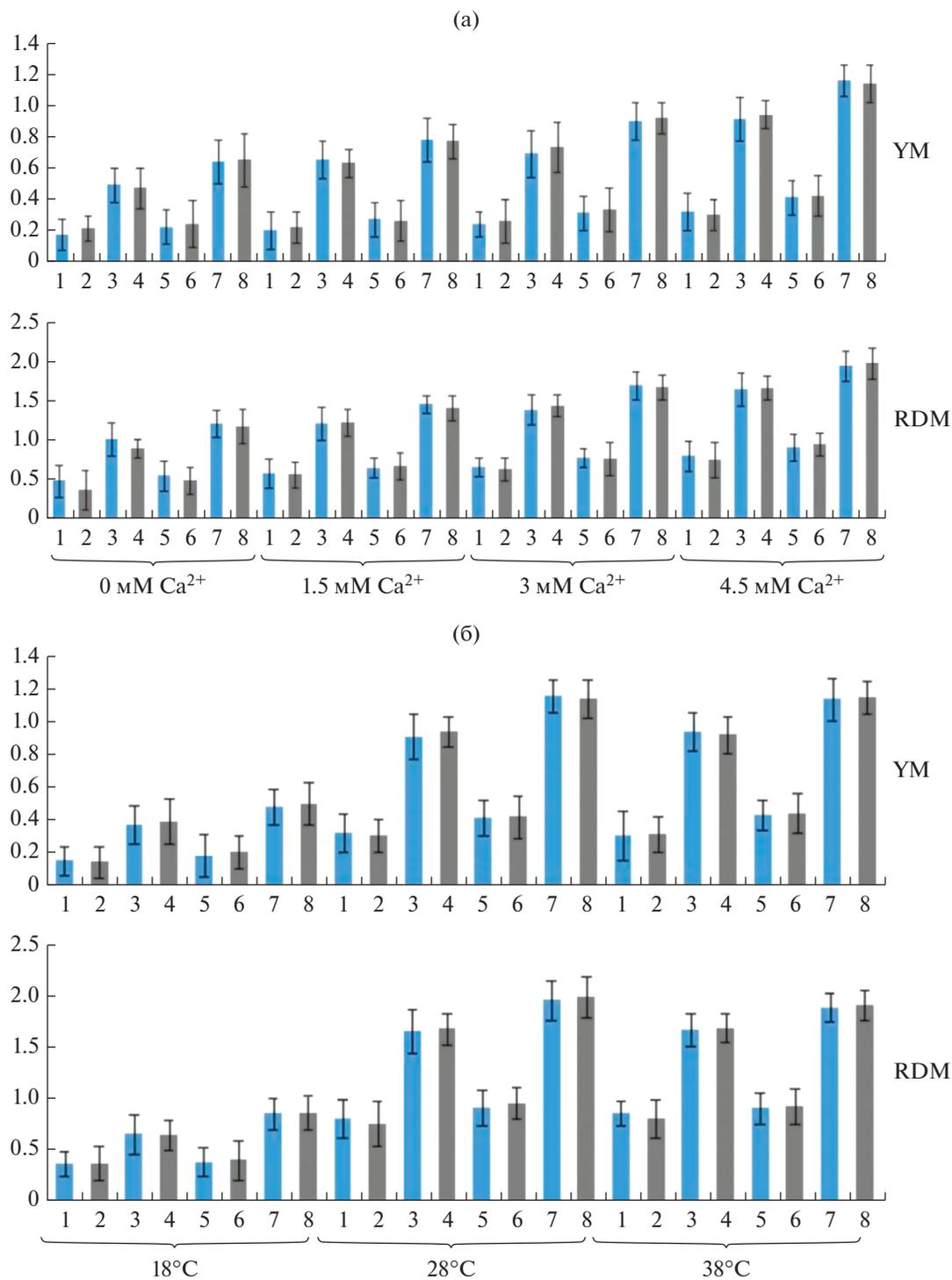


Рис. 3. Относительная биомасса биопленок исходных и трансформированных штаммов бактерий после 7 сут культивирования при 28°C в зависимости от: (а) – содержания Ca^{2+} (мМ) в среде; (б) – температуры (°C); (в) – ДДС (об. %). По оси Y – оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок, образованных на пластиковых планшетах. Обозначения штаммов *R. leguminosarum* (1–8) – как на рис. 2.

R. leguminosarum, например, относится RopA, RopA1 и RopB1. Экспрессия данных белков значительно снижается в мутантных по гену *rosR* штаммах (Janczarek et al., 2010).

Анализ уровня колонизации корней и образования биопленок, в том числе при воздействии протеаз. Штаммами *R. leguminosarum* VSy12 и VSy3, контрольными и трансформированными pJBGFP RosR ,

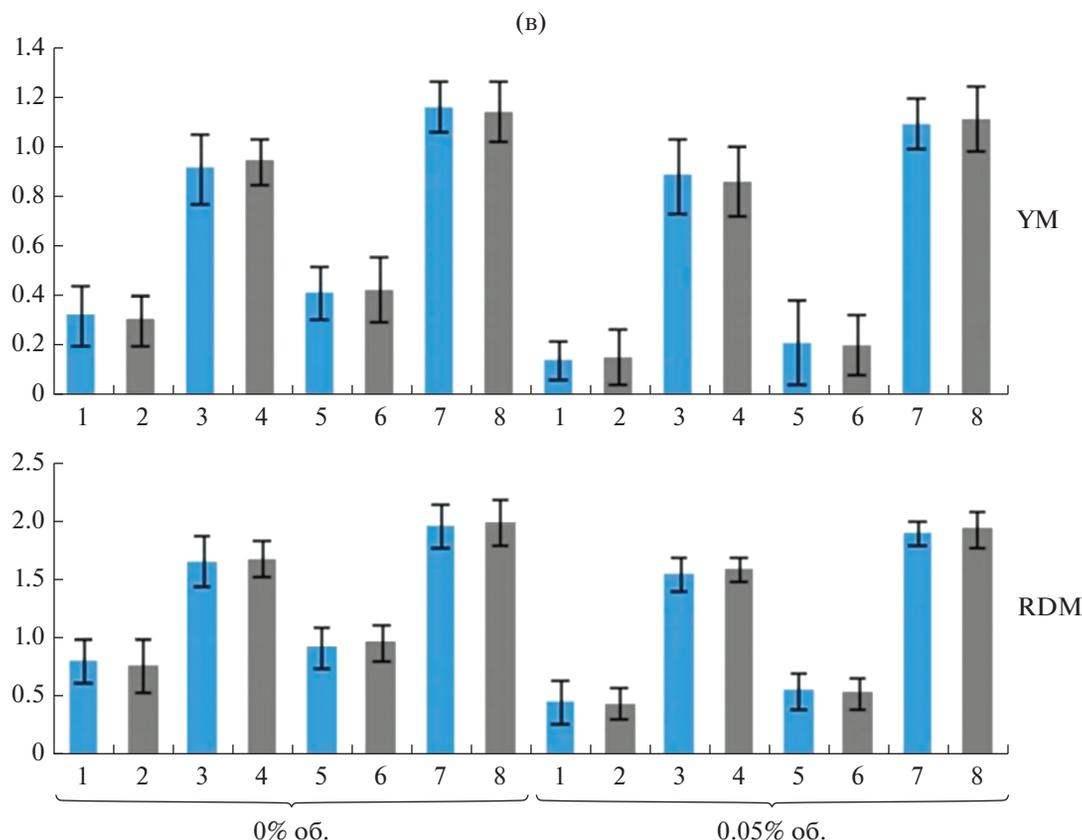


Рис. 3. Окончание

были обработаны растения клевера лугового. Было показано, что трансформация не оказывает существенного влияния на прорастание семян (рис. 4а), ростовые параметры (рис. 4б) и биомассу растений (рис. 4в) — разница с дикими типами штаммов не имела достоверных различий.

Анализ уровня колонизации корней после 7 сут совместного культивирования показал незначительное увеличение “заякорившихся” на корнях бактерий в случае трансформированных штаммов по сравнению с контрольными штаммами (рис. 5а). При этом через 3–4 сут микроскопирование выявило образование на корнях клевера и томата бактериальных агломераций и микроколоний преимущественно для трансформированных штаммов (рис. 5б). Также было показано, что штамм VSy12 образует биопленки преимущественно на поверхности корней растений, в отличие от VSy3, сродство которого выше к корневым волоскам (рис. 5в). Эксперимент по обработке протеазами выявил повышение устойчивости клеточных агломераций в случае трансформированных штаммов по сравнению с контрольными штаммами в среднем на 30% (рис. 5г).

Способность ризобияльных клеток прикрепляться к поверхности корней растений-макро-

симбионтов является критическим фактором взаимодействия, и ЭПС ризобий вносят существенный вклад в бактериальную адгезию (Rinaudi, Gonzalez, 2009). Ранее было показано, что трансформация *R. leguminosarum* bv. *trifolii* дополнительными копиями гена *rosR* приводит к повышению конкурентоспособности рекомбинантных ризобий по сравнению с дикими штаммами, почти в два раза (Bittinger et al., 1997; Janczarek, Skorupska, 2007; Janczarek et al., 2009). Мутантные по гену *rosR* штаммы образовывали значительно меньше клубеньков на корнях клевера красного; в отличие от диких штаммов, для них были характерны различные дефекты в образовании и развитии инфекционных нитей и низкая колонизация поверхности корня (Janczarek et al., 2010). Кроме очевидного влияния на выработку ЭПС ризобиями, полученные данные указывают на активацию белком RosR экспрессии ряда генов, непосредственно связанных с симбиозом (Janczarek, Skorupska, 2011). Немаловажным является и тот факт, что ЭПС играет защитную роль на ранних и поздних стадиях симбиотических взаимодействий, когда ризобии подвергаются окислительному стрессу со стороны растений-хозяев (Santos et al., 2001; Janczarek et al., 2009).

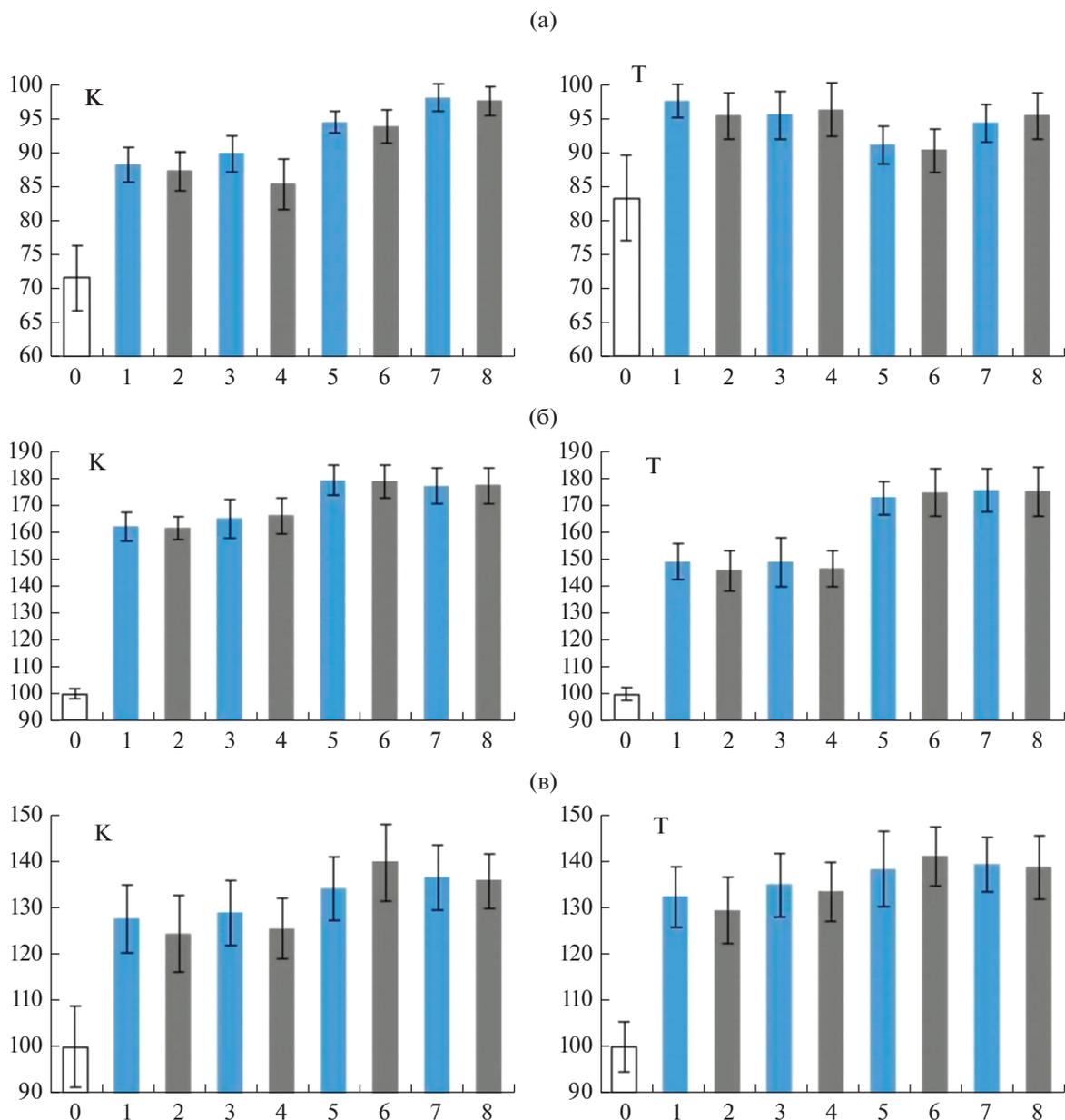


Рис. 4. Влияние исходных и трансформированных штаммов ризобий на: (а) – всхожесть семян растений (по оси ординат число проросших семян из 100 шт.); (б) – рост корней растений (по оси ординат изменение длины корней в %); (в) – биомассу растений (по оси ординат изменение сухой биомассы растений в %). К – клевер, Т – томат, 0 – без обработки бактериями. Обозначения штаммов *R. leguminosarum* (1–8) – как на рис. 2.

Таким образом, в данной работе впервые была получена генно-инженерная конструкция для экспрессии дополнительных копий гена *rosR* под управлением промотора P_{тм} и изучена способность к симбиозу, в том числе и к ассоциативному, у трансформированных полученной плазмидой штаммов ризобий. Было показано, что клубеньковые бактерии с дополнительными копиями гена *rosR* отличались более эффективным образованием биопленок и обладали значительно большей способностью прилипать к различным поверхно-

стям, включая абиотические поверхности и корни макросимбионтов. Более того, было обнаружено, что повышенная экспрессия гена *rosR* и опосредованное им усиленное образование биопленок может защитить эти бактерии от протеаз, детергентов, а также способствовать выживанию ризобий при низком содержании питательных веществ в окружающей среде. Вследствие этого, использование генов, участвующих в образовании ЭПС ризобиями, в качестве трансгенов имеет перспективы не только для создания эффек-

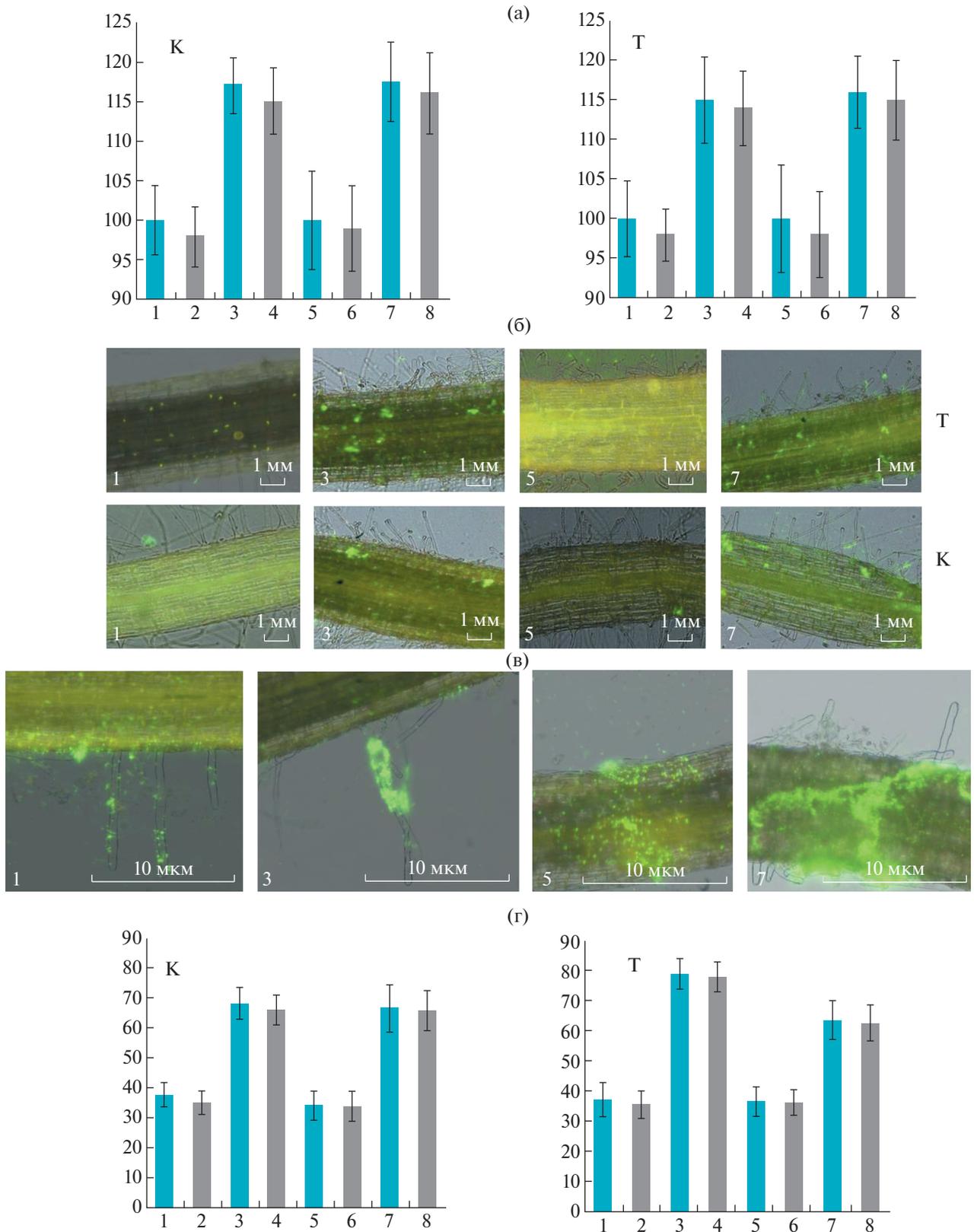


Рис. 5. Анализ колонизации корней бактериями после инокуляции исходными и трансформированными штаммами: (а) – число бактерий, “заякорившихся” на корнях (по оси ординат изменение числа бактерий в %); (б) – агглютинация штаммов на поверхности корней растений через 4 дня совместного культивирования; (в) – образование биопленок на поверхности корней растений томата через 7 дней совместного культивирования; (г) – анализ количества бактерий на корнях растений после обработки пепсином (по оси ординат изменение числа бактерий в % от исходного количества до обработки ферментом). К – клевер, Т – томат. Обозначения штаммов *R. leguminosarum* (1–8) – как на рис. 2.

тивных биоудобрений для бобовых растений, но и для конструирования ассоциативных взаимодействий ризобий с небобовыми растениями, которые могут найти применение в сельском хозяйстве и биоремедиации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена с привлечением приборного парка РЦКП «Агидель» УФИЦ РАН в рамках госзадания (тема № АААА-А16-116020350028-4) при финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований 18-34-20004 мол_а_вед.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баймиев Ан.Х., Ямиданов Р.С., Матниязов Р.Т., Благова Д.К., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Получение флуоресцентно меченых штаммов клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых для их детекции *in vivo* и *in vitro* // Мол. биология. 2011. Т. 45. С. 984–991.
- Baymiev A.K., Yamidanov R.S., Matniyazov R.T., Blagova D.K., Chemeris A.V. Preparation of fluorescent labeled nodule bacteria strains of wild legumes for their detection *in vivo* and *in vitro* // Mol. Biol. (Moscow). 2011. V. 45. С. 904–910.
- Вершинина З.Р., Благова Д.К., Нигматуллина Л.Р., Лавина А.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Ассоциативный симбиоз трансгенных томатов с ризобиями повышает устойчивость растений к *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* // Биотехнология. 2015. Т. 31. № 3. С. 42–53.
- Вершинина З.Р., Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Каримова Л.Р., Федяев В.В., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х. Взаимодействие томатов (*Solanum lycopersicum* L.), трансформированных *gpaI*, с бактериями *Pseudomonas* sp. 102, устойчивыми к высоким концентрациям кадмия, как основа эффективной симбиотической системы для фиторемедиации // Биотехнология. 2019. Т. 35. № 2. С. 38–48.
- Вершинина З.Р., Лавина А.М., Чубукова О.В. Экзополисахариды *Rhizobium leguminosarum* – краткий обзор // Биомика. 2020. Т. 12. С. 27–49.
- Bittinger M.A., Milner J.L., Saville B.J., Handelsman J. *RosR*, a determinant of nodulation competitiveness in *Rhizobium etli* // Mol. Plant-Microbe Interact. 1997. V. 10. P. 180–186.
- Blatny J.M., Brautaset T., Winther-Larsen H.C., Karunakaran P., Valla S. Improved broad-host-range RK2 vectors useful for high and low regulated gene expression levels in gram-negative bacteria // Plasmid. 1997. V. 38. P. 35–51.
- Chou A.Y., Archdeacon J., Kado C.I. Agrobacterium transcriptional regulator *Ros* is a prokaryotic zinc finger protein that regulates the plant oncogene *ipt* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 5293–5298.
- D'Souza-Ault M.R., Cooley M.B., Kado C.I. Analysis of the *Ros* repressor of *Agrobacterium virC* and *virD* operons: molecular intercommunication between plasmid and chromosomal genes // J. Bacteriol. 1993. V. 175. P. 3486–3490.
- Fleming H.C., Wingender J., Griegbe T., Mayer C. Physicochemical properties of biofilms // Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control / Ed. Evans L.V. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000. P. 19–34.
- Fujishige N.A., Kapadia N.N., DeHoff P.L., Hirsch A.M. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation // FEMS Microbiol. Ecol. 2006. V. 56. P. 195–206.
- González V., Santamaría R.I., Bustos P., Hernández-González I., Medrano-Soto A., Moreno-Hagelsieb G., Chandra Janga S., Ramírez M.A., Jiménez-Jacinto V., Collado-Vides J., Dávila G. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 3834–3839.
- Janczarek M., Krol J., Skorupska A. The *pssB* gene product of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is homologous to a family of inositol monophosphatases // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 173. P. 319–325.
- Janczarek M., Skorupska A. The *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *RosR*: transcriptional regulator involved in exopolysaccharide production // Mol. Plant-Microbe Interact. 2007. V. 20. P. 867–881.
- Janczarek M., Jaroszkuk-Ścisiek J., Skorupska A. Multiple copies of *rosR* and *pssA* genes enhance exopolysaccharide production, symbiotic competitiveness and clover nodulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* // Antonie van Leeuwenhoek. 2009. V. 96. P. 471–486.
- Janczarek M., Kutkowska J., Piersiak T., Skorupska A. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* is required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment // BMC Microbiol. 2010. V. 10. P. 284.
- Janczarek M., Skorupska A. Modulation of *rosR* expression and exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* by phosphate and clover root exudates // Int. J. Mol. Sci. 2011. V. 12. P. 4132–4155.
- Jaszek M., Janczarek M., Kuczyński K., Piersiak T., Grzywnowicz K. The response of the *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* wild-type and exopolysaccharide-deficient mutants to oxidative stress // Plant and Soil. 2014. V. 376. P. 75–94.
- Keller M., Roxlau A., Weng W.M., Schmidt M., Quandt J., Niehaus K., Jording D., Arnold W., Pühler A. Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti mucR* gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan // Mol. Plant-Microbe Interact. 1995. V. 8. P. 267–277.
- Kopycińska M., Lipa P., Cieślak J., Kozieł M., Janczarek M. Extracellular polysaccharide protects *Rhizobium leguminosarum* cells against zinc stress *in vitro* and during symbiosis with clover // Environ. Microbiol. Rep. 2018. V. 10. P. 355–368.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473–497.

- O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis // *Mol. Microbiol.* 1998. V. 28. P. 449–461.
- Rachwał K., Matczyńska E., Janczarek M. Transcriptome profiling of a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* mutant reveals the role of the transcriptional regulator RosR in motility, synthesis of cell-surface components, and other cellular processes // *BMC Genomics.* 2015. V. 16. Art. 1111. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2332-4>
- Rachwał K., Boguszewska A., Kopcińska J., Karas M., Tchorzewski M., Janczarek M. The regulatory protein RosR affects *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* protein profiles, cell surface properties, and symbiosis with clover // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Art. 1302. P. 1–21.
- Rachwał K., Lipa P., Wojda I., Vinardell J.M., Janczarek M. Regulatory elements located in the upstream region of the *Rhizobium leguminosarum* *rosR* global regulator are essential for its transcription and mRNA stability // *Genes.* 2017. V. 8. Art. 388.
- Reeve W.G., Dilworth M.J., Tiwari R.P., Glenn A.R. Regulation of exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* WSM710 involves *exoR* // *Microbiology (SGM).* 1996. V. 143. P. 1951–1958.
- Rinaudi L., Fujishige N.A., Hirsch A.M., Banchio E., Zorreguieta A., Giordano W. Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation // *Res. Microbiol.* 2006. V. 157. P. 867–875.
- Rinaudi L.V., Gonzalez J.E. The low-molecular-weight fraction of exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* is a crucial determinant of biofilm formation // *J. Bacteriol.* 2009. V. 191. P. 7216–7224.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
- Santos R., Herouart D., Sigaud S., Touati D., Puppo A. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2001. V. 14. P. 86–89.
- Smith R.J. Calcium and bacteria // *Adv. Microb. Physiol.* 1995. V. 37. P. 83–133.
- Vincent J.M. *A manual for practical study of root nodule bacteria.* IBP Handbook No. 15. Oxford: Blackwell Scientific Publishers, 1970. 164 p.
- Wimpenny J.W.T., Colasanti R.A. A unifying hypothesis for the structure of microbial films based on cellular automation models // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1997. V. 22. P. 1–16.

Effect of the *rosR* Gene Overexpression on Biofilm Formation by *Rhizobium leguminosarum*

Z. R. Vershinina^{1,*}, O. V. Chubukova¹, Yu. M. Nikonorov¹, L. R. Khakimova¹, A. M. Lavina¹, L. R. Karimova¹, An. Kh. Baimiev¹, and Al. Kh. Baimiev¹

¹*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450098 Russia*

*e-mail: zilyaver@mail.ru

Received September 2, 2020; revised November 20, 2020; accepted November 30, 2020

Abstract—The regulatory protein encoded by the *rosR* gene is involved in the processes of adaptation of root nodule bacteria *Rhizobium leguminosarum* to changes in environmental conditions. It affects the expression of a number of genes associated with the synthesis of exopolysaccharides, which play a critical role in formation of bacterial biofilms on various surfaces. The goal of this work was to study the effect of overexpression of the *rosR* gene on formation of *R. leguminosarum* biofilms on inert surfaces and roots of heterologous plant hosts by obtaining recombinant strains with an additional copy of the *rosR* gene under the control of the Pm promoter. Our analysis of recombinant strains showed that additional expressed copies of the *rosR* gene allowed rhizobia to overcome the inhibitory effect on biofilm formation of low calcium concentrations in the medium, the effect of proteases and detergents, and to form biofilms more efficiently on the surface of tomato and clover roots. The results obtained open up prospects for using *rosR* as a tool both for increasing the efficiency of endosymbiosis of rhizobia with legumes, and for the formation of stable associative interactions with other agricultural crops.

Keywords: *Rhizobium leguminosarum*, *rosR* gene, gene dosage, biofilm, plant–microbe interaction, clover, tomato