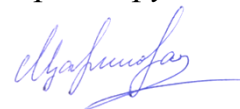


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Цавкелова Елена Аркадьевна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ
МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ЭПИФИТНЫХ ОРХИДЕЙ:
БИОРАЗНООБРАЗИЕ, РОЛЬ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ
ЗНАЧИМОСТЬ АССОЦИАТИВНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

03.02.03 – микробиология

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научные консультанты:

д.б.н., профессор А.И. Нетрусов

д.б.н., профессор П.А. Кожевин

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
Актуальность исследования	5
ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ.....	9
ОБЪЕКТ И ПРЕДМЕТ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	10
НАУЧНАЯ НОВИЗНА	10
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ	12
МЕТОДОЛОГИЯ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	16
ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ	17
СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	18
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	20
1.1. Особенности растений семейства Orchidaceae Juss.....	20
1.1.1. Практическое использование орхидей.....	21
1.1.2. Особенности строения и биотических связей орхидей.....	23
1.1.3. Некоторые особенности вегетативных органов орхидных.....	26
1.1.4. Размножение орхидей и сохранение их генофонда.....	32
1.1.4.1. Асимбиотическое проращивание семян орхидей <i>in vitro</i>	35
1.1.4.2. Микориза орхидных	43
1.2. Микромитеты, ассоциированные с орхидными.....	49
1.3. Разнообразие и роль бактерий, вступающих в ассоциативные отношения с растениями	55
1.3.1. Цианобактерии.....	57
1.3.1.1. Цианобактерии – партнёры и симбионты растений.....	61
1.3.2. Ассоциативные бактерии и свойства PGPB (plant growth-promoting bacteria).....	65
1.4. Фитогормоны и гормоноподобные соединения, образуемые микроорганизмами.....	76
1.4.1 Ауксины.....	77
1.4.1.1. Регуляция биосинтеза ИУК у микроорганизмов. ИУК - сигнальная молекула.....	87
1.4.2. Гиббереллины.....	90
1.4.2.1. Распространение способности к биосинтезу гиббереллинов среди микроорганизмов.....	95
1.4.2.2. Биосинтез гиббереллинов у бактерий.....	100
1.4.3. Цитокинины.....	107
1.4.4. Другие микробные фитогормоны и гормоноподобные соединения.....	113
1.4.4.1. Абсцизовая кислота (АБК).....	114
1.4.4.2. Этилен.....	118
1.4.4.3. Соединения с гормональной активностью.....	121
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	130
2.1. Растения – объекты исследования.....	130
2.1.1. Отбор образцов корней и листьев растений.....	139
2.2. Микроорганизмы – объекты исследования.....	140
2.2.1. Выделение культивируемых бактерий ризопланы и филлопланы орхидных.....	140
2.2.1.1. Другие культуры гетеротрофных бактерий, использованные в исследованиях.....	141

2.2.1.2. Определение биомассы и количества жизнеспособных бактериальных клеток.....	142
2.2.2. Выделение ассоциативных цианобактерий.....	143
2.2.3. Выделение ассоциативных микромицетов.....	143
2.2.4. Хранение микроорганизмов.....	144
2.3. Идентификация микроорганизмов.....	145
2.3.1. Идентификация бактерий.....	145
2.3.1.1. Идентификация штамма <i>Klebsiella</i> sp.....	147
2.3.2. Профилирование бактериального сообщества <i>Dendrobium moschatum</i>	148
2.3.3. Идентификация цианобактерий.....	150
2.3.4. Идентификация микромицетов.....	151
2.4. Методы микроскопии.....	153
2.4.1. Световая микроскопия.....	153
2.4.2. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) и флуоресцентная микроскопия.....	154
2.4.3. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).....	155
2.4.4. Трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия.....	156
2.5. Оценка прямой рост-стимулирующей активности микроорганизмов.....	156
2.5.1. Колориметрическое определение содержания индольных веществ (ауксинов) в культуральной жидкости микроорганизмов.....	156
2.5.2. Тонкослойная хроматография микробных фитогормонов.....	157
2.5.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	159
2.6. Определение природы бактериального матрикса.....	161
2.7. Молекулярно-генетические методы исследования механизмов биосинтеза фитогормонов микромицетами.....	162
2.7.1. Изучение наличия кластера генов, ответственных за биосинтез гибберелловых кислот.....	162
2.7.2. Идентификация генов, ответственных за биосинтез ИУК по индолил-3-ацетамидному пути.....	165
2.7.2.1. Оценка энзиматической активности.....	167
2.8. Биоразложение целлюлозосодержащих субстратов <i>Trichoderma viride</i>	167
2.9. Биоразложение биомассы цианобактерий микробным сообществом.....	170
2.10. Биотесты с растениями.....	171
2.10.1. Влияния ауксина на удлинение coleoptилей пшеницы.....	172
2.10.2. Влияние ауксина на корнеобразование черенков фасоли.....	172
2.10.3. Влияние гибберелловых кислот на рост гипокотилей салата.....	173
2.10.4. Влияние цитокининов на задержку пожелтения фрагментов листьев пшеницы.....	173
2.10.5. Определение влияния микромицетов рода <i>Fusarium</i> на развитие <i>Dendrobium moschatum</i> и <i>D. nobile</i>	174
2.10.6. Определение антимикробной активности фитоэкстрактов <i>D. moschatum</i>	174
2.11. Биотехнологический подход к семенному проращиванию орхидей <i>in vitro</i> в ко-культуре с бактериями, стимулирующими рост орхидей.....	175
2.11.1. Бактеризация семян и влияние ризобактерий на их проращивание.....	175
2.11.2. Изучение колонизирующей способности PGPR-штаммов <i>Pseudomonas fluorescens</i> и <i>Klebsiella oxytoca</i> на примере <i>Dendrobium nobile</i>	177
2.12. Состав питательных сред для культивирования микроорганизмов.....	179
2.13. Математическая обработка результатов.....	180
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	181
3.1. Локализация ассоциативных микроорганизмов в ризоплане и филлоплане эпифитных орхидных.....	181

3.1.1. Локализация микроорганизмов на корнях безлистных орхидей.....	188
3.1.2. Локализация микроорганизмов в филлоплане орхидей.....	196
3.2. Выделение и идентификация ассоциативных микроорганизмов эпифитных орхидей.....	202
3.2.1. Ассоциативные цианобактерии облиственных и безлистных орхидей.....	202
3.2.2. Ассоциативные грибы облиственных эпифитных орхидей.....	210
3.2.2.1. Микромицеты оранжевых орхидей.....	211
3.2.2.2. Грибы, ассоциированные с дикорастущими облиственными тропическими орхидеями.....	218
3.2.2.3. Взаимодействие изолята <i>F. proliferatum</i> ET1 с эпифитными орхидеями из рода <i>Dendrobium</i>	222
3.2.3. Потенциальные биотехнологические свойства некоторых ассоциативных микроорганизмов	227
3.2.3.1. Биоразложение мортмассы цианобактерий с образованием биогаза.....	227
3.2.3.2. Целлюлозолитическая активность <i>Trichoderma viride</i>	230
3.2.3.3. Предобработка целлюлозосодержащих субстратов для получения биогаза.....	234
3.2.4. Ассоциативные бактерии ризопланы облиственных эпифитных орхидей.....	236
3.2.4.1. Идентификация ассоциативных бактерий ризопланы	240
3.2.5. Ассоциативные бактерии филлопланы эпифитных орхидей.....	259
3.3. Микробный биосинтез стимуляторов роста растений.....	271
3.3.1. Биосинтез ауксинов цианобактериями.....	272
3.3.2. Биосинтез фитогормонов ассоциативными микромицетами.....	273
3.3.2.1. Биосинтез ауксинов <i>Fusarium proliferatum</i> ET1.....	275
3.3.2.2. Биосинтез гиббереллинов <i>Fusarium proliferatum</i> ET1.....	290
3.3.2.3. Биосинтез гиббереллинов трансформантами <i>Fusarium oxysporum</i>	296
3.3.3. Биосинтез ауксинов ассоциативными бактериями орхидей.....	303
3.3.3.1. Идентификация индольных соединений.....	312
3.3.3.2. Биосинтез индольных соединений ассоциативными микроорганизмами филлопланы.....	314
3.3.4. Определение биологической активности микробной ИУК.....	318
3.4. Потенциальные факторы микробно-растительных взаимодействий.....	321
3.4.1. Влияние экзогенной ИУК на развитие популяций ризобактерий.....	321
3.4.2. Антимикробные свойства <i>Dendrobium moschatum</i>	324
3.5. Использование бактерий для семенного проращивания орхидей.....	332
3.5.1. Стратегия колонизации орхидей на примере <i>Klebsiella oxytoca</i> и <i>Pseudomonas fluorescens</i>	348
3.5.1.1. Биосинтез ИУК культурами <i>P. fluorescens</i> 32-gfp и <i>K. oxytoca</i> TSKhA-gfp.....	353
3.5.1.2. Бактеризация семян <i>Dendrobium nobile</i> культурами <i>P. fluorescens</i> 32-gfp и <i>K. oxytoca</i> TSKhA-gfp.....	359
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	363
ВЫВОДЫ	375
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	378
БЛАГОДАРНОСТИ	432

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Орхидные (Orchidaceae) – одно из крупнейших семейств растений, объединяющее более 27 000 видов, интерес к которым определяется структурным и функциональным разнообразием их существующих форм, уникальными особенностями биологии и экологической стратегии, а также выраженной зависимостью от других живых организмов на различных стадиях своего развития. Эпифитные орхидеи по таксономическому биоразнообразию значительно преобладают над наземными видами, на долю которых приходится лишь 25-30%. Отличительной особенностью эпифитных орхидей является наличие у них не только субстратных, но и воздушных корней, покрытых многослойным гигроскопичным веламеном. Таким образом, одна эпифитная орхидея в отличие от большинства других растений формирует два сайта (очага) микробной активности ризопланы своих корней, находящихся в различных условиях по наличию и доступности питательных веществ, а также воздействию биотических и абиотических факторов. Уникальность этих растений дополняется тем, что многие эпифитные орхидеи известны не только своей высокой декоративностью, но и ярко-выраженными лекарственными свойствами благодаря наличию разнообразных биологически-активных соединений, включая алкалоиды, танины, флавоноиды, терпены и фенольные соединения, которые могут оказывать антифунгальное и антибактериальное действие (Delaquis et al., 2005; Sattayasai et al., 2009; Буюн и др., 2016).

В последнее время возрос интерес к изучению ассоциативных, в том числе эндофитных, микроорганизмов именно у растений, произрастающих в экстремальных условиях или толерантных к стрессовым условиям окружающей среды, связанным с температурой, водным статусом и высокой минерализацией (Zinniel et al., 2002; Nair and Padmavathy, 2014; Yuan et al., 2016; Манучарова и др., 2011; Добровольская и др., 2018). Подавляющее число микроорганизмов, заселяющих ризосферу таких растений, зачастую относится к группе PGPB (plant growth-promoting bacteria – бактерии, стимулирующие рост растений) и предоставляют растениям множественную перекрёстную защиту против различных стресс-факторов и увеличивают их резистентность и продуктивность. Фитомикробиом таких растений также отличает развитые эволюционные адаптации, связанные с более жёсткой реакцией на стресс своих растений-хозяев, в отличие, например, от микробных сообществ почв или ризосферы наземных растений.

Выделение и изучение функциональной активности таких ризобактерий является ориентиром для фундаментальных и прикладных исследований при использовании

штаммов или продуктов их метаболизма, направленных, прежде всего, на развитие устойчивого сельского хозяйства. Другой стратегией современных исследований является поиск продуцентов различных вторичных метаболитов, в том числе новых антибиотиков, среди RGPB, заселяющих стресс-толерантные и лекарственные растения. Большинство эпифитных орхидей сочетают все вышеперечисленные признаки, а наличие корней, находящихся в воздухе под непосредственным воздействием стресс-факторов в виде УФ-излучения, перепадов температур, дефицита ресурсов и воды, делает их ризоплану уникальной эконишей для изучения микробных популяций и активности микроорганизмов, составляющих их фитомикробиом.

Опираясь на опыт, накопленный в экологии почвенных микроорганизмов, отраженный в ключевой отечественной работе Н. А. Красильникова (1958), всё больше исследований посвящено изучению механизмов, стратегий и особенностей растительно-микробных взаимодействий, определению состава фитомикробиомов, роли ассоциативных микроорганизмов и возможностей практического использования RGPB, колонизирующих различные растения (Lodewyckx et al., 2002; Моргун и др., 2009; Шабаетов, 2012; Jha et al., 2013; Селицкая и др., 2013; Ми и др., 2014). Установление сбалансированного и успешного взаимодействия между партнёрами особенно важно при работе с редкими и исчезающими видами растений. Вопрос сохранения биоразнообразия орхидей, сочетающих сложность своего строения и развития с высокой декоративностью и лекарственными свойствами, стоит наиболее остро, отражая глобальный кризис биосферы, при котором орхидеи составляют большее число видов, находящихся под угрозой исчезновения, чем видов из других семейств растений (Swarts and Dixon, 2009a, b). Для фондовых оранжерей и ботанических садов основной целью становится не только сохранение и приумножение их численности, но и возможность их реинтродукции в природу. Однако для орхидей эта задача усложняется длительным процессом прорастания их мельчайших семян и получением растений, способных адаптироваться при высадке.

В природе лишённые эндосперма семена орхидей не прорастают без участия гриба-микоризообразователя. При симбиотическом проращивании *in vitro* до сих пор остаются невыясненными вопросы о механизмах успешного взаимодействия и видоспецифичности, что зачастую не позволяет использовать один гриб для орхидей из разных родов или даже видов (Knudson 1925, Burgeff 1959, Arditti, 1991; Otero et al., 2013; Hynson et al., 2013). Современные технологии основаны на асимбиотическом проращивании растений с использованием комплексных сред, содержащих различные питательные вещества, а также витамины, факторы роста и фитогормоны – стимуляторы роста растений (Arditti, 1991; Rasmussen, 1995; Teixeira da Silva et al., 2015b). Но такие растения, особенно в

ювенильной стадии развития, остаются высокоуязвимыми к фитопатогенам, в связи с чем вновь повысился интерес к симбиотическому проращиванию семян с микоризой для более эффективной их акклиматизации и адаптации в природе (Roberts and Dixon, 2008; Zhang et al., 2012). Поэтому поиск новых биотехнологических подходов, в частности, основанных на использовании культур PGPB, оказывающих положительное влияние на развитие растения-хозяина, является несомненно актуальным при разработке стратегий по сохранению биоразнообразия редких и исчезающих растений.

PGPB используют как биопрепараты или инокулянты в виде биоудобрений, фитостимуляторов или в качестве биоконтролирующих агентов за счёт образования антимикробных соединений или внеклеточных гидролитических (например, хитинолитических) ферментов. Однако многие фундаментальные вопросы подобных разносторонних и многогранных взаимодействий остаются до конца невыясненными (Чеботарь и др., 2015; Afzal et al., 2019). Появляется всё больше работ по изучению их стратегий колонизации растений; исследованию структуры и состава микробных популяций, по сути, представляющих многокомпонентный фитомикробиом; изучению роли эпи- и эндофитных микроорганизмов (Тихонович и Проворов, 2007; Кругова, 2009; Шапошников и др., 2011; Артамонова и др., 2014; Glushakova and Kachalkin, 2017; Jeyanthi and Kanimozhi, 2018). Многие фундаментальные исследования в этой области посвящены изучению механизмов реакций на молекулярном и клеточном уровнях, способам регуляции активности вовлечённых генов и ферментов, обнаружению вторичных метаболитов и сигнальных молекул, необходимых для коммуникации внутри и между популяциями микроорганизмов. Но значительная часть современных статей, патентов и книг отражают прикладное использование выделенных микроорганизмов, в особенности, эндофитов, которые не являются типичными симбионтами и свободно перемещаются в окружающей среде, проявляя при этом фитосимбионтные свойства (Hallmann et al., 1997; Lodewyckx et al., 2002). Основные исследования сконцентрированы, прежде всего, на сельскохозяйственных растениях, что объясняется экономической целесообразностью и острой необходимостью в оздоровлении почв (Полянская, 1997; Тихонович и Проворов, 2009; Бобровский, 2010; Schlaeppi and Bulgarelli, 2015; Эмер и др., 2019). В то же время фитомикробиомы лекарственных и стресс-толерантных растений привлекают всё большее внимание из-за потенциально отличающегося состава микробных популяций, в которых PGPB могут обладать более высокой активностью в отношении биосинтеза биологически-активных веществ, внеклеточных ферментов, антимикробных соединений, стимуляторов роста растений, направленных на улучшение роста и развития растения-хозяина и повышение его устойчивости и адаптационных способностей в стрессовых условиях роста.

Учитывая что эпифитные орхидеи произрастают в тропическом или субтропическом регионах, их культивирование в условиях умеренного климата возможно исключительно в оранжереях, поэтому основными объектами стали именно оранжерейные орхидеи. В то же время известно, что при перенесении в искусственные условия природные консортивные связи орхидей нарушаются (Коломейцева и др., 2013). Растения вынуждены создавать новые ассоциации с микроорганизмами, характерными для совершенно иной экосистемы. Эпифитные орхидеи, разительно отличающиеся от других растений по своей биологии и строению корневой системы, в особенности наличием многослойного веламена, состоящего из мёртвых клеток и выполняющего функции механической защиты воздушных корней, облегчающего абсорбцию воды и питательных веществ, представляли для нас особый интерес для изучения биоразнообразия и роли микроорганизмов, колонизирующих их ризоплану. К моменту начала наших исследований в начале 2000-х годов в мире не было работ, посвященных изучению состава и роли ассоциативных микроорганизмов эпифитных орхидей, кроме микоризообразующих грибов; исключение составляли единичные работы австралийских учёных под руководством профессора K. Sivasithamparam, в которых авторы выделили несколько изолятов бактерий из корней наземной орхидеи (Wilkinson et al., 1989, 1994a). Первые результаты по идентификации грибов и бактерий с учётом их морфолого-культуральных и биохимических признаков, выделенных с наземных и эпифитных оранжерейных орхидей, а также по изучению влияния триптофана на биосинтез ауксинов выделенными изолятами, были представлены в кандидатской диссертации (Цавкелова, 2003). Последующая научно-исследовательская работа была посвящена детальному изучению структуры и состава микробных сообществ различных эпифитных орхидей, сравнительному анализу разнообразия микроорганизмов дикорастущих и оранжерейных растений, функциональной роли микробного биосинтеза стимуляторов роста растений и механизмов их образования, а также выявлению факторов, опосредующих микробно-растительные взаимодействия, в том числе для использования в биотехнологии.

Исследования, направленные на изучение фундаментальных и прикладных характеристик растительно-микробных отношений, являются крайне востребованными, а представленная работа, рассматривающая различные аспекты взаимодействия бактерий и грибов с уникальными растениями – актуальной и практически значимой. Нами проведено исследование фитомикробиомов эпифитных орхидей, изучены этапы взаимодействия ассоциативных микроорганизмов с прорастающими семенами, ювенильными и генеративно-зрелыми растениями, проведён сравнительный анализ бактериальных сообществ, формирующихся на оранжерейных и дикорастущих растениях;

изучены механизмы и особенности микробного биосинтеза стимуляторов роста растений; отдельное внимание уделено изучению видоспецифичности и стратегиям во взаимоотношениях микроорганизмов с растением-хозяином; разработан новый подход к семенному размножению орхидей *in vitro* с использованием культур PGPB. Полученные результаты важны как для фундаментальной науки, так и для биотехнологии растений.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ

Цель работы – структурно-функциональный анализ ассоциативных микробных сообществ эпифитных орхидей с изучением механизмов микробно-растительных взаимоотношений, направленных на формирование и эффективное взаимодействие между партнёрами, в том числе для семенного размножения этих растений *in vitro*.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. Исследовать состав микробных сообществ оранжерейных и дикорастущих эпифитных орхидей и изучить стратегии взаимодействия ассоциативных микроорганизмов с семенами и генеративно-зрелыми растениями.
2. Провести сравнительный анализ фитомикробиома на примере *Dendrobium moschatum* с использованием традиционных техник и современных методов профилирования микробных сообществ с выявлением доминирующих популяций бактерий в ризоплане и филлоплане растения.
3. Охарактеризовать функциональную активность наиболее типичных ассоциативных микромицетов – представителей родов *Trichoderma* и *Fusarium* и рассмотреть участие и роль этих грибов в растительно-микробных ассоциациях.
4. Определить основные пути образования и регуляции биосинтеза микробных стимуляторов роста растений, а также роль ауксинов и гиббереллинов во взаимодействии между растением-хозяином и колонизирующими его грибами и бактериями.
5. Оценить потенциал ассоциативных микроорганизмов для их использования в биотехнологии на примере целлюлазной активности *Trichoderma*, способности к биосинтезу гиббереллинов *Fusarium* и рост-стимулирующей активности бактерий-продуцентов индолил-3-уксусной кислоты (ИУК).
6. На основе биосинтеза ИУК провести селекцию и изучить условия, видоспецифичность и эффективность инокуляции семян орхидей аборигенными и нерезидентными культурами бактерий для метода семенного размножения орхидей.

ОБЪЕКТ И ПРЕДМЕТ ИССЛЕДОВАНИЯ

К **объектам исследования** относятся как сами эпифитные орхидеи (сем. Orchidaceae), принадлежащие к подсемейству Epidendroideae, образующие субстратные и воздушные корни, так и разнообразные бактерии и грибы, заселяющие эти растения.

Предмет исследования - микробно-растительные взаимодействия ассоциативных микроорганизмов с эпифитными растениями семейства орхидных и их биотехнологическое использование, в том числе, культур бактерий для *in vitro* семенного размножения орхидей.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Научная новизна работы заключается в том, что впервые был получен, установлен и описан ряд результатов и явлений, характеризующих микробно-растительные взаимодействия на примере эпифитных растений с выявлением наиболее вероятных механизмов и стратегий взаимоотношений ассоциативных популяций бактерий и грибов с растением-хозяином. Принципиально новым мы считаем изучение структуры микробных сообществ ризопланы оранжерейных (Цавкелова и др., 2004; Tsavkelova, 2011; Tsavkelova et al., 2007b; 2008; 2016) и дикорастущих тропических орхидных (Цавкелова и др., 2005; Tsavkelova et al., 2007a), а также исследование филлопланы орхидей на примере *D. mochatum*. На примере оранжерейной орхидеи *Dendrobium moschatum* (Buch.– Ham.) Swartz. проведен анализ и выявлены закономерности и отличительные особенности фитомикробиома (ассоциативные микробные сообщества ризопланы и филлопланы) с использованием традиционных методов выделения культивируемых бактерий и современных технологий высокопроизводительного секвенирования.

Исследована локализация и роль нитчатых diaзотрофных видов цианобактерий в установлении тесных ассоциативных взаимоотношений и формировании сообществ, образующих обрастания на воздушных корнях эпифитных облиственных и безлистных орхидей. Помимо известных азотфиксаторов из родов *Nostoc*, *Anabaena*, *Calothrix*, впервые среди партнёров безлистных орхидей выявлены представители рода *Komarekiella*.

С помощью молекулярно-биологических методов идентифицированы изоляты, принадлежащие к роду *Fusarium*. Исследована филогенетическая принадлежность *Fusarium proliferatum* (штамм ET1) и его стратегия взаимодействия с эпифитными растениями в сравнении с фитопатогенными грибами из того же рода.

Широко исследована способность ассоциативных микроорганизмов орхидей к биосинтезу вторичных метаболитов – стимуляторов роста растений и установлена ключевая роль ауксинов в формировании микробно-растительных взаимодействий.

Большинство продуцентов среди грибов и бактерий обладают триптофан-зависимым биосинтезом ауксинов (индолил-3-уксусной кислота, ИУК). Впервые у представителей рода *Fusarium* изучены механизмы образования ауксинов по индолил-3-ацетамидному (ИАМ) пути биосинтеза ИУК, функциональному у *F. proliferatum* ET1, что отличает его от фитопатогенных *F. oxysporum*, *F. verticillioides* и *F. fujikuroi*. Впервые исследован биосинтез гиббереллинов у *F. proliferatum* ET1: основными продуктами являются гибберелловые кислоты (ГК) ГК₄ и ГК₇, но не ГК₃. Выявлена не только экспрессия ключевых генов, участвующих в синтезе ГК, но и регуляция их активности, такая же как и у основного продуцента – *F. fujikuroi*. Механизмы образования и регуляции биосинтеза ГК изучены также на примере изолята *F. oxysporum* №1, не относящегося к комплексу видов *Giberella fujikuroi*, и неспособного к биосинтезу ГК. Полное восстановление способности к биосинтезу гиббереллинов после введения космиды, содержащей все гены кластера, указывает на эволюционную консервативность и функциональную активность всех регуляторных механизмов.

Исследовано влияние состава среды и соединений азота на биосинтез ауксинов микроорганизмами и эффективную конверсию экзогенного триптофана в ИУК. Обсуждается роль ИУК как сигнальной молекулы, необходимой для коммуникации между растением-хозяином и его ассоциативными партнёрами. Среди активных бактерий-продуцентов выявлены виды, образующие ИУК через индолил-3-пировиноградную кислоту (ИПВК), – *Sphingomonas* sp., *Rhizobium* sp. и *Microbacterium* sp., а также по ИАМ-пути, – *Mycobacterium* sp. На примере этих культур впервые показано влияние экзогенной ИУК на увеличение плотности бактериальных популяций и ростовые характеристики бактерий, указывающие на гормональное действие ауксинов на микроорганизмы.

В рамках изучения микробно-растительных взаимодействий на примере фитоэкстрактов *D. moschatum* и *Pholidota chinensis* Lindl. впервые изучены их антибактериальные свойства в отношении собственных ассоциативных филлобактерий. Показано наличие определённого сдерживающего рост эффекта со стороны растения, однако, значительного ингибирующего воздействия обнаружено не было, что указывает на поддержание динамического равновесия и стабильных взаимоотношений между партнёрами в консорциуме.

На примере эндофитных культур *Sphingomonas* sp. и *Agrococcus* sp. показана их высокая активность по увеличению всхожести и стимуляции роста и развития семян орхидей *in vitro* на средах без использования экзогенных фитогормонов. Проведены исследования и описаны методики и стратегии ко-культивирования семян с различными ризобактериями, определены селективные преимущества ИУК-продуцентов и недостатки

PGPB штаммов, образующих значительные количества экзополисахаридного матрикса, для их потенциального использования при семенном размножении орхидных. Получен патент РФ на изобретение культура бактерий, стимулирующая прорастание орхидей, и способ ее использования (№ 2272409, 2005). На примере представителей родов *Pseudomonas* и *Klebsiella* впервые продемонстрирована стратегия колонизации и распространения ассоциативных бактерий в корнях генеративно-зрелых эпифитов, а также в прорастающих семенах и проростках. Выявлено отсутствие строгой видоспецифичности между растением-хозяином и бактериальными партнёрами при использовании PGPB штаммов. Оптимизация условий бактеризации, в том числе с экзогенным триптофаном, для увеличения микробного биосинтеза ауксинов и сопряженная с этим селекция PGPB продуцентов ИУК продемонстрировали значительное увеличение всхожести и ускорение роста семян различных видов орхидей в условиях *in vitro*.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

В настоящей работе представлено исследование, в котором объединены и логически систематизированы связанные между собой разделы, посвященные различным направлениям в области микробно-растительных взаимоотношений. Эта единственная работа среди отечественных и зарубежных исследований, охватывающая широкий круг вопросов по изучению биоразнообразия микробных консорциумов эпифитных орхидей, а также механизмов и стратегий взаимодействия между растением-хозяином и его ассоциативными партнёрами. Полученные нами данные, объединённые особенностями биологии растительных объектов и их уникальными характеристиками, не только расширяют наши фундаментальные знания о природе таких взаимоотношений и задают вектор исследований, фокусируясь на существенных и значимых направлениях и используемых техниках, но и создают необходимые предпосылки для проекции представленных задач, методологии и подходов к их решению на значительно более широкий круг объектов.

В работе использован комплексный подход, сочетающий традиционные и современные методики, к описанию микробных сообществ ризо- и филлопланы. Полученные данные позволили выявить общие, характерные для различных эпифитов, популяции микроорганизмов, а также обнаружить особенности распространения доминирующих и минорных популяций в зависимости от типа растений и от занимаемой экониши. Значимым наблюдением также является изучение не только биоразнообразия,

но и характеристика стратегий колонизации ассоциативными микроорганизмами различных облиственных и безлистных эпифитных орхидей.

Впервые выявлены представители цианобактерий рода *Komarekiella* среди ассоциативных diaзотрофных цианобактерий, заселяющих корни безлистных орхидей, что расширяет наши знания о биоразнообразии цианобактериальных партнёров растений. Структура и плотность цианобактериальных сообществ, формирующихся на воздушных корнях эпифитов, зависит не только от влияния абиотических факторов (влажность и температура), но также зависит от биологии эпифитных орхидей и различается между растениями, образующими исключительно воздушные корни, или же имеющими также субстратные корни и активно фотосинтезирующие листья, или же безлистными видами эпифитов. Функциональный потенциал цианобактерий, формирующих массивные обрастания, заключается и в их ресурсной роли для других микроорганизмов консорциума как своеобразной микробной экосистемы. В частности, в паренхиме воздушных корней обнаружены гифы гриба-микоризообразователя (Цавкелова и др., 2003б), рост которого обеспечивается ресурсами за счет массивного развития цианобактериальных сообществ.

В составе изученных микробных сообществ к объектам с выраженной экзогидролазной активностью относятся, в частности, микромицеты. Гидролитическая активность изучена нами на примере целлюлаз *Trichoderma viride* Pers.: Fr. Впервые показано, что грибы этого рода широко представлены в ризоплане оранжерейных и дикорастущих орхидей, заселяя их субстратные и воздушные корни (Цавкелова и др., 2003в; 2005). Высокий биотехнологический потенциал *T. viride* в полной мере проявился в модельных экспериментах при разложении не только офисной бумаги с чёрно-белой печатью, но и смеси из различных трудноразлагаемых бумаг. Использование этого гриба для предварительной обработки целлюлозосодержащих отходов при получении биотоплива позволило существенно оптимизировать процесс образования биогаза с куммулятивным содержанием метана более 52% (Прокудина и др., 2016). Принципиальная возможность эффективной утилизации мортмассы цианобактерий в качестве единственного органического ресурса также получила подтверждение в нашем исследовании по её биоконверсии с помощью метаногенных сообществ в биогаз (Петрова и др., 2017).

В работе впервые изучены пути проникновения эндофитных бактерий в корни генеративно-зрелых орхидей (Pavlova et al., 2017), выявлена существенная роль веламена, способствующая распространению бактерий в ризоплане воздушных корней облиственных орхидей. Проведены наблюдения взаимодействия семян и проростков орхидей с бактериями на ранних этапах развития растений, выявлены особенности

колонизации прорастающих семян и формирование субпопуляций на ризоидах и корнях (Tsavkelova et al., 2016; Pavlova et al., 2017). Полученные данные создают основу для исследований, направленных на изучение особенностей и механизмов взаимодействия бактерий с растениями, произрастающими в экстремальных условиях обитания.

В работе проведено многостороннее исследование механизмов взаимодействия ассоциативных микромицетов и бактерий с орхидными. Принципиальным является исследование особенностей образования и регуляции биосинтеза вторичных метаболитов – стимуляторов роста растений (Tsavkelova et al., 2007b; 2008; 2012; 2016). Впервые на молекулярном уровне исследованы механизмы образования ауксинов по индолил-3-ацетамидному пути у грибов, принадлежащих к роду *Fusarium* (Tsavkelova et al., 2012; Tsavkelova, 2016; Niehaus et al., 2016), выявлены различия в биосинтезе и регуляции биосинтеза ауксинов и гиббереллинов у *F. proliferatum* ET1 в сравнении с другими фитопатогенными грибами этого рода, что может характеризовать и определять стратегии взаимодействия представителей *Fusarium* с растениями, что также подтвердили проведённые нами биотесты. Полученные результаты лежат в тренде современных исследований, направленных на изучение межпопуляционных взаимоотношений и выявление механизмов, регулирующих формирование взаимовыгодных связей между партнёрами в микробно-растительных сообществах.

Проведённые нами молекулярно-генетические исследования, в том числе по получению трансгенных микромицетов из рода *Fusarium*, позволили обнаружить кластер из семи генов, отвечающий за биосинтез гиббереллинов и миникластер, состоящий из двух генов, отвечающий за биосинтез ИУК по ИАМ-пути у *F. proliferatum* ET1 (Tsavkelova et al., 2008; 2012). Применение современных молекулярно-генетических подходов также позволило получить фундаментальную информацию о регуляции экспрессии генов и провести сравнительный анализ между представителями, относящимися (*F. fujikuroi* и *F. proliferatum*) и не относящимся (*F. oxysporum*) к группе видов комплекса *Fusarium (Gibberella) fujikuroi*. Установлено, что механизм регуляции экспрессии генов, отвечающих за биосинтез гиббереллинов связан с участием общего регуляторного механизма транскрипции с помощью фактора транскрипции *AreA* (Tsavkelova et al., 2008; Tsavkelova, 2016). Наши результаты указывают на эволюционную консервативность регуляторных механизмов биосинтеза гиббереллинов, которая проявляет свою функциональность даже у видов, утративших частично или полностью способность к биосинтезу этих соединений.

Значительная часть работы посвящена изучению способности ассоциативных бактерий эпифитных орхидей к биосинтезу ауксинов, прежде всего, индолил-3-уксусной

кислоты, которая, по сути, является универсальным "медиатором общения" между растением-хозяином и фитобиомом, представленным разнообразными популяциями микроорганизмов ризо- и филлопланы. На примере различных гетеротрофных бактерий (эпи- и эндофитов), в том числе нескольких представителей родов, на которых это продемонстрировано впервые, например, *Sphingomonas*, *Microbacterium*, *Agrococcus* sp. (Tsavkelova et al., 2007b; 2016) нами были исследованы пути образования ауксинов у наиболее активных продуцентов, идентифицированы промежуточные и конечные соединения, выявлены условия, в том числе наличие и форма азотсодержащих веществ, содержащихся в питательной среде, влияющие на выход ауксина. Принципиально новыми являются наши данные о положительном воздействии экзогенной ИУК на увеличение численности бактериальной популяции, что было отмечено на примере представителей *Mycobacterium*, *Sphingomonas*, *Rhizobium*, *Microbacterium* (Tsavkelova et al., 2007b). Таким образом, ИУК выступает в роли стимулятора роста бактерий, что создаёт основу для дальнейших исследований, направленных на изучение механизмов этих явлений.

В работе использовали методы получения генетически-модифицированных грибов из рода *Fusarium* (Malonek et al., 2004; Barhoom and Sharon, 2004; Teichert et al., 2004), дикие типы которых принадлежат к *F. proliferatum* и *F. oxysporum*. Трансформация с помощью комплементационных векторов впервые позволила получить устойчивые трансгенные штаммы этих видов грибов с высоким уровнем образования гиббереллинов и ауксинов по ИАМ-пути биосинтеза (Tsavkelova et al., 2007; 2012; Tsavkelova, 2016), что открывает новые возможности биотехнологического использования подобных продуцентов для получения конечных продуктов – стимуляторов роста растений.

Практическая значимость работы также определена резко возросшим в последнее время сокращением численности и видового биоразнообразия редких и исчезающих видов, в том числе семейства орхидных. К основным факторам, опосредующим эти потери, относятся, прежде всего, антропогенное вмешательство, а также климатические изменения, выражающиеся в сокращении количества осадков и более длительных и засушливых сезонах, способствующих распространению и развитию лесных пожаров. Наши исследования впервые показали возможность использования чистых культур бактерий для семенного *in vitro* размножения орхидей (Коломейцева и др., 2002; 2005; Tsavkelova et al., 2007b; 2016; Pavlova et al., 2017), что, определённо, является новым подходом в биотехнологии орхидных. Предложенный способ бактеризации семян селективными штаммами RGPB культур позволяет, используя простые питательные среды без добавления дополнительных стимуляторов роста растений, значительно увеличить всхожесть семян орхидей, а также ускорить их развитие. Нами были впервые

получены данные относительно критериев отбора эффективных штаммов, подходящих для их использования в ко-культуре с мельчайшими, лишёнными эндосперма, семенами орхидей. Среди требований – образование оптимальных (около 20-80 мкг/мл) количеств ИУК, непосредственный контакт клеток RGPB с семенами при бактеризации и отсутствие формирования чрезмерного экзополисахаридного матрикса на высокоуглеводных агаризованных питательных средах, используемых для проращивания семян. Нами впервые был изучен вопрос видоспецифичности, которая отсутствует при взаимодействии орхидей и бактериальных партнёров (Pavlova et al., 2017), и наличие которой, наоборот, обычно значительно затрудняет использование микоризообразующих грибов при симбиотическом проращивании семян орхидей *in vitro*. Кроме того, актуальным является поиск и разработка способов по повышению выживаемости и устойчивости растений при их реинтродукции в природу (Коломейцева и др., 2013а; б). Предложенная нами стратегия бактеризации семян орхидей селективными RGPB штаммами (Коломейцева и др., 2005; Tsavkelova et al., 2007b; Pavlova et al., 2017) к настоящему времени используется и другими авторами (например, Galdiano Jr. et al., 2011, Faria et al., 2013; Yang et al., 2014), ссылающимися на наши исследования, при работе как с наземными, так и с эпифитными орхидеями. Полученные нами результаты, разработанная методология кокультивирования семян орхидей с RGPB штаммами и предложенный нами способ бактеризации являются новаторскими и перспективным в биотехнологическом подходе к семенному размножению *in vitro*, что открывает широкую перспективу их прикладного использования. Некоторые из разработанных и использованных нами методик включены в методические пособия и практические руководства (Нетрусов и др., 2005; Цавкелова и др., 2011).

МЕТОДОЛОГИЯ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали стандартизированные современные методологию и подходы, относящиеся к различным биологическим дисциплинам: микробиология, физиология растений, ботаника, биохимия, цитология, молекулярная биология. В качестве общенаучных методов были применены эмпирические, теоретические, математические (статистические) и логические составляющие. В рамках практического подхода использовали, прежде всего, следующие аспекты: наблюдение, эксперимент, моделирование. Эксперименты выполняли в лабораторных условиях.

Широко применяли методы аналитической химии для разделения и концентрирования веществ, их обнаружения, качественного и количественного определения. Для морфологических и цитологических наблюдений использовали методы

микроскопии (световая, флуоресцентная, сканирующая и трансмиссионная электронная, конфокальная лазерная сканирующая).

Для выделения и культивирования фото- и хемотрофных, про- и эукариотических, аэробных и анаэробных микроорганизмов использовали традиционные методы микробиологии. Количественные измерения микроорганизмов проводили, используя измерения их биомассы или оптической плотности. Для идентификации микроорганизмов помимо морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков использовали секвенирование участков рРНК, а также анализ с помощью денатурирующего геле-электрофореза. Профилирование бактериальных сообществ проводили на базе платформы Illumina MiSeq. Для обнаружения микробных фитогормонов использовали колориметрические методы, методы тонкослойной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и газовую хроматографию, совмещенную с масс-спектрометрией. При изучении наличия и активности генов, ответственных за биосинтез ауксинов и гибберелинов у микромицетов, использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с обратной транскрипцией, трансформацию и получение трансгенных мутантов, Саузерн-блот анализ и нозерн-блот гибридизацию. Для анализа данных молекулярно-биологических исследований, геномного анализа, построения филогенетических деревьев использовали зарубежные и отечественные пакеты программ.

Проведены различные биотесты с растениями по определению биологической активности микробных стимуляторов роста растений (фитогормонов), а также по определению воздействия микроорганизмов (грибы и бактерии) на ростовые характеристики тестируемых растений.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. На эпифитных орхидеях за счёт особенностей их биологии и строения корневой системы формируются многокомпонентные микробные консорциумы. Биоразнообразие ассоциативных микробных сообществ ризопланы имеет сходство по доминирующим популяциям между дикорастущими и оранжерейными растениям, однако, существенно отличается внутри одного растения в зависимости от типа корней.

2. Зоной максимального микробного присутствия и активности становится поверхность корней растений, а эндофитные микроорганизмы заселяют внутренние ткани, проникая в них с помощью веламена. В прорастающих семенах эндофитные бактерии активно колонизируют ризоиды, а затем и корни ювенильных растений, занимая межклеточное пространство в коревой паренхиме.

3. Среди основных механизмов микробно-растительных взаимодействий можно выделить способность к азотфиксации цианобактерий, активно заселяющих воздушные корни облиственных и безлистных орхидей, а также образование ассоциативными бактериями и грибами стимуляторов роста растений, прежде всего, ауксинов. Триптофан-зависимый биосинтез индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) у микроорганизмов преимущественно происходит через индолил-3-пировиноградную кислоту или индолил-3-ацетамид.

4. К потенциальным факторам, определяющим механизм взаимодействия между растением-хозяином и ассоциативными бактериями, можно отнести коммуникацию с помощью сигнальной молекулы ИУК, оказывающей рост-стимулирующий эффект не только на растение, но и на бактерий-продуцентов, а также выработку антимикробных соединений растением-хозяином.

5. Ассоциативный микромицет *Fusarium proliferatum* ET1 значительно отличается от других фитопатогенных представителей этого вида и рода по ряду особенностей биосинтеза ауксинов и гиббереллинов на молекулярном уровне, что определяет стратегию его взаимодействия с исследованными эпифитными орхидеями из рода *Dendrobium*.

6. Определяющими критериями отбора рост-стимулирующих бактерий для использования в биотехнологии семенного проращивания эпифитных орхидей *in-vitro*, прежде всего, являются способность штаммов к биосинтезу оптимальных количеств ИУК и отсутствие образования чрезмерного экзополисахаридного матрикса. При этом строгой видоспецифичности при взаимодействии партнёров не выявлено.

7. Возможность восстановления биосинтеза гибберелловых кислот на примере *Fusarium oxysporum* у видов, исходно неспособных к образованию гиббереллинов, а также использование экзогидролазной активности *Trichoderma viride* для биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов на примере различных типов бумаг вносят существенный вклад в научные основы будущих биотехнологий.

8. К основному биотехнологическому аспекту работы относится разработка технологии бактеризации семян орхидей с помощью селективированных аборигенных и нерезидентных культур RGPB, что позволяет значительно увеличить всхожесть и ускорить развитие растений при их семенном размножении.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Личный вклад автора. Диссертационная работа является самостоятельным научным исследованием соискателя, выполнявшимся в течение 20 лет. Личный вклад Цавкеловой Е.А. присутствует на всех этапах выполнения работы и заключается в выборе,

планировании и разработке направления исследования, определении целей и задач, выборе техник и набора методик для проведения экспериментальной и аналитической работы, разработке протоколов исследования, проведении экспериментальной части работы, а также сбору и анализу данных, проведению статистической обработки результатов и обобщению материалов, написанию работы и публикаций, в которых отражены результаты работы, представлению результатов на конференциях. Все результаты получены самим автором или при непосредственном его участии в случае совместных работ. Работа выполнена на базе биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; некоторые исследования были проведены на базе Institute of Botany, Westphalian Wilhelm's University of Muenster (Мюнстер, Германия), а также в Department of Plant Sciences, Tel Aviv University (Тель-Авив, Израиль). Совместное участие отражено в публикациях по теме диссертации.

Степень достоверности результатов. Все полученные результаты являются оригинальными, их достоверность основывается на большом объеме данных, воспроизводимости результатов в повторностях (биологических и математических), использовании традиционных и современных подходов и методик, корректном применении статистических и биоинформатических методов, а также на использовании критического анализа результатов исследований и их сравнительным анализом с данными литературы. Степень достоверности подтверждается опубликованными по теме работы статьями в ведущих рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были представлены в качестве пленарных докладов на следующих российских и международных конференциях и конгрессах: Всероссийская конференция с международным участием "Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии" (23-24 декабря 2019 г, Москва, Россия.); VIII Всероссийская конференция молодых ученых "Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой" (26-30 сентября, 2016 г, Саратов, Россия); 5th International Congress on Orchid Conservation (IOCC5) (02-06 of December, 2013г, Saint Denis, Ile de la Reunion) и в качестве стендовых докладов и/или дальнейших публикаций в виде тезисов и трудов конференций: "Международная научная конференция PLAMIC2018 "Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего" (13-17 июня 2018г, Уфа, Россия); 1-ый Российский Микробиологический конгресс (17-18 октября 2017 г, Пущино, Россия); "Автотрофные микроорганизмы: 5-й Всероссийский симпозиум с международным участием" (21-24 декабря 2015 г, Москва, Россия); "Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов" (24-27 декабря 2009г., Москва, Россия).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 38 работ: из них 30 – статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus), из которых 4 в журналах второго квартиля (Q2) и 8 в журналах первого квартиля (Q1); 4 – статьи в Российских научных журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных работ (РИНЦ), 1 патент, 1 обзорная глава в книге, а также 2 учебно-методических руководства.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из 7 разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 432 страницах, содержит 122 рисунка и 42 таблицы. Список литературы включает 1061 источников, из них 165 на русском и 896 на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ¹

1.1. Особенности растений семейства *Orchidaceae* Juss.

Семейство *Orchidaceae* Juss. включает в себя более чем 27 800 видов из 880 родов (Givinish et al., 2016) и является одним из наиболее многочисленных в классе однодольных (*Monocotyledones*), составляя до 10% от всех известных видов цветковых растений. Представители этого семейства произрастают на всех континентах за исключением Антарктиды, заселяя тропические дождевые леса и распространяясь в зоне умеренного климата до самых границ полярных областей. Наибольшее разнообразие представлено видами, произрастающими в тропиках и субтропиках Южной и Центральной Америки и Юго-Восточной Азии. Орхидеи возникли около 140-120 млн. лет назад и являются еще и наиболее специализированными среди однодольных растений, вступая в сложные биотические взаимодействия с другими организмами, поскольку их

¹ В главе изложены данные, опубликованные в следующих научных статьях автора:

1. Олескин А.В., Ботвинко И.В., Цавкелова Е.А. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов // Микробиология. 2000. Т. 69. № 3. С. 309-327.
2. Цавкелова Е.А., Ботвинко И.В., Кудрин В.С., Олескин А.В. Детекция нейромедиаторных аминов у микроорганизмов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Доклады АН. 2000. Т. 372. С. 840-842.
3. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы –продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // Прикладная биохимия и микробиология. 2006а. Т. 42. № 2. С. 133-143.
4. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Гормоны и гормоноподобные соединения микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006б. Т. 42. № 3.
5. Teixeira da Silva J.A., Tsavkelova E.A., Zeng S., Ng T.B., Parthibhan S., Dobránszki J., Cardoso J.C., Rao M.V. Symbiotic in vitro seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development // Planta. 2015. V. 242. № 1. P. 1-22.
6. Teixeira da Silva J.A., Tsavkelova E.A., Ng T.B., Parthibhan S., Dobránszki J., Cardoso J.C., Rao M.V., Zeng S. Asymbiotic in vitro seed propagation of *Dendrobium* // Plant Cell Reports. 2015. V. 34. P. 1685-1706.

раннее возникновение позволило эволюционировать им вместе с опылителями или растениями, на которых крепятся и растут эпифитные орхидеи (Коломейцева, 2017). Среди ключевых характеристик биологии орхидей (Benzing, 1981) – пять, две из которых напрямую зависят от тесных ассоциативно-симбиотических взаимодействий растения со своими партнёрами: (i) наибольшее разнообразие видов среди однодольных растений, (ii) минимальные размеры семян, (iii) полную зависимость прорастающих семян от гриба-микоризообразователя, (iv) статус редких и исчезающих растений для многих дикорастущих видов, (v) зависимость опыления от узкоспециализированных ассоциаций с насекомыми, птицами и иногда летучими мышами. Все орхидеи – многолетние травянистые растения, отличающиеся чрезвычайным разнообразием форм и экологических типов. Семейство орхидных разделено на пять подсемейств: от наиболее примитивных *Apostasioideae* и *Cypripedioideae* до высокоорганизованных *Vanilloideae* и *Orchidoideae*, в которых много нефотосинтезирующих микотрофных (сапрофитных) видов, до самого продвинутого, *Epidendroideae*, представленного в основном эпифитами (Roberts and Dixon, 2008; Коломейцева, 2017). Эпифиты составляют 70-75% внутри семейства и 68% от всех сосудистых эпифитных растений, используя стволы и ветви деревьев в качестве опоры. Так они испытывают меньшую конкуренцию со стороны других растений и получают доступ к свету и воде (Уоллес, 1956). Эдафическая группа литофитов заселяет трещины на поверхности скал, камней и в застывшей вулканической лаве. Другая распространённая группа – это геофиты (наземные орхидеи), произрастающие в субтропических и умеренных климатических зонах, где дефицит влаги обусловлен либо длительной засухой, либо отрицательными температурами. Кроме того, существуют растения, частично или полностью утратившие способность к фотосинтезу и перешедшие на миксотрофное или микотрофное питание, получая питательные вещества от симбиотического гриба, образующего микоризу (Pridgeon, 1986a, Benzing, 1986).

1.1.1. Практическое использование орхидей

В современном мире орхидеи составляют огромный рынок декоративных горшечных и срезанных цветов, который в США имеет оборот около 100 млн долларов ежегодно (Griesbach, 2002), но орхидеи также традиционно используют в пищу и применяют в народной медицине. Для производства "палочек ванили", которые являются ферментированными плодами орхидеи, используют культивируемые в Мексике, Китае, Индонезии и некоторых других экваториальных странах сорта трёх видов *Vanilla* (*V. planifolia*, *V. pompona*, *V. tathitensis*). Однако для производства другого продукта – салепа,

до сих пор популярного в Турции и Иране (Sezik, 2002; Ghorbani et al., 2014), истребляют дикорастущие популяции орхидей. Салеп готовят из клубней (туберидиев) наземных орхидей родов *Orchis*, *Ophrys*, *Comperia*, *Barila*, *Dactylorhiza*, *Platanthera*, *Steveniella*, *Neotinea* и др. Туберидии на протяжении веков использовали для лечения симптомов желудочно-кишечных расстройств, диареи, дизентерии, а также воспаления дыхательных путей, при простудах, кашле и туберкулёзе (Arditti, 1992). Из-за высокого содержания полисахаридов (полиголозид глюкоманнан) салеп после вываривания образует вязкую субстанцию, которую также используют в кулинарии. Ежегодно в Турции производят около 15-20 тонн салапа, что соответствует 30-40 млн использованных туберидиев орхидей (Sezik, 2002). Для ежегодного сбора 25 тонн туберидиев в Иране уничтожают около 6 млн орхидей (Ghorbani et al., 2014). Однако спрос на салеп в последнее время не только не уменьшается, но наоборот, увеличивается: и Турция, и Иран являются экспортёрами этого продукта. Поскольку для этих целей используют исключительно дикорастущие растения, уничтожение популяций орхидных достигло на территории этих стран катастрофических масштабов.

Такая же ситуация наблюдается и с тропическими, преимущественно эпифитными, орхидеями, которые активно используются в традиционной медицине и фармакологии стран Центральной и Южной Америки, Индии, Китая и Юго-Восточной Азии. В основном, медицинские орхидеи принадлежат к следующим родам: *Calanthe*, *Coelogyne*, *Cymbidium*, *Cypripedium*, *Dendrobium*, *Ephemerantha*, *Eria*, *Galeola*, *Gastrodia*, *Gymnadenia*, *Habenaria*, *Ludisia*, *Luisia*, *Nevilia* и *Thunia* (Szlachetko, 2001). В виде настоев, отваров, tinkтур, порошков, ингаляций и других форм приготовленных снадобий, орхидеи использовали и до сих пор применяют в этнофармакологии для лечения широкого спектра болезней: кожных, дыхательного и пищеварительного трактов, репродуктивной и сердечно-сосудистой систем; в качестве обезболивающих, нейропротекторных и седативных средств, а также средств с ярко выраженными гепатопротекторными и иммуностимулирующими свойствами (Gutiérrez, 2010; Teixeira da Silva et al., 2015a). В последние годы возросший интерес к медицинским свойствам орхидей позволил выделить из этих растений и идентифицировать большое количество химических соединений, в том числе алкалоидов, флавоноидов, фенантронов, терпеноидов и гликозидов. Эксперименты на культурах клеток (например, на клеточных линиях Hela, K562, HL-60) подтвердили высокую противоопухолевую и противораковую активность ряда соединений, проявляющихся в цитотоксическом характере воздействия, ингибировании клеточной агрегации и индукции апоптоза (Wu et al., 2006; Song et al., 2012; Chen et al., 2013). Кроме

того, показана антивирусная, антигрибковая и антимикробная активности экстрактов, полученных из ряда эпифитных и наземных орхидей. Например, гигантол и бататазин III проявляли некоторую активность против вируса herpes simplex (Sukphan et al., 2014), а маннозо-связывающие лектины (МСЛ) из *Cymbidium* sp., *Epipactis helleborine* и *Listera ovata* ингибировали вирус иммунодефицита человека первого и второго типов на модельной клеточной линии острой лимфобластомы человека МТ-4, а также показали значительную активность в отношении цитомегаловируса, респираторно-синцитиального вируса человека и вируса гриппа А на клеточных линиях HEL, HeLa и MDCK, соответственно (Balzarini et al., 1992).

Антифунгальную активность в отношении фитопатогенных представителей *Rhizoctonia* spp. обнаружили в этанольных экстрактах наземной орхидеи *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Shimura et al., 2007), а также у МСЛ, выделенного из *Dendrobium findleyanum* (Sattayasai et al., 2009). Выраженным антибактериальным действием в отношении некоторых грамотрицательных и грамположительных бактерий обладают экстракты *Vanilla planifolia* и *Galeola foliata* (Khan and Omoloso, 2004; Fitzgerald et al., 2004). Соединения 4-гидрокси-3-метоксибензальдегида (ванилин) и 4-гидрокси-3-метоксибензойной кислоты (ванилиновая кислота), выделенные из *Vanilla pompona*, ингибировали рост бактерий, принадлежащих к роду *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. grayi* и *L. seeligeri* (Delaquis et al., 2005). Ванилин также ингибировал рост *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* и *L. innocua*, нарушая функционирование протонного градиента и ингибируя дыхание в клетках (Fitzgerald et al., 2004). Экстракты из листьев и стеблей тропической микогетеротрофной орхидеи *Galeola foliata* также обладали антимикробной активностью в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *S. aureus*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa*, однако, не проявлял противогрибного действия в отношении *Aspergillus niger*, *A. rubrum*, *A. versicolor*, *A. vitis*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Cladosporium cladosporioides*, *Trychophyton mentagrophytes* и *T. tonsurum* (Khan et al., 2004). При исследовании различных видов целогин, наибольшая антимикробная активность была выявлена у *Coelogyne tomentosa* и *C. speciosa* в отношении *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, соответственно (Буюн и др., 2016, 2017).

1.1.2. Особенности строения и биотических связей орхидей

Необычайной красоты и удивительные по форме и расцветке цветы орхидей – зигоморфные (можно провести лишь одну плоскость симметрии), собранные в простую

кисть. Соцветие называют одноцветковой кистью у растений с одиночными цветами, например, у *Paphiopedillum* sp. или *Cypripedium* sp., а в других случаях оно может ветвиться, образуя сложную кисть (например, у *Phalaenopsis* sp.) или иметь колосовидные или зонтиковидные вариации (Коломейцева, 2017). Цветок (размером от 1-2 мм до нескольких десятков см) состоит из двух окружностей, по три лепестка в каждой, листики внешнего круга называются чашелистиками (сепалии), лепестки внутреннего – лепестками венчика. Отличительным признаком цветка орхидных является модифицированный и часто ярко окрашенный средний лепесток венчика – так называемая губа (лабеллум). Цветы орхидей обоеполые, где пестики и тычинки со склеенными массами пыльцы, формирующей поллинии, сростаются (как минимум, частично), образуя особую структуру – колонку (гиностемиум); в результате тычинки располагаются на абаксиальной стороне цветка (Roberts and Dixon, 2008). Нектарники, привлекающие к себе различных насекомых, а также птиц, также исходно образовались из зачатков тычинок.

Одним из примеров тесных биотических связей орхидей могут служить их отношения с опылителями – различными насекомыми и птицами. В процессе эволюции орхидеи выработали настолько отлаженный механизм взаимодействия с ними, что в ряде случаев такие примеры узкой специализации привели к тому, что строение цветка позволяет ему опыляться исключительно одним единственным опылителем. Считается, что, например, птицы-опылители приобретают важность для растения особенно по мере увеличения высоты над уровнем моря, в гористых местностях, поскольку насекомые становятся менее активными в прохладных условиях при высоких альтитудах (McHatton, 2011). Эффективными опылителями орхидей, в том числе и многих видов представителей рода *Dendrobium*, в Старом Свете являются нектарницы (*Nectariniidae*). В Новом Свете эта роль принадлежит колибри – *Trochilidae* (Cingel, 2001), а на Маскаренских островах – певчим птицам – белоглазками (*Zosteropidae*) (McHatton, 2011). Среди разнообразных насекомых-опылителей встречаются представители различных семейств – более половины насекомых-опылителей составляют перепончатокрылые – пчёлы, шмели и осы, а также некоторые муравьи; среди чешуекрылых (бабочки и моли) активны и дневные, и ночные виды, в связи с чем и строение, и аттрактанты (окраска, аромат и наличие нектара) цветка будут отличаться; двукрылые (комары и мухи) опыляют около 12-15% орхидей и их привлекает исключительно аромат довольно невзрачных на вид мелких цветов. На Маскаренских островах в качестве опылителей видов рода *Angraecum* отмечены термиты и сверчки (Micheneau et al., 2010). Отношения орхидей с опылителями в течение эволюции не только формировали внешний вид цветка, но и стратегию успешного взаимодействия с опылителями. Хотя около 10-15% орхидей могут использовать самоопыление (Roberts and

Dixon, 2008), именно среди орхидей встречается масса хитростей и уловок, привлекающих их узко-специализированных опылителей, в ожидании которых цветение растения может растянуться на недели и месяцы. Кроме длительности цветения, орхидеи используют ложные приманки и своеобразные ловушки, при попадании в которые и в процессе освобождения из них пыльца (полинарии) прилипает к телу насекомого, который перенесёт их на другой цветок. Около одной трети орхидей вообще не предоставляют своим опылителям никакой награды, а наиболее изощренным обманом цветка является стратегия "псевдокопуляции", когда строение цветка своим внешним видом, запахом, копирующим феромоны, и даже тактильными ощущениями имитирует самку насекомого-опылителя, привлекая внимание исключительно самцов (Roberts and Dixon, 2008).

Образование огромного количества мелких пылевидных семян, которые являются самыми мелкими по размеру (0,05–6 мм) или весу (0,31–24 мкг) среди цветковых растений также являются отличительной чертой орхидей (Arditti and Ghani, 2000). В одном плоде (трёхгранная коробочка различной величины и формы) их может содержаться более 4 млн, при этом созревание семян очень медленное и может занять от 1 до 30 месяцев в зависимости от вида орхидеи. Из-за микроскопических размеров строение семян орхидных не удавалось изучить вплоть до середины XX века. Покровы семени обеспечивают большую водоустойчивость и одновременно плавучесть, что позволяет семенам распространяться на большое расстояние не только с воздушными потоками, но и с токами воды (Burgeff, 1959; Arditti and Ghani, 2000). Сверхмалые размеры семян, а также однослойное строение семенной оболочки с заключенными внутри неё большой воздушной полостью обеспечивают семенам летучесть и распространение на большие территории (Коломейцева и др., 2012). Хотя на самом деле оказывается, что большинство семян орхидных прорастают и успешнее достигают генеративно-взрослого состояния вблизи материнского растения (Roberts and Dixon, 2008), что некоторые исследователи связывают с уже отлаженными и стабильными функциональными отношениями растений с микоризой на территории произрастания материнского растения. Особенностью семян орхидей в отличие от других однодольных, и вообще цветковых растений, является то, что они не имеют дифференцированного зародыша, а семена не содержат эндосперм, в котором откладываются необходимые для его развития запасные вещества. Поэтому, хотя у представителей некоторых видов (*Bletilla hyacinthine*, *Sobralia macrantha*) была показана возможность собственного самостоятельного прорастания за счёт достаточно развитого зародыша (Черевченко, 1993), в природе семена орхидей нуждаются в грибе-микоризообразователе и прорастают исключительно при тесном симбиотическом взаимодействии с ним.

Взаимодействие с микоризообразующими грибами также является ярким примером биотических связей орхидей, их зависимости от партнёра с одной стороны и его использования без очевидной равноценной выгоды для микромицета с другой. Орхидеи устанавливают мутуалистические отношения с широким кругом эндофитных грибов, среди которых встречаются многие базидиомицеты (*Basidiomycetes*) и даже сморчки и трюфели – *Ascomycetes* (Roberts and Dixon, 2008), а список микоризообразователей включает не менее 35 родов, относящихся к 22 различным семействам и 12 порядкам из этих двух отделов (Rasmussen et al., 2015). Однако особенностью формирования симбиоза с орхидными на этапе прорастания семян зачастую является довольно узкая видоспецифичность микоризообразователей, и даже некоторые симпатрические виды орхидей, произрастающие в популяциях с перекрывающимся ареалом распространения, прорастают с разными представителями микоризообразователей (Rasmussen et al., 2015). Кроме того, установление успешных и стабильных симбиотических отношений с грибом является довольно сложным процессом, зависящим от наличия, доступности и соотношения, например, питательных веществ, в частности сахаров, а отклонение в оптимальных для формирования симбиоза условиях приводит к быстрому переходу к паразитизму гриба, в результате чего проросток растения погибает. Сложный комплекс условий, необходимых для эффективного взаимодействия с микобионтом, и успешного прорастания семян, а кроме того, чрезвычайно продолжительный виргинальный период онтогенеза, определяет тот факт, что из тысяч образующихся семян генеративно-зрелого состояния достигают лишь единицы. Например, у наземной Австралийской орхидеи *Caladenia arenicola* в семенной коробочке содержится около $30\,000 \pm 2000$ семян, из которых прорастает менее 1% (Batty et al., 2001a). Взаимоотношения орхидей с микромицетами на протяжении их развития от проростка до взрослого растения подробно описаны в следующих разделах.

1.1.3. Некоторые особенности вегетативных органов орхидных

Наземные и большинство эпифитных орхидей (в том числе, дендробиумы) характеризуются симподиальным ростом, при котором растение представлено многолетними побегами, горизонтальные части которых образуют корневище (ризом) с чешуевидными листьями, на котором одновременно или очередно развиваются корни, а вертикальные части с нормальными и чешуевидными листьями формируют стебли (Гладкова, 1982). Симподиальные орхидеи также формируют клубневидно-утолщенные стебли, называемые псевдобульбами, в которых накапливается вода и питательные вещества, необходимые во время засушливых периодов. При этом, псевдобульмы

формируют многие эпифитные орхидеи, чаще всего из подсемейства *Epidendroideae*, и относительно немногие наземные их представители (Zotz, 2016). В системе из двух побегов более ранний называют материнским, а следующий за ним – дочерним (Коломейцева, 2017). Как правило, каждое междоузлие побега имеет одну почку и один лист. У орхидей с моноподиальным ростом (например, у фаленопсисов) главный побег растет в одном направлении, образуя сверху новые листья, цветы и придаточные корни, развивающиеся по всей длине побега, а его нижняя часть постепенно отмирает.

Большинство зеленолистных наземных и эпифитных орхидей являются типичными автотрофными растениями. Листья орхидей можно разделить по морфологии на чешуевидные (окружающие междоузлия корневища), влагалищные (прикрывающие генеративные и вегетативные почки), а также настоящие листья с или без влагалищного участка (Коломейцева, 2017). Чешуевидные и влагалищные листья выполняют защитную функцию, предохраняя от механических повреждений и излишнего испарения, в то время как настоящие листья – фотосинтезирующие. У некоторых эпифитов к фотосинтезу также способны и зеленые стебли, и цветы, но главное, – их воздушные корни (Dycus and Knudson, 1957; Chomicki et al., 2015). Зелёная окраска воздушных корней вызвана наличием в их коровой паренхиме хлоропластов (Dycus and Knudson, 1957; Katiyar et al., 1986), что особенно заметно на кончиках растущих корней. На примере некоторых эпифитных орхидей было показано, что содержание хлорофилла варьирует между 9% и 55% от относительного его содержания в листьях (Chomicki et al., 2015). Успешное существование безлистных эпифитных орхидей, например, из рода *Chiloschista* или *Polyrrhiza* обусловлено особенностью их воздушных корней – переходом на особый безустыичный САМ (crassulacean acid metabolism) тип фотосинтеза, характерный также для кактусов и толстянковых. По современной оценке, около 300 видов эпифитных безлистных орхидей полагаются исключительно на корневой фотосинтез (Chomicki et al., 2015). Подобная редукция вегетативных частей этих эпифитных орхидей предполагается необходимой для увеличения экономии питательных веществ внутри растения в условиях адаптации к экстремальным условиям эпифитного существования (Benzing and Ott, 1981).

При этом у зеленолистных орхидей, наоборот, наблюдается иная ситуация, поскольку скорость образования в них углеродсодержащих веществ меньше, чем их расходование при дыхании, то фотосинтез, осуществляемый корнями, становится невыгодным (Dycus and Knudson, 1957; Arditti, 1962) и основной фотосинтез происходит в листьях. По толщине листа выделяют тонколистные и толстолистные орхидеи, в которых можно определить следующие структуры: кутикула, верхний эпидермис, мезофильный слой, васкулярные (проводящие) пучки и нижний эпидермис (Hew and Young, 2004). Для

обоих типов листовых пластин характерно отсутствие устьиц на верхней стороне листа (в верхнем эпидермисе), а тонколистные орхидеи (*Oncidium*, *Cymbidium*), в свою очередь, имеют большее количество устьиц на нижнем эпидермисе по сравнению с толстолистными орхидеями (*Dendrobium*, *Aranda*). Тонколистные орхидеи в большинстве своём осуществляют С3 фотосинтез и используют цикл Кальвина, в то время, как толстолистные орхидеи используют в основном САМ путь фотосинтеза (Goh et al., 1983). Многие исследования вообще показывают, что САМ тип фотосинтеза характерен для большинства эпифитных орхидей, как и в целом для других эпифитных растений.

По мере развития орхидей после их прорастания с грибом-микоризообразователем, зависимость растений от своего симбиотического партнёра меняется, и взрослые фотосинтезирующие растения с хорошо развитыми листьями могут вообще не нуждаться в микобионте (Smith and Read, 2008), как поставщике углерода, однако, зачастую продолжают своё взаимодействие с ним, поскольку микромицет также обеспечивает растения водой и минеральными соединениями и может оказывать роль в защите растения-хозяина от фитопатогенных микроорганизмов. При этом считается, что эпифитные орхидеи имеют намного меньшую зависимость от микоризы, чем наземные виды, среди которых имеется целый ряд растений, перешедших частично (миксотрофия) или полностью на микотрофный тип питания (представители около 100 родов, в том числе *Cephalanthera*, *Epipactis*, *Neottia*) – такие орхидеи могут вообще не иметь листьев или стеблей (например, *Neottia nidus-avis*) и облигатно зависят от микоризы (Waterman and Bidartondo, 2008; Swarts and Dixon, 2009a; 2009b). Подобные взаимодействия и микотрофная специализация орхидей, где нередко растение проявляет себя, как исключительный "эксплуататор", получая углеводы, и водно-минеральные ресурсы от микоризы без такой же взаимной выгоды для гриба (Batty et al., 2002) также являются уникальными для растительного мира. Некоторые исследователи, однако, связывают подобную стратегию орхидей-хозяина с такими факторами, как приуроченность этих растений к узкой группе своих микоризообразователей (например, представители *Sebacinaceae* –микоризообразователи орхидей *Neottia*), которые в свою очередь не являются широко представленными эндофитами и ограничены в своём распространении (Waterman and Bidartondo, 2008). Существует высокая конкуренция среди орхидных за некие "общие виды" и "эндофитную нишу" в целом, а сами микоризообразователи при этом не могут эффективно конкурировать с другими почвенными грибами (Swarts and Dixon, 2009b).

Кроме того, как показывают последние исследования, ключевую роль в подобных биотических взаимоотношениях играет и тот факт, что бесхлорофильные орхидеи всегда

являются участником трёхсторонней микоризной ассоциации, где помимо орхидей-хозяна, её микобионт всегда связан эктомикоризой с деревьями и, как минимум, часть микогетеротрофных орхидей по существу получает весь свой углерод от деревьев через гриб (McKendrick et al. 2000). В то же время, некоторые исследователи смогли показать на примере зелёнолистной миксотрофной орхидеи *Goodyera repens* передачу углеродсодержащих соединений в обратном направлении – от орхидеи к грибу в обмен на витамины, аминокислоты и соединения, содержащие азот и фосфор (Cameron et al., 2007; Waterman and Bidartondo, 2008).

Помимо физиологических отличий между эпифитами и наземными тропическими орхидеями, отмечен ряд отличий и в биохимическом составе (Черевченко и др., 2000). Например, у наземной *Calanthe vestita* выявлена более высокая активность каталазы, цитохромоксидазы и аскорбатоксидазы, а также содержание в листьях хлорофиллов, макро- и микроэлементов по сравнению с эпифитами (*Phalaenopsis amabilis* и *Cymbidium tracyanum*).

Однако одной из выдающихся особенностей эпифитных тропических орхидей является их способность образовывать многочисленные воздушные корни, часть которых обычно погружается в субстрат, накапливающийся в трещинах коры, или внедряются в почву, если орхидеи находятся на низкорослых кустарниках (Sanford and Adanlawo, 1973). Этому способствует тропический климат территорий Индии, Юго-Восточной Азии и Центральной и Южной Америк: длительный вегетационный период и высокая влажность благоприятствуют развитию эпифитных растений. У воздушных корней орхидных отмечена ослабленная геотропическая реакция – они способны ориентироваться в пространстве в различных направлениях (Черевченко и Кушнир, 1986), что также служит их адаптивным приспособлением к эпифитному образу жизни растений.

Корни орхидных, как и других цветковых однодольных растений, имеют первичное строение и образуются при делении клеток апикальной меристемы: из относительно однородного слоя поверхностных клеток дерматогена формируется покровная ткань (ризодерма), клетки корневого чехлика, а также клетки наружного эпидермиса (веламен); из промежуточного слоя инициальных клеток меристемы образуется экзодерма, коровая паренхима и эндодерма, а из центральной части меристемы (плерома) формируется клетки центрального цилиндра корня. Считается, что корни наземных орхидей имеют больший диаметр, чем у эпифитных видов, что может быть связано с запасанием питательных веществ в субстратных корнях (Zots, 1999; Moreira and Isaias, 2008), функция, которая у большинства эпифитов перенесена в псевдобульбы. Конец растущего корня заканчивается корневым чехликом, который помимо функции механической защиты меристематических

тканей характеризуется высокой секреторной активностью (Mollenhauer, 1967). Кроме того, растущий апекс корня имеет обычно зелёный цвет за счёт содержания в нем хлоропластов, которые маскируется позднее мёртвыми клетками веламена, имеющими серебристо-серый оттенок (Dycus and Knudson, 1957; Aschan and Pfanz, 2003).

Веламен представляет собой губчатую многослойную ткань, формирующуюся в результате многократных продольных делений клеток эпидермиса, и может иметь от одного до двадцати и более слоёв, при этом для каждого вида орхидей характерно определенное их количество (Pridgeon, 1986b). При повышении влажности воздуха число слоев заметно не меняется, но составляющие веламен клетки увеличиваются в размерах, а, следовательно, и общая толщина самого веламена изменяется значительно (Dycus and Knudson, 1957). Веламен состоит из крупных клеток, потерявших протопласт и заполненных воздухом (Pridgeon, 1987). Самый дальний от центра слой веламена при подходящих условиях окружающей среды может образовывать корневые волоски. Изнутри веламен ограничен однослойной экзодермой, содержащей толстостенные опробковевшие клетки и пропускные клетки, через которые впитывается вода и растворы солей. По мнению некоторых авторов (Went, 1940), во время дождя веламен впитывает стекающие по веткам дерева первые порции воды, содержащие растворенные минеральные соли, и таким образом, поглощает и сохраняет их, выполняя тем самым функцию резервуара. Последние исследования (Zotz, 2013) показывают, что вода в течение нескольких секунд впитывается в веламен, хотя более ранние данные (Dycus and Knudson, 1957) свидетельствовали, что для некоторых эфитов, в частности *Vanda* sp., требуется около 2-х часов для достижения 90% сатурации. Данные обоих исследований, однако, оказались сходными относительно того, что вода удерживалась в веламене в течение одного часа; более того, на примере корней *Phalaenopsis*, было показано что корни удерживали отрицательно заряженные йоны фосфатов даже после 4 часов после обработки, тогда как корни, лишённые веламена, теряли около 80% P_i (Zotz, 2013). Сходные результаты были получены и по положительно заряженным ионам (на примере Rb^+), в то время как незаряженные молекулы (глюкоза) удерживались исключительно живыми корнями, в то время как мёртвые, лишённые веламена корни, теряли около 80% исходной глюкозы уже после 30 минут.

По мере необходимости, вода из веламена поступает в систему водоснабжения и проводящих тканей растения. Физиологической особенностью веламена является наличие в нем перфораций (отверстия округлой или эллиптической формы), позволяющих мертвым клеткам веламена быстро впитывать воду и функционировать наподобие губки. При уменьшении влажности и подсыхании корня отверстия в веламене расширяются,

занимая иногда до 50% общей площади клеток веламена, предотвращая тем самым его разрушение (Pridgeon, 1986a). Другими функциями веламена является его участие в газообмене (поглощение и фиксация CO₂ днём при C₃ типе фотосинтеза и ночью при активности САМ-типа фотосинтеза; Goh et al., 1983), а также механическая защита корня и отражение интенсивной солнечной радиации за счёт серебристо-светлой окраски веламена, что предотвращает перегрев внутренних тканей корня (Pridgeon, 1987). Однако фундаментальная роль веламена в водном обмене первостепенна для эпифитных орхидей поскольку именно он обеспечивает и облегчает быструю абсорбцию воды и питательных веществ, в то время как у наземных орхидей с их субстратными корнями и отсутствием развитого веламена транспортировка веществ происходит медленнее, так как они находятся в доступности в субстрате (Moreira and Isaias, 2008). Как только воздушные корни проникают в субстрат или же когда густые сплетения воздушных корней, напоподобие бороды, образуют похожие на гнезда структуры, в которых собирается гумус (Черевченко и Кушнир, 1986) и доступность субстрата таким образом возрастает, корни начинают функционировать как обычные поглощающие субстратные корни наземного растения, покрытые многослойным эпидермисом, при этом они теряют веламен (Ducus and Knudson, 1957).

В коровой паренхиме корней, состоящей из живых клеток растения, происходит активный обмен веществ, а также может осуществляться фотосинтез и взаимодействие с микоризным грибом (формируются пелотоны – сферические кластеры перевариваемых гиф гриба); в клетках коровой паренхимы откладываются запасные вещества, например, крахмал. Коровая паренхима также участвует в переносе и удержании воды и растворённых в ней питательных веществ и ассимилятов. При этом крахмал запасается в амилопластах, округлых пластидах (лейкопластах), которыми зачастую бывают заполнены корни орхидных, хотя, например, в корнях, обильно заселённых микоризным грибом, подобные амилопластные структуры обнаруживаются редко или вовсе не обнаруживаются, что было показано на примере ряда наземных орхидей из родов *Diceratostele*, *Corymborkis*, *Cranichis*, *Goodyera* (Stern et al., 1993). В коровой паренхиме также откладываются кристаллы рафидов оксалата кальция, которые формируют цилиндрические пучки, ориентированные в различных направлениях, обычно располагаясь в средних слоях коровой паренхимы (Shushan, 1959). Их роль рассматривают как нейтрализацию избытка кальция, поглощаемого из субстрата (Залукаева, 1990), так как на гидропонной культуре в отсутствии ионов Ca²⁺ рафиды не обнаруживаются.

Экзодерма и эндодерма, ограничивающие коровую паренхиму с внешнего и внутреннего слоёв, соответственно, выполняют, прежде всего, регулирующие функции и

отвечают за прохождение различных веществ в радиальном направлении. Окружающая стеллу (центральный цилиндр) эндодерма имеет в своём строении пояски Каспари – лигнифицированные утолщения, смыкающиеся друг с другом, что делает её непроницаемой для растворов, поэтому из коровой паренхимы вещества попадают в стеллу и выходят из неё только по симпласту, то есть через живые протопласты клеток эндодермы и под их контролем. В то время как у тропических наземных орхидей (например, из родов *Habenaria*, *Prescottia* и *Sauroglossum*) пояски Каспари имеют типичное строение и могут быть даже незаметными, у эпифитных орхидей (например, у представителей родов *Epidendrum*, *Encyclia*, *Polystachya*, *Sophronitis*) в клетках эндодермы из откладываемых суберина и лигнина зачастую формируется вторичное утолщение, располагающееся над поясками Каспари (Moreira and Isaias, 2008), что обеспечивает растения дополнительным барьером для продвижения воды и питательных веществ (Ma and Peterson, 2003). Центральный цилиндр орхидей представлен полиархным типом – многолучевой (20 и более) ксилемой, с незаметными или наоборот хорошо различимыми тяжами ксилемы и флоэмы, которые могут чередоваться, а осевая часть представлена круглыми клетками с толстыми стенками и уменьшенным межклеточным пространством, имеющим треугольную форму (Moreira and Isaias, 2008).

Таким образом, строение вегетативных частей орхидей также отражает уникальность их биологии, которая в совокупности со сложным комплексом биотических связей и зависимости, иногда абсолютной, от других живых организмов, делает эти растения крайне уязвимыми к любым, даже минимальным, изменениям окружающей среды. В связи с этим поиск подходов для сохранения генофонда и приумножения численности этих растений в искусственных условиях в настоящее время является одним из наиболее актуальных направлений в биотехнологии орхидных.

1.1.4. Размножение орхидей и сохранение их генофонда

По мнению современных исследователей биологии орхидей, только интегрированный подход, фокусирующийся на исследованиях в области экологии, генетики и биотических связях орхидей, также как на их *ex situ* проращивании и культивировании, смогут стать эффективной стратегией для сохранения биоразнообразия этих растений (Swarts and Dixon 2009a). *In situ* исследования включают наблюдение в динамике за экотопом, в котором произрастают дикие популяции орхидных, учитывая взаимодействия растений с их партнёрами – опылителями и микоризными грибами. Методы молекулярной генетики позволили вывить ряд закономерностей и исследовать такие вопросы, как образование генетических вариаций внутри и между разными

популяциями орхидей, более точно оценить и структурировать великое разнообразие видов этих растений, провести уточнение филогенетической иерархии и оценить эволюционный процесс, дрейф генов, влияние имбридинга и других факторов на состав и сохранность дикорастущих популяций (Fay and Krauss, 2003).

Одной из острых проблем при реинтродукции выращенных в искусственных условиях (*ex situ*) растений в дикую природу является их слабая адаптация к условиям внешней среды при переносе из аксеничной культуры в почву, где значительная часть саженцев погибает (Swarts and Dixon, 2009a). Особенно остро этот вопрос стоит при высаживании наземных орхидей, чья реинтродукция и выживаемость в природе намного хуже, чем у эпифитных видов *Orchideaceae*. В последнее время многие исследователи в этой области обращают внимание на необходимость селекции подходящего для культивируемой орхидеи микоризообразующего эндوفитного гриба и создания условий для их стабильного и успешного сосуществования; растения с развитой микоризой намного успешнее приживаются и адаптируются в естественной среде после реинтродукции (Batty et al., 2006).

Отдельным направлением исследований в области сохранения генофонда орхидей является криоконсервация и длительное хранение их семян, а также создание банка семян семейства *Orchideaceae*. Например, криоконсервацию полиний и протокормов успешно применяют для проращивания многих видов из рода *Dendrobium* (Vendrame et al., 2008; Galdiano et al., 2012; Коломейцева и др., 2012). Для криоконсервации при температуре – 20°C или в жидком азоте (– 196°C) необходимо низкое содержание воды в обрабатываемом материале, для чего используют дополнительное высушивание растительного материала, а также использование криопротекторов, которые повышают эффективность длительного хранения в таких условиях (Vendrame et al., 2008). Более того, для редких представителей орхидных предлагается криосохранять не только семена и протокормы, но и их микоризообразующие грибы, что было успешно продемонстрировано на примере редких и исчезающих представителей наземных Австралийских орхидей – *Caladenia*, *Diuris*, *Pterostylis*, *Thelymitra* (Batty et al., 2001b). Несмотря на то что многие коммерческие гибриды орхидей выращивают, используя моноклональные технологии, семенное размножение орхидных превалирует в научно-исследовательской работе для сохранения генофонда дикорастущих популяций и приумножения их численности. Для получения новых коммерческих гибридов также используют семенное размножение орхидей (Teixeira da Silva et al., 2015).

Впервые семена орхидей были описаны во второй половине семнадцатого века, их проростки были получены к 1804 г., и только в 1899 г., практически одновременно, Н.

Бернар (N. Bernard) и Г. Бургефф (H. Burgeff) установили, что грибы, обнаруженные в корнях орхидей, не являются патогенами, как считалось до этого момента, а наоборот, симбионтами (Arditti, 1984). Открытие роли микоризного гриба в прорастании орхидных позволило Н. Бернару разработать технику *in vitro* симбиотического проращивания семян сразу нескольких орхидей. При этом было отмечено, что семенная кожура не была препятствием при взаимодействии с микоризным грибом, гифы которого проникали через неё к зародышу. Затем следующим этапом стало открытие технологии их асимбиотического проращивания, которую в 1922 г. предложил Л. Кнудсон (L. Knudson), предположив, что роль гриба может заключаться в расщеплении крахмала и предложив использовать уже готовые углеводы, добавляя их к питательной среде. Этот метод позволил значительно расширить возможности размножения и гибридизации орхидей. Трудности, возникающие при проращивании семян некоторых их видов, объясняются отсутствием информации о веществах, необходимых для роста и развития. Поэтому зачастую используют среды, включающие "добавки неопределенного состава": кокосовое молоко, томатный сок, гомогенат бананов или экстракт, полученный из мицелия симбиотических грибов (Fonnesbech, 1972; Черевченко и Кушнир, 1986; Arditti, 1991).

Для некоторых северных видов наземных орхидей было показано, что их семена одинаково хорошо прорастают как при использовании микоризообразователя, так и в асимбиотической культуре (Rasmussen, 1992; 1995). Вместе с тем, для таких растений было установлено, что процент прорастания их семян в симбиозе с микобионтом значительно больше, чем в асимбиотической культуре. В целом, семена орхидей умеренных широт прорастают в искусственных условиях значительно медленнее и хуже, чем семена тропических видов, что может объясняться более тесной связью этих видов с симбиотическими грибами и даже их полной зависимостью от микромицета (Arditti et al., 1985). Кроме того, в отличие от наземных орхидей, семена эпифитных орхидей не содержат ингибиторов прорастания и могут легко прорасти *in vitro* при достаточной влажности, подходящей температуре и наличии необходимых питательных веществ в окружающем субстрате (Rasmussen, 1995; Swarts and Dixon, 2009a, b). Семенам же большинства орхидей европейской части России (подсемейство *Orchidoideae*) требуется дополнительная обработка для удаления ингибиторов прорастания (Коломейцева и др., 2012). В то же время предпосевная обработка требуется и наземным орхидеям, произрастающим в Центральной и Южной Америке, Африке и Австралии в условиях с чередованием засушливых периодов, например, *Bletia*, *Diuris*, *Eulophia*.

Говоря о развитии зародыша орхидей во время его прорастания необходимо сказать об особой структуре, образуемой на начальной стадии внесеменного развития

орхидей – протокорме. Это округлое тело, размером от 0,1 до 2 мм, характерное только для орхидей и выполняющее функцию накопления питательных веществ и воды (Arditti, 1991). Развитие протокорма завершается формированием апексов побега и корня (Блинова, 1998). При этом для набухания семени и образования протокорма достаточно присутствия воды и определенной температуры: увеличение размеров зародыша происходит не за счет клеточного деления, а за счет увеличения размеров клеток в немеристематической зоне (Arditti, 1991; Rasmussen and Rasmussen, 1991). Раздутые зародыши, как у наземных, так и эпифитных видов тропических орхидей, наблюдали после выдерживания их семян в течение 3 недель в стерильной дистиллированной воде (Burgeff, 1959). Однако для дальнейшего развития им требуются внешние источники углеводов, различные микро- и макроэлементы, гормоны и витамины, а также оптимальная кислотность субстрата. Несмотря на то что по сравнению с наземными орхидеями, протокормы эпифитных видов рано переходят к автотрофному питанию и стадия зависимости от внешнего источника углерода у некоторых из них может даже не наступить, или же они быстро ее минуют (Benzing and Friedman, 1981), тем не менее, в природе необходимым условием для успешного прорастания семян всех орхидных является именно формирование симбиотических связей с грибом-микоризообразователем.

1.1.4.1. Асимбиотическое проращивание семян орхидей *in vitro*

При асимбиотическом проращивании семян орхидей *in vitro* все процедуры необходимо проводить в асептических условиях во избежание микробной или грибной контаминации из-за богатых питательных сред, используемых для проращивания семян орхидей, и длительности процесса их прорастания и дальнейшего развития (до момента перевода в горшечную культуру может пройти до двух лет и более). Поэтому, также в настоящее время, несмотря на ряд решённых вопросов, проращивание орхидей является сложным, длительным и трудоёмким процессом. В начале процедуры семенную коробочку промывают в проточной водопроводной воде, а затем используют стерилизаны – например, средства, содержащие активный хлор (гипохлорит кальция или натрия, хлорная известь, хлорамин, 10-25%-ные растворы, 20-90 минут), соединения ртути (сулема, диацид) или пероксид водорода. Плоды протирают спиртовым раствором (70-90%) или погружают в спирт от 1 до 10 минут, затем кратко обжигая в пламени (Parthibhan et al., 2012; Коломейцева и др., 2012). Иногда добавляют бактерицидные и фунгицидные вещества (например, антимикотик "Bavistin", или антибиотики стрептомицин или ампициллин). Различают посев незрелых семян из нераскрытых

коробочек или посев уже зрелых семян (Коломейцева и др., 2012); если семена уже высыпались из коробочки, то их стерилизуют отдельно, также проводя обработку в растворах стерилизантов, затем отмывая несколько раз (3-5) в стерильной дистиллированной воде. Используемые стерилизанты и время обработки ими может значительно различаться и всегда требует подбора оптимальных условий для каждого отдельного случая, поскольку эффективность стерилизации также зависит и от степени зрелости плода и содержащихся в нём семян, а также от их зрелости (Teixeira da Silva et al., 2015b). При посеве зрелых семян наземных орхидей из умеренной зоны (*Cypripedium*, *Epipactis*, *Cephalanthera*) необходима их предварительная обработка 1,5%-ным или 2%-ным раствором серной кислоты и/или механическое повреждение семенной кожуры, а затем длительное промывание в дистиллированной воде для выведения их из состояния покоя (Коломейцева и др., 2012) или же стратификация – нахождения семян при 4-8 °C от 4-х недель до 3-х месяцев (Smresiu and Currah, 1989; Rasmussen, 1992).

Питательные среды для проращивания семян содержат следующие основные компоненты: источник углерода, макро- и микроэлементы, витамины и фитогормоны (рис. 1-4). Чаще всего в качестве источника углерода используют углеводы: сахарозу, реже фруктозу, глюкозу, мальтозу (Arditti, 1991). Faria с соавторами (2004), протестировав различные концентрации сахарозы (0, 5, 10, 20, 30 и 60 г/л) для культивирования *in vitro* проростков *Dendrobium nobile*, выявили, что наилучшее развитие растений после 120 дней культивирования происходило при добавлении в среду 60 г/л сахарозы. Минеральные соли должны содержать источник азота (нитраты, нитриты или соли аммония), фосфора (фосфаты), серы (сульфаты), железа (используют фосфат, цитрат, тартрат железа, железоаммонийные квасцы или хелаты), а также растворимые соли калия, натрия, кальция, магния (Коломейцева и др., 2012). Нитраты и аммонийные соли подходят для семян и проростков, хотя некоторые орхидеи неспособны использовать нитраты в течение первых 60 дней (Arditti, 1991). В качестве факторов роста используют витамины группы В [В₁ (тиамин), В₂(рибофлавин), В₆ (пиридоксин), В₇ (биотин), В₉ (фолиевая кислота), В₁₂ (цианокобаламин)], витамин С (аскорбиновая кислота), РР (никотиновая кислота).

Для регуляции процессов дифференциации клеток и тканей, индукции деления клеток и гистогенеза, для стимуляции развития растения используют стимуляторы роста растений – ауксины, цитокинины, гиббереллины, причём как отдельно, так и в различных их сочетаниях (Arditti, 1984; Teixeira da Silva et al. 2015b). В биотехнологии и агротехнике орхидных используют следующие вещества: ауксины (ИУК – индолил-3-уксусная кислота; ИМК – индолил-3-масляная кислота; НУК – α-нафтилуksусная кислота; 2,4-Д – 2,4-дихлорфенилуksусная кислота), цитокинины (кинетин – 6-фурфуриламинопурин,

зеатин, 6-БАП – 6-бензиламинопурин), гиббериллины (ГК₃ – гибберелловая кислота; Коломейцева и др., 2012; Teixeira da Silva et al., 2015b). В том случае, когда необходимые для роста растения вещества не определены, используют такие добавки, как кокосовое молоко, гомогенат бананов или томатный или картофельный соки, которые добавляют в количестве 5-15% по объёму (Teixeira da Silva, 2013). Также к средам могут добавлять дрожжевой экстракт, казеин, пептон или триптон (от 0,01 до 0,1 г/л). Основными питательными средами для проращивания орхидей являются среды Кнудсон-С (Knudson-S) и Мурасига-Скуга (Murashige, Skoog, MS), которые используют в оригинальной прописи или же разбавленной в два, четыре и даже 8 раз. Кроме того, широко применяют разнообразные модификации этих сред с изменённым содержанием и вариациями по макро- и микроэлементам, витаминам и стимуляторам роста (Коломейцева и др., 2012; Teixeira da Silva et al., 2015b).

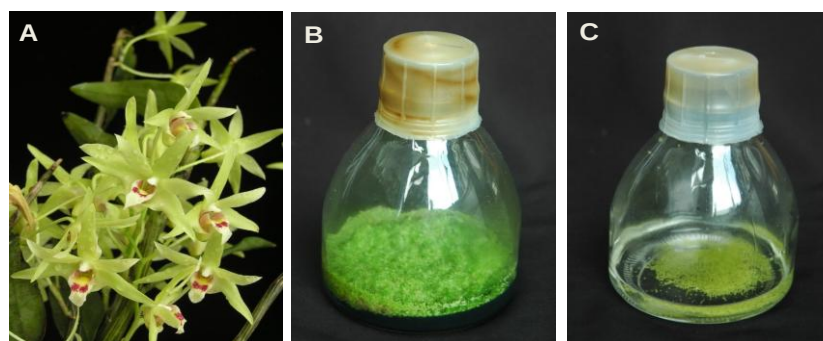


Рисунок 1. А. 1 *In vitro* проращивание и развитие *Dendrobium officinale* Kimura & Migo. (А) Цветущее растение; (В) асимбиотическое проращивание на N₆ плотной среде, содержащей 10% кокосового сока, 0.2 мг/л α-нафталенуксусной кислоты (НУК), 0.65 г/л агара; (С) асимбиотическое проращивание на N₆ жидкой среде, содержащей 0.2 мг/л НУК, 10% CW (источник: Teixeira da Silva et al., 2015).

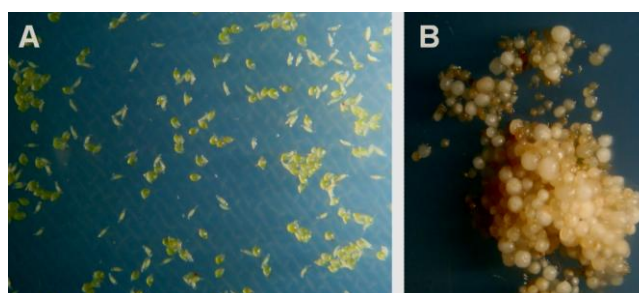


Рисунок 2. Семена *Dendrobium aqueum*, набухающие при поглощении воды на голодной агаризованной среде без добавления сахаров, питательных веществ и добавок неопределённого состава (А). Набухшие семена *D. aqueum* на среде Мурасига-Скуга (с макроэлементами, разбавленными в 2 раза) в темноте после 4 месяцев культивирования (В) (источник: Teixeira da Silva et al., 2015b).

Некоторые исследователи (McKendrick, 2000b) считают, что при проращивании новых видов орхидей *in vitro* необходимо обязательно использовать как минимум исходную, а также разбавленную в два раза питательные среды для лучшего прораствания

семян. Выбор режима стерилизации питательных сред зависит от их состава; довольно часто компоненты среды стерилизуют отдельно (витамины и фитогормоны – фильтрованием, сахара и добавки неопределенного состава при 0,5 ати, а минеральный фон – при 1 ати).

Среди абиотических факторов качество и интенсивность освещения (от полной темноты до освещения 6000 люкс), его периодичность (чаще всего используют 12 часовой световой период) и доступность света является еще одним критерием, который может существенно влиять на прорастание семян орхидей (Parthibhan et al., 2012). Несмотря на то, что для многих наземных видов орхидей умеренных широт прорастание семян показано исключительно в полной темноте (Harvais, 1973), некоторые виды из родов *Goodyera*, *Cypripedium*, *Dactylorhiza* и *Malaxis* прорастают одинаково хорошо как в темноте, так и на свету (Harvais, 1973; Arditti et al., 1981; Rasmussen, Rasmussen, 1991; Виноградова, 1999).

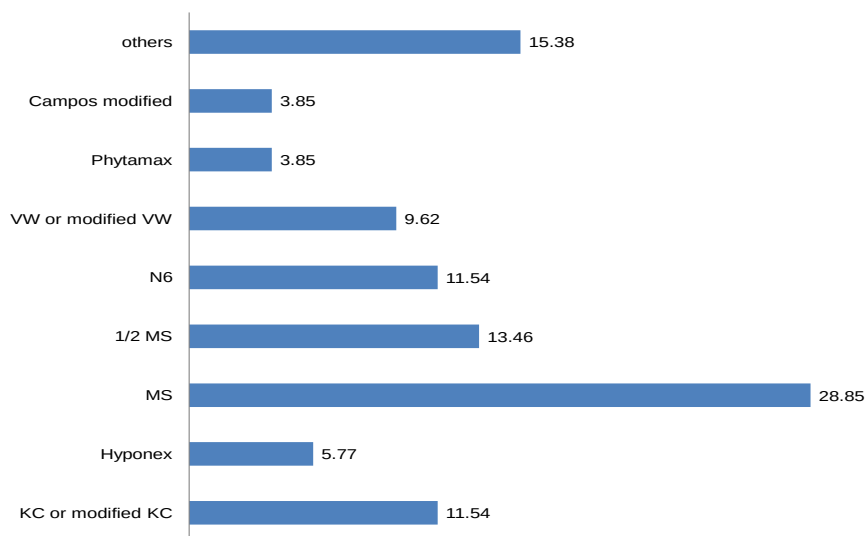


Рисунок 3. Процентный состав (по опубликованным к 2015 году статьям) разнообразия питательных сред, использованных для асимбиотического проращивания семян *Dendrobium*. Обозначения: Campos modified – модифицированная среда Campos; KC – среда Knudson's C; MS – среда Murashige and Skoog и эта же среда, с разбавленным в два раза составом макроэлементов (1/2 MS); N₆ – среда Chu; Phytamax; VW – среда Vacin and Went. Суммарный процентный состав превышает 100%, так как авторы указанных сред рекомендуют использовать более, чем одну среду в одной опубликованной статье (источник: Teixeira da Silva et al., 2015b).

Семена тропических эпифитов также могут прорасти и на свету, и в темноте, однако, в течение первых 50 дней они не могут фотосинтезировать (Arditti, 1991). В ряде случаев в питательные среды добавляют активированный уголь, положительные свойства которого связывают именно с затемнением среды (для наземных видов это особенно важно для роста корневых кончиков), а также улучшением аэрации (Fonnesbech, 1972;

Черевченко и Кушнир, 1986; Arditti, 1991). Температура для развития семян тропических видов лежит в пределах от 2 до 40°C, при этом оптимум – это 15–25°C (Arditti, 1991). Большинство данных по семенному проращиванию видов рода *Dendrobium* указывают на температуры от 22 до 28 °C (Soares et al., 2013; Teixeira da Silva et al., 2015b). Наилучшим рН среды для прорастания семян считается 4,8 – 5,2, хотя границы роста растений лежат в пределах от 3,6 до 7,6 (Arditti, 1991). Использование агаризованных сред (от 4 до 18 г/л агар-агара) позволило повысить прорастание многих видов орхидей до 24 – 95% (Никишина и др., 2001). Агар могут иногда заменять на некоторые другие гелирующие агенты. Так, использование 7 г/л агар-агара совместно с 7 г/л кукурузного крахмала приводит к лучшему развитию побегов и корней *D. nobile*. К другим факторам, влияющим на прорастания семян орхидей, можно отнести форму культивационных сосудов: так, еще Л.Кнудсон заметил, что в колбах они прорастают лучше, чем в пробирках из-за большей доступности воздуха (Knudson, 1922).

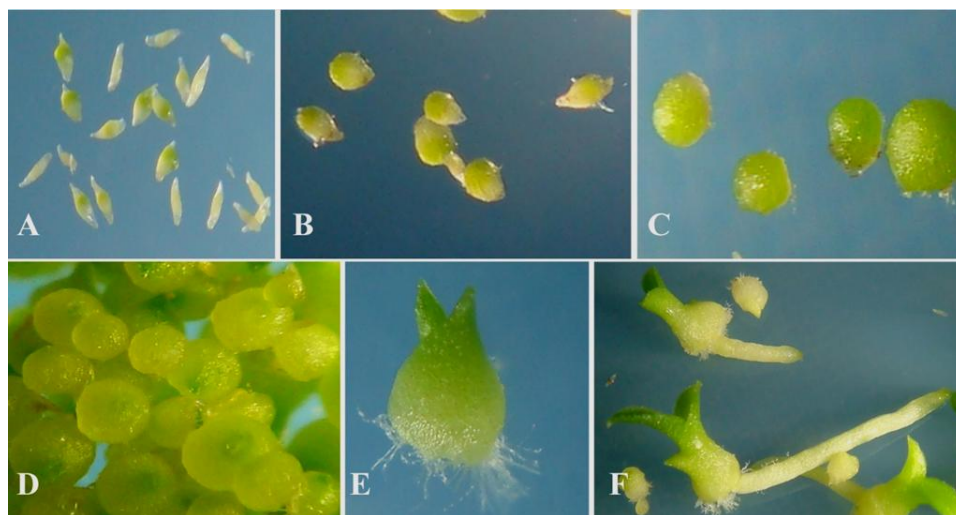


Рисунок 4. Асимбиотическое проращивание и ранние стадии развития семян *Dendrobium aqueum* (Lindley) на среде MS (половинный состав макроэлементов) при 16-ти часовом светопериоде при $23 \pm 2^\circ\text{C}$. А: набухшие семена (зиготический зародыш), развивающиеся семена окрашиваются в зелёный цвет (становятся активно фотосинтезирующими) после 15 сут культивирования. Набухшие семена с лопнувшей семенной кожурой после 35 сут культивирования (В) и после 57 сут культивирования (С). D: протокормы после 75 сут культивирования с видимыми темно-зелёными участками образующегося побега. E: протокормы с развитым побегом и ризоидами (107 сут культивирования). F: Проростки с развитым корнем после 126 сут культивирования (источник: Teixeira da Silva et al., 2015b).

Говоря о стадиях развития семян орхидей *in vitro*, необходимо сказать, что на основании морфо-физиологических признаков можно выделить несколько стадий в онтогенезе орхидных. Так, периоды онтогенеза и соответствующие им возрастные

состояния можно разделить на эмбриональный (зародыш), латентный (семя), виргинильный (проросток, ювенильное, имматурное и виргинильное растения), генеративный (генеративное растение) и сенильный (сенильное растение; Работнов, 1950; Коломейцева и др., 2012). Однако из-за того, что зачастую сложно выделить одну конкретную стадию из-за протекающих процессов и метаморфозов в развитии растения, некоторые исследователи выделяют явление голометаморфоза, напоминающего метаморфоз насекомых, – процесс, при котором одномоментно можно выделить несколько состояний (метаморфозов). В связи с этим некоторые исследователи выделяют два этапа в развитии проростка – образование протосомы (вегетативное тело постсеменного развития орхидных, способное в естественных условиях (*in situ*) осуществлять взаимодействие с микоризным партнёром), и проторизом, когда проросток уже формирует видоизмененный стебель (одноосный побег, как у моноподиальных орхидей) или систему стеблей (как у симподиально нарастающих орхидных), а также корни и фотосинтезирующие листья (Коломейцева и др., 2012).

Другой уникальной особенностью протокормов орхидных является их возможность отпочковывать вторичные протокормы (первичным называется протокорм, развивающийся непосредственно из зародыша). Протокорм – это начальная стадия развития проростка, - прорастание недифференцированного зародыша (Крюков и др., 2011), учитывая что сам термин "прорастание" для орхидей не подразумевает образование корешка. Наличие нескольких меристематических центров позволяет образовывать новые вторичные протокормы, образуя иногда конгломераты, которые в свою очередь могут или обособиться в отдельный проросток с побегом и придаточными корнями, или продолжить отпочковывать новые протокормы (Залукаева, 1990б; Arditti, 1991). Первичные протокормы могут иметь округлую, сферическую или дисковидную формы и имеют две различимые зоны – базальную, состоящую из крупных вакуолизированных клеток, и апикальную, состоящую из мелких делящихся клеток, из которых впоследствии у эпифитных орхидей развиваются хлорофиллоносные ткани. Проторизом, преобразующийся впоследствии в стебель, также развивается из апекса протокорма.

В иностранной литературе принято выделять 5-6 стадий раннего семенного развития орхидей, которые приведены на примере прорастающих семян *Dendrobium nobile* на рисунке 5.

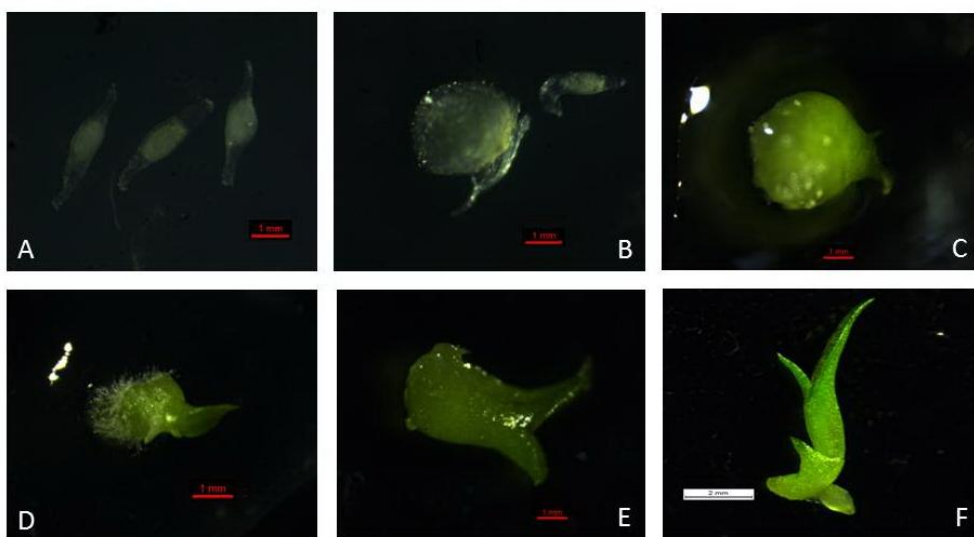


Рисунок 5. Стадии прорастания семян и развития проростков *Dendrobium nobile*. А: стадия 0 – семена с видимым зиготическим эмбрионом внутри, семенная кожура (теста) интактна; В: стадия 1 – разрыв тесты, увеличенный в объёме зародыш (прорастание семени); С: стадия 2 – протококорм с появившимся побегом (протомеристема) и ризоидами; D: стадия 3 – появление и удлинение первого листа; Е: стадия 4 – развитие дополнительных листьев и появление корня; F: стадия 5 – наличие 2-х и более листьев и корней (проросток) (источник: Teixeira da Silva et al., 2015b).

В середине шестидесятих годов XX века началось микроклональное размножение орхидей с помощью бесконечного деления кусочка меристематической ткани, взятой из почки, побега, цветоноса или корня растения, что увеличило в сотни и тысячи раз производство природных видов и искусственно полученных гибридов, заметно снизив рыночную цену этих растений, сделав орхидеи доступными (Gu et al., 1987a; Коломейцева, 2001). Одним из преимуществ микроклонального размножения, кроме того, является возможность получать безвирусные варианты растений. На настоящий момент, выращивание орхидей – это не только хобби, но и крупный международный бизнес, охватывающий около 8% мировой торговли цветами и даже способный изменить ландшафты стран, производящих эти цветы для срезки, как горшечные культуры или же для использования из в народной медицине (Chugh et al., 2009). Например, к 2005 году продажа горшечных орхидей только в США составила 18 миллионов штук, при этом более 75% всех растений в настоящее время составляют *Phalaenopsis* sp., которые заменили в 1980-х годах более сложных в домашнем культивировании представителей рода *Cattleya* (Griesbach, 2002). Другими видами, к которым применяют микроклональное размножение в коммерческих масштабах являются *Dendrobium*, *Vanda*, *Paphiopedilum*, *Oncidium*, *Phalaenopsis* и *Cymbidium*, а также *Vanilla*, используемая как специя (Chugh et al., 2009).

Однако основные трудности микроклонального культивирования орхидей, не позволяющие унифицировать эту процедуру, связаны с целым рядом факторов: отсутствием какого-либо единого протокола по выращиванию эксплантов, связанного и с различием биологии и колоссальным разнообразием видового состава растений этого семейства, и с различным составом и дороговизной питательных сред, включающих вариации используемых стимуляторов роста растений и их комбинаций, а также добавок неопределённого состава (пептон, кокосовый или томатный соки, картофельный и банановый гомогенаты); кроме того, значительное влияние имеет источник эксплантов (различные части растений) и их возраст (Tanaka et al., 1988; Griesbach, 2002). Экспланты, полученные от взрослых генеративно-зрелых растений, выделяют с эксудатами фенольные соединения, содержащиеся в орхидных, – такие эксудаты становятся токсичными после их окисления на воздухе и по сути происходит автоингибирование дальнейшего деления и роста клеток каллусной ткани (Compton and Preece, 1986). Добавление активированного угля, поглощающего фенольные соединения, помогает преодолеть этот ингибиторный эффект.

Еще одним этапом, служащим препятствием к успешному применению микроклональной техники – это стадия пересадки растения из исходных *in vitro* условий в условия *ex vitro* и акклиматизация в условиях горшечной культуры (Hazarika, 2003). На сегодняшний момент, именно этот этап становится труднопреодолимым "бутылочным горлышком" для большинства стерильно выращенных "гнотобиотических" орхидей и многие из полученных растений погибают при пересадке. Многие авторы пытались найти решение этой проблемы в подборе оптимального субстрата, добавляя влагоудерживающие компоненты, такие как мох-сфагнум, кокосовое волокно, вермикулит или даже вспененный полиэтилен (Kishor et al., 2006; Chugh et al., 2009). Однако в последнее время исследователи стали обращать внимание на то, что адаптация проростков значительно повышается у тех из них, кто формирует до этапа пересадки биотические консортивные связи с партнёрами-микроорганизмами, причём не только с эндомикоризными грибами, но и бактериями, что было показано при использовании штаммов *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. (Galdiano Jr. et al., 2011) и *Paenibacillus* sp. (Faria et al., 2013) при бактеризации каттлеи (*Cattleya* sp.) в *in vitro* условиях проращивания семян и дальнейшей высадке растений. Наилучшим образом, однако, взаимодействие семян, проростков, ювенильных и генеративно-зрелых растений из семейства *Orchidaceae* изучено на примере симбиотических отношений орхидей с микоризообразующими грибами, о чём речь пойдёт в следующей главе.

1.1.4.2. Микориза орхидных

Многие представители высших (сосудистых) растений эволюционировали совместно с симбиотическими микромицетами, колонизирующими их корневую систему, такое тесное взаимовыгодное ассоциативное взаимодействие партнёров привело к образованию микоризы (Peterson and Farquhar, 1994). Грибы-микоризообразователи, вступающие в симбиотические отношения с растением-хозяином, могут формировать эктотрофную (наружную) и/или эндотрофную (внутреннюю) микоризу (Agrios, 1997).

В орхидных микоризах транспорт углеводов происходит от гриба к растению (Dijk and Eck, 1995; Zelmer and Currah, 1995), в то время как грибы, формирующие, например, везикулярно-арбускулярные микоризы с деревьями и кустарниками, получают большинство соединений углерода, наоборот, от растения-хозяина (Ames and Bethlenfalvay, 1987). Среди орхидных выделяют два основных типа эндотрофных микориз: птиофаговую и толипофаговую (Burgeff, 1959). Эумицетная птиофаговая эндомикориза встречается, например, у холомикотрофных (нефотосинтезирующих) орхидей (Burgeff, 1959; Селиванов, 1981) и представляет собой переваривание растением особых телец (птиосом), возникающих за счет излияния грибной плазмы в полость клетки растения-хозяина. Толипофаговая эндомикориза характерна для большинства наземных и эпифитных видов автотрофных зеленолистных (фотосинтезирующих) орхидей. Залукаевой Г.Л. (1990) на примере эпифитной орхидеи *Coelogyne cristata* описаны анатомические особенности толипофаговой микоризы эпифитных орхидных (рис. 6).

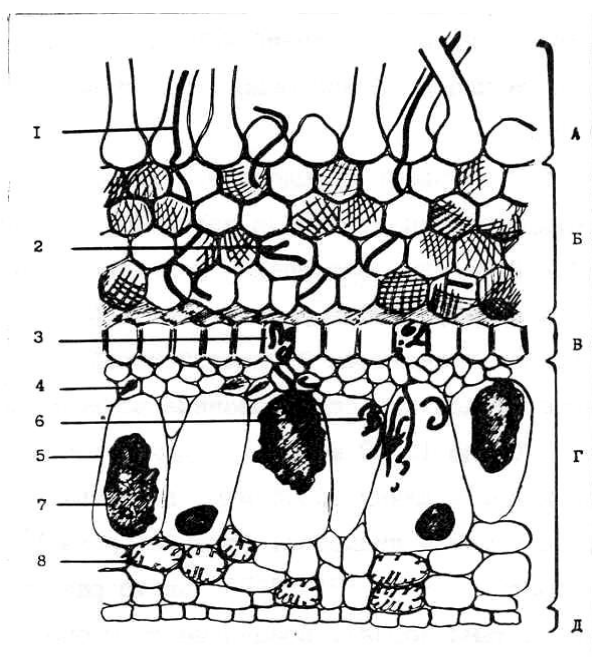


Рисунок 6. Схема распространения эндомикоризного гриба в тканях корня *Coelogyne cristata* (источник: Залукаева, 1990). А - Д – ткани корня (эпивеламен, веламен, экзодерма, коровая паренхима, эндодерма); 1, 2 – проникновение гиф эндомикоризного гриба в клетки веламена; 3 – проникновение гиф эндомикоризного гриба через пропускные клетки экзодермы; 4 – кристаллы оксалата кальция в клетках коровой паренхимы; 5 – гипертрофированные клетки коровой паренхимы; 6 – гифы эндомикоризного гриба в клетках коровой паренхимы; 7 – пелотоны; 8 – клетки коровой паренхимы с утолщенными стенками.

В субстратные корни взрослого растения гифы микромицета могут проникать, например, через корневые волоски. В крупных гипертрофированных клетках коровой паренхимы гифы "перевариваются" и можно видеть обесструктурирование биомассы гриба, образование плотного зернистого сгустка – пелотона, который состоит из перекрученных, спиральных гиф мицелия (Burgeff, 1959; Селиванов, 1981; Peterson and Currah, 1990, Залукаева, 1990; Beyrle et al., 1995; Waterman and Bidartondo, 2008). Известно, что гифы микромицета не проникают в меристематические ткани корня, где происходят активные процессы метаболизма и транспорта (Залукаева, 1990; Peterson and Currah, 1990). Сдерживание роста гриба орхидеей происходит за счет образования ряда ферментов (пектиназы, кислые фосфатазы, оксидазы), а также фитоалексинов (Fisch et al., 1973; Arditti et al., 1975; Beyrle et al., 1995) – соединений фенольной природы, имеющих выраженные антимикробные свойства. Последние работы в этой области указывают на то, что увеличенный синтез взрослыми растениями орхидей фитоалексинов, например, орхинола, высокая экспрессия в отношении таких ферментов, как хитиназы и β -1,3 глюканазы, а также индукция так называемых непосредственно ранних генов (immediate early genes), активируемых элиситорами (чаще всего низкомолекулярными белками, в том числе образуемыми микроорганизмами, патогенными для растений, и вызывающими некроз растительных клеток), являются ключевыми факторами иммунного ответа орхидей, не позволяющего проникать в том числе и микоризному грибу в проводящие ткани растения (Zhao et al., 2013; Perotto et al., 2014).

Считается, что микориза отсутствует в фотосинтезирующих воздушных корнях эпифитных орхидей (Katiyar et al., 1986; Harley and Harley, 1987; Залукаева, 1990), встречаясь только в той их части, которая соприкасается с субстратом. Микоризация корней усиливается от апикального к дистальному концу корня (Katiyar et al., 1986; Залукаева, 1990). В старых корнях наземных корневищных орхидей эндофитный гриб находится преимущественно в неактивной форме в виде полностью или частично переваренных пелотонов (Татаренко, 1995). При этом интенсивность формирования симбиотических отношений с грибом существенно зависит от экологической приуроченности растения-хозяина и условий окружающей среды (Татаренко, 1995). В природе для прорастания семян орхидей обязательным условием является формирование микоризы с подходящим микосимбионтом, снабжающим проросток всеми необходимыми питательными веществами и энергией (Burgeff 1959; Waterman and Bidartondo 2008). Затем, по мере роста и развития растения, его зависимость от микоризообразователя может снижаться, особенно, с увеличением фотосинтезирующей активности у автотрофных видов орхидей, а также от степени развитости их корневой и проводящей систем (Benzing,

1982; Clements, 1988), хотя для некоторых наемных растений умеренного пояса наблюдали и обратное явление (Сизова и Вахрамеева, 1984; Татаренко, 1995).

Таким образом, взаимоотношения с микоризным грибом сводятся к облигатной зависимости от микобионта в форме микогетеротрофии у проростков и ахлорофильных видов орхидей, получающих весь углерод и минеральные вещества за счёт гриба, (Селиванов, 1981; Sommer et al., 2012). Многие орхидеи, тем не менее, сохраняют связь с микоризообразователем на протяжении всей жизни (Roberts and Dixon 2008, Merckx et al. 2012), и даже зелёнолистные автотрофные орхидеи остаются частично микогетеротрофными и могут получать необходимый им углерод обоими путями – автотрофно или за счёт микоризного гриба; такой тип питания некоторые исследователи называют автомикотрофией (Gebauer and Meyer 2003). Более того, довольно часто (что показано для многих наземных орхидей умеренного климата) орхидеи ассоциированы через своего грибного партнёра с арбускулярной микоризой, которую гриб-микобионт одновременно формирует с деревьями, произрастающими на этом же участке почвы (Bidartondo et al., 2004, Selosse et al., 2010, Merckx et al., 2012). А для тропических орхидей отмечено, что гриб необходим для раннего развития их протокормов, вне зависимости от возможности последних фотосинтезировать (Clements, 1988).

Несмотря на то, что микоризу орхидных изучают уже более 100 лет, начиная с Ноэля Бернара (N. Bernard), который в 1900-х годах начал исследование роли эндомикоризных грибов в прорастании семян орхидей, до сих пор остаются нерешёнными или спорными вопросы, касающиеся видоспецифичности во взаимодействии партнёров, транспорта питательных веществ между ними, идентификации и таксономической принадлежности грибов, механизмов возникновения и стабильного функционирования симбиоза и целого ряда других вопросов, которые рассматриваются более подробно в обзорных статьях на эту тему (например, Knudson, 1925; Burgeff, 1959; Otero et al., 2002; Dearnaley, 2007; Smith and Read, 2008; Otero et al., 2013; Hynson et al., 2013).

Проростки орхидей и бесхлорофильные орхидеи не могут разлагать органические вещества и существуют за счёт микоризообразующего гриба, поэтому некоторые исследователи склонны рассматривать это как частичный или полный паразитизм орхидей на своем грибном партнере (Burgeff, 1959, Селиванов, 1981, Dijk and Eck, 1995). На начальной стадии прорастания в оптимальных условиях воздействия абиотических факторов (свет и температура) семена тропических орхидей способны набухать без взаимодействия с грибом, за счёт растрескивания семенной кожуры и минимального поглощения воды (Smith and Read, 2008, Коломейцева и др., 2012). Однако для дальнейшего развития и роста протокорма и проростка при отсутствии экзогенного

углеводного питания, микоризация семян является необходимым и обязательным условием (Smith and Read, 2008; Hynson et al., 2013).

Результаты анализа экспрессии белков протокормов тропической орхидеи *Oncidium sphacelatum* (Valadares et al., 2014) показали, что активность фермента каротиноид-расщепляющей диоксигеназы возрастала в несколько раз в ахлорофильных протокормах, по сравнению с зелёными, фотосинтезирующими протокормами. Этот фермент участвует в синтезе стриголактонов – сигнальных веществ, которые, являясь фитогормонами, известны тем, что стимулируют прорастание спор у микоризных грибов, вызывают сильную и быструю пролиферацию мицелия и побуждают к образованию ассоциации с растением-хозяином, что подтверждено на примере арбускулярной микоризы (АМ); так подобное влияние было отмечено в концентрации 10^{-13} М для АМ гриба *Gigaspora rosea*, а также *Glomus intraradices* и *Gl. claroideum* (Besserer et al., 2006). Таким образом, и в случае с микоризой орхидных, стриголактоны могут играть ведущую роль в привлечении подходящих микобионтов прорастающими семенами орхидей (Dearnaley et al., 2016).

Хотя до сих пор доказательств, свидетельствующих о переносе С, N, фосфора и других питательных веществ из гриба в орхидею, было недостаточно, и они зачастую были основаны только на ультраструктурных исследованиях (Peterson and Currah, 1990; Dearnaley, 2007), недавние исследования с использованием изотопов (^{13}C и ^{15}N) подтвердили прямую передачу соединений углерода и азота от микоризного гриба к растению-хозяину на примере микотрофной *Rhizanthella gardneri* (Bougoure et al., 2014). Изучение протокормов наземной зеленолистной орхидеи *Spiranthes sinensis* и ее микоризного гриба *Ceratobasidium* sp. показало передачу С и N к растению как через живые гифы гриба, так и через полупереваренные пелотоны (Kuga et al., 2014). Считается, что возможность грибов использовать широкий круг питательных веществ (как органических, так и неорганических) расширяет адаптационные возможности обоих партнёров и позволяет им занимать большие территории в естественной среде или же повышает выживаемость в субоптимальных условиях (Nurfadilah et al., 2013).

Симбиоз между прорастающими семенами и образующимися протокормами орхидных и микоризным грибом нестабилен. При оптимальном взаимодействии между партнерами устанавливается состояние динамического равновесия, при котором участники извлекают пользу из совместного существования, что выражается в интенсивном росте и развитии протокормов и проростков орхидей (Clements, 1988). Вместе с этим при смещении равновесия в ту или иную сторону можно наблюдать несовместимость партнеров. Иногда отмечают чрезмерную защитную реакцию растения,

когда гриб не может инфицировать эмбрион или, наоборот, когда после заражения гифы гриба полностью перевариваются проростком (Clements, 1988; Beyrle et al., 1995), однако, чаще случается, что эндофитный гриб, проникая внутрь проростка, разрушает его, вызывая гибель растения (Селиванов, 1981; Clements, 1988; Peterson and Currah, 1990; Beyrle et al., 1995; Bonnardeaux et al., 2007).

В условиях *in vitro* проращивания орхидей характер взаимоотношений между микобионтом и орхидеей во многом зависит от состава питательной среды и доступности питательных веществ (Peterson and Currah, 1990). Успешное прораствание семян и развитие протокормов орхидных (*Orchis morio*, *Dactylorhiza* sp.) при их симбиотическом проращивании с *Ceratorhiza* sp. наблюдали исключительно при низких концентрациях соединений азота в среде (Dijk and Eck, 1995). При использовании относительно высоких концентраций доступных углеводов, например сахарозы, микромицет активно наращивает биомассу и зачастую убивает протокормы, проявляя себя как фитопатоген, тогда как использование более сложного углевода, например, целлюлозы (фильтровальной бумаги), наоборот, способствует формированию симбиотических взаимоотношений протокормов с микоризным грибом, что было показано при взаимодействии *Orchis morio* с грибом из рода *Rhizoctonia* (Beyrle et al., 1995).

Эндомикоризные грибы в значительной степени разлагают и усваивают трудно растворимые органические вещества, такие как лигнин, клетчатка, пектин и другие углеводы – крахмал, сахарозу, мальтозу. Те же самые ферменты, разлагающие сложные углеводы (целлюлазы, пектиназы, полигалактоураназы), помогают микоризным грибам расщеплять локально клеточную стенку растений при формировании микоризы с орхидеями (Rasmussen, 1995). Присутствие генов, ответственных за синтез этих ферментов было показано для ряда микоризных грибов, в том числе *Tulasnella calospora* и *Sebacina vermifera*, являющихся представителями одних из наиболее распространённых родов микромицетов-микоризообразователей орхидей (Kohler et al., 2015).

Роль гриба этим не исчерпывается, поскольку, например, из мицелия и культуральной жидкости микоризного гриба орхидеи *Ophrys lutea* были выделены стимуляторы роста растений индолил-3-этанол и индолил-3-уксусная кислота. Авторы рассматривают возможность их передачи из грибного мицелия к растению-хозяину в процессе образования микоризы и влияния на рост и развитие орхидеи (Barroso et al., 1986). Инокуляция протокормов гибрида *Dactylorhiza purpurella* и *Cymbidium* sp. эндомикоризным грибом (*Rhizoctonia* sp.) показала значительное увеличение дыхательной активности протокормов; пик потребления кислорода приходился на этап переваривания пелотонов, что подтвердилось на примере активностей следующих ферментов:

полифенолоксидазы, аскорбатоксидазы и каталазы (Blakeman et al., 1976). Более того, как показывают данные последних исследований, протокормы значительно отличаются от взрослых растений орхидей по своим иммунно-защитным характеристикам: так, на основании библиотеки кДНК генов, выделенных из микоризованных протокормов *Dendrobium officinale*, отражающей спектр генной активности протокормов при их взаимодействии с грибом, было показано (Zhao et al., 2013), что большинство генов вовлечены в мембранный транспорт и общий метаболизм: так, наибольшая активность была выявлена у генов, ответственных за белковый метаболизм (15,4%), транспорт углеводов и общий метаболизм (7,8%) и передачу (трансдукцию) сигнала (7,0%), синтез вторичных метаболитов и катаболизм (5,3%) и транспорт и метаболизм липидов (3,8%), в то время как активность генов, ответственных за защитные механизмы, была небольшой (0,25%). Другие авторы (Perotto et al., 2014) получили сходные данные, анализируя экспрессию генов у *Serapias vomeracea* – наземной средиземноморской орхидеи и её ризоктоние-подобного эндомикоризного гриба *Tulasnella calospora*, где практически не выявили активность генов, ответственных за взаимодействие с патогенами, wound- (от англ. ранение, поражение) или стресс-генов. Таким образом, анализ генной экспрессии говорит в пользу того, что протокормы орхидных, формируя симбиоз с подходящим эндомикоризным грибом, "рассматривают" его как исключительно дружественного партнёра, даже не пытаясь вырабатывать какие-либо защитные механизмы (Perotto et al., 2014; Dearnaley et al., 2016). В настоящее время пересматривается взаимодействие и взрослых растений орхидей, – возможно выработка фитоалексинов обнаруженных у взрослых растений как раз не направлена на эндомикоризный гриб и они могут быть даже не эффективны в отношении ризоктоние-подобных эндофитов орхидных (Dearnaley et al., 2016). Однако эти предположения нуждаются в дальнейшем экспериментальном подтверждении, поскольку например, известно, что гифы микоризообразующего гриба, при проникновении в протокормы образуют значительные количества полифенолоксидазы (Barroso et al., 1986), которая может быть показателем из способности к разложению фитоалексинов (зачастую имеющих фенольную природу), выделяемых в качестве первичных защитных соединений прорастающего растения.

Некоторые авторы считают, что по мере развития орхидеи, её ассоциации и тип взаимодействия с грибами изменяются: если вначале семенного развития это исключительно представители ризоктониеподобных грибов, то затем партнёрство расширяется и формируются ассоциации с эктомикоризными грибами или даже сапротрофными видами микромицетов (Selosse et al., 2010; Dearnaley et al., 2016).

1.2. Микромицеты, ассоциированные с орхидными

Чаще всего в симбиотические отношения с корнями высших растений вступают представители зиго-, аско- и базидиомицетов. Основными микоризообразователями орхидей, в том числе эпифитных видов, являются несовершенные грибы, относящиеся к группе видов *Rhizoctonia* – *Rhizoctonia* species complex, RSC (Burgeff, 1959; Clements, 1988), – разнообразной группе патогенных, сапротрофных и симбиотических микромицетов, которая включает анаморфы базидиомицетов *Tulasnella*, *Ceratobasidium*, *Thanatephorus* и *Sebacina* (Warcup, 1971; Otero et al., 2002; Bonnardeaux et al., 2007; Merckx et al. 2012). Анаморфные и телеоморфные стадии ризоктоний исторически зачастую описывали как отдельные, самостоятельные виды и до сих пор возникает некоторая путаница при их описании. Так, Moore (1987) разместила анаморфы *Thanatephorus* spp. в род *Moniliopsis*; анаморфы группы *R. repens* (телеоморфная стадия – *Tulasnella*) были перенесены в новый род *Epulorhiza*, а анаморфы *Ceratobasidium* – в новый род *Ceratorhiza*. Но многие исследователи продолжают объединять все три рода (*Moniliopsis*, *Epulorhiza* и *Ceratobasidium*) под единым названием *Rhizoctonia* (Yang and Li, 2012). Несмотря на то что среди представителей *Rhizoctonia* обнаруживают эндомикоризные грибы орхидей, многие из них оказываются патогенными, вызывая гниль у ряда дерновых трав, злаков, бобовых, картофеля, земляники и других сельскохозяйственных культур (Peterson and Currah, 1990; Yang and Li, 2012). Другой эндомикоризный гриб наземных орхидных, *Ceratorhiza* sp., является наиболее агрессивным патогеном, вызывающим черную гниль у ряда растений (Dijk and Eck, 1995). Однако непатогенный штамм *Rhizoctonia* sp. обеспечивал эффективную защиту молодых проростков фасоли против корневой гнили, вызываемой другим представителем этой группы, *Rhizoctonia solani* (Leclerc-Potvin et al., 1999).

Некоторые микотрофные наземные орхидеи, как из умеренного климата, так и тропические виды, формируют микоризные ассоциации с разлагающими древесину и листовую опад сапротрофными микромицетами из семейств *Psathyrellaceae* или *Mycenaceae*, а также относящимися к роду *Gymnopus* (Selosse et al., 2010; Hynson et al., 2013). Холомикотрофные виды орхидных зачастую проявляют сильную видо-специфичность и для них типичны представители агариковых грибов (базидиомицеты) родов *Thelephoraceae*, *Sebacinales* и *Russulaceae* (Taylor et al., 2002; Abadie et al., 2006). Те же самые грибы могут одновременно формировать эктомикоризу с корнями деревьев, которые снабжают их источником углерода (Bidartondo and Read, 2008). Например, рода *Ceratobasidium* и *Sebacina*, типичные для микоризы зеленолистных и полностью

автотрофных орхидей, имеют в своём составе штаммы, формирующие эктомикоризу с деревьями (Selosse et al., 2002; Bougoure et al., 2010). Martos с коллегами (2012) сообщают о различиях между микоризами наземных и эпифитных тропических орхидей, указывая, что эпифитные ассоциации – более консервативны и специализированны, что объясняется совместной эволюцией растения-хозяина с его эндромикоризными грибами в условиях более ограниченной и стрессовой абиотической среды эпифитной экониш (длительный засушливый период, небольшое количество субстрата и низкая доступность питательных веществ, интенсивное воздействие солнечной радиации и повышенный уровень испарения влаги).

Для орхидных показано, что один и тот же вид эндофитного гриба может вступать в симбиоз и образовывать микоризу с большим числом видов орхидей (Otero et. al, 2002). Предположение о строгой видоспецифичности гриба для многих растений не подтвердилось и прорастание семян, например, может обеспечиваться более чем одним штаммом *Rhizoctonia* (Otero et al., 2002). Это позволило ряду авторов сделать вывод об отсутствии у орхидей строгой специфичности, считая, что орхидеи вступают в ассоциации с теми грибами, которые живут в тех же экологических условиях и той же эконише, что и растение-хозяин (Curtis, 1937; Katiyar et al., 1986; Zettler and McInnis, 1992). Но зачастую выявляют штаммы, которые инфицируют только ограниченные виды орхидей, а растения, инокулированные "чужими" штаммами, приостанавливаются в своем развитии (Zettler and McInnis, 1992). Кроме того, прорастание семян орхидей не всегда стимулируется микромицетами, выделенными из корней взрослых растений того же вида (Burgeff, 1959), что рассматривают как еще одно подтверждение предположения о более узкой видоспецифичности взаимодействия орхидеи и эндомикоризного гриба при прорастании семян. Подобная зависимость затем нивелируется и взрослое растение формирует ассоциативные взаимоотношения с большим кругом различных эндофитных грибов.

Для ряда видов из рода *Dendrobium* (*D. brymerianum*, *D. candidum*, *D. chrysotoxum*, *D. densiflorum*, *D. loddigesii*, *D. nobile*, *D. primulinum*) активное прорастание семян и их дальнейшее развитие было показано при симбиотическом проращивании с рядом микоризообразующих грибов, включая *Ceratobasidium* sp., *Ceratorhiza* sp., *Epulorhiza* sp., *Mycena anoectochila*, *M. dendrobii*, *M. orchidicola*, *M. osmundicola*, а также *Rhizoctonia* sp. и *Tulasnella* sp. (цит по Teixeira da Silva et al., 2015a). Nontachaiyapoom с коллегами (2011) сообщают о трёх различных изолятах *Tulasnella* sp., которые эффективно стимулировали прорастание и образование протокормов у *D. draconis*. Так, (цит. по Teixeira da Silva et al., 2015a) были выделены четыре изолята симбиотических грибов из взрослых растений *D. catenatum* (*Epulorhiza* sp.) и *D. loddigessi* (*Alternaria* sp. и *Epulorhiza* sp.), которые

стимулировали прорастание семян *D. catenatum*, однако, в разной степени: так, использование двух штаммов *Epulorhiza* позволило значительно увеличить количество прорастающих семян *D. catenatum* до 88,41 и 74,10%, соответственно по сравнению с контролем (61,90%), однако, проростки не могли успешно развиваться далее. В то же время другие штаммы *Epulorhiza* и *Alternaria* не оказали значительного эффекта в ускорении прорастания семян или в увеличении их количества, однако, инфицированные ими проростки смогли устойчиво развиваться. Tan et al. (2014) использовали два изолята *Tulasnella* sp. (JC-02, JC-05) для проращивания семян *D. officinale*: в отличие от контрольных вариантов (81,05% проросших семян), симбиотическое *in vitro* проращивание позволило повысить число проросших семян до 98,47% и 99,05%, соответственно. Виды рода *Rhizoctonia* также стимулируют прорастание семян дендробиума, что было показано на примере следующих видов и сортов: *D. amethystoglossum*, *D. "Chao Praya Garnet"*, *D. "Snow Flake"*, *D. tobaense* и *D. loddigesii* (Nontachaiyapoom et al., 2010; Zhang et al., 2012).

Микоризный гриб *Mycena* sp., выделенный из корней *D. officinale* (Zhang et al., 2012) и использованный для симбиотического проращивания семян этой орхидеи, значительно стимулировал прорастание семян, что также выражалось в ускорении роста и образовании большего количества новых почек. Другие авторы (Dan et al., 2012) показали, что среди эндофитов, изолированных из корней различных орхидей, наилучшим образом в стимулировании прорастания семян и образовании протокормов двух видов дендробиума (*D. candidum* и *D. nobile*) проявили себя следующие представители микромицетов: *Mycena dendrobii*, *M. anoectochila*, *Epulorhiza* sp., *Gliocladium* sp. и *Cephalosporium* sp. Некоторые авторы (Liu et al., 2010) смогли успешно проращивать семена видов *Dendrobium*, инокулированные *Mycena* sp., которые исходно были выделены из другой орхидеи, *Cymbidium sinense*, что указывало на низкую специфичность в растительно-микоризных отношениях, поскольку один и тот же микромицет формировал микоризу с орхидеями, принадлежащими к разным родам.

Однако, применение метода симбиотического проращивания семян орхидей может быть более дорогостоящей и утомительной техникой, чем асимбиотическое *in vitro* культивирование из-за необходимости выделения чистых культур эндофитных микоризообразующих грибов и тестирования их совместимости с растением/растениями (Teixeira da Silva et al., 2015a). Тем не менее, симбиотическое проращивание семян с микоризными грибами может рассматриваться как наиболее эффективное на этапе акклиматизации и адаптации ювенильных растений к горшечной культуре или в случае их реинтродукции в природу (Roberts and Dixon, 2008; Zhang et al., 2012). Техника

использования специальных пакетиков для проращивания семян орхидных в природных условиях, была впервые описана Rasmussen и Whigham (1993), при которой семена наземных орхидей из умеренной полосы, помещенные в специальные пакетики с перфорациями, культивируют в природных условиях *ex situ* при полноценном воздействии абиотических (свет, влажность, доступность субстрата и питательных веществ) и биотических (наличие в субстрате как микоризных, так и потенциально патогенных грибов) факторов. Используя нейлоновые пакетики для проращивания семян эпифитных видов дендробиума (*D. officinale*, *D. nobile*, *D. chrysanthum*) другим авторам (Wang et al., 2011) удалось показать эффективность этого метода для *in situ* симбиотического проращивания орхидей в непосредственной близости от взрослых генеративно-зрелых растений того же вида.

Особого внимания заслуживает всё больше появляющихся данных об ассоциативном взаимодействии орхидных с грибами из рода *Fusarium*. Среди этой обширной и биологически неоднородной группы есть ярко выраженные фитопатогены, вызывающие различные поражение корневой и сосудистой системы растений, что зачастую приводит к гибели растений. У орхидей, особенно культивируемых в оранжерейных условиях, фузариозы являются одними из основных фитопатогенов (Черевченко и Кушнир, 1986; Черевченко, 1993; Трейвас, 1999). Возбудители корневой гнили, а именно *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. sporotrichiella*, *F. javanicum*, *F. moniliforme*, поражают корни, в результате чего псевдобульба и листья орхидных загнивают, размягчаются и буреют, листья желтеют, позже становятся темно-серыми, ткань листа размягчается и покрывается спороношением гриба в виде налета разного цвета, края листьев подсыхают и скручиваются (Черевченко и Кушнир, 1986; Черевченко, 1993). В то же время всё больше информации появляется о том, что микромицеты из рода *Fusarium* поражают растения, ослабленные комплексом других факторов, а часть видов (или штаммов) этого рода вообще не обладают паразитическими свойствами, развиваясь в корневой зоне растений или на их корнях (Дьяков и Долгова, 1995; Agrios, 1997). Фузариозный вилт некоторых сельскохозяйственных растений, вызываемый *F. oxysporum*, удачно контролировался инокулированными непатогенными штаммами этого же вида, причем некоторые из них были изолированы из сосудистых тканей растения-хозяина, которые оставались здоровыми, в то время как растения рядом погибали от вилт-индуцирующих штаммов (Agrios, 1997). Также способность непатогенных штаммов *F. oxysporum* и *F. solani* значительно уменьшать симптомы заболеваний и подавлять рост патогенных штаммов этих же видов была отмечена и другими авторами (Olivain and Alabouvette, 1997; Forsyth et al., 2006; Kavroulakis et al., 2007). Было показано, что

эндофитные виды *Fusarium*: *F. oxysporum*, *F. cf. diversisporum*, изолированные из кортикальных тканей корней банана, а также *F. oxysporum*, выделенный из растений томата, выступают как антагонисты и естественные враги (biological control agents) и значительно ингибируют распространение и развитие активного эндопаразита – нематоды *Radopholus similis*, наносящей значительный ущерб плантациям бананов, кокосов и цитрусов (Vu et al., 2006), снижая проникновение *R. similis* в предварительно инокулированные фузариями корни на 30-50%.

Fusarium aquaeductuum и *F. solani* были выделены как эндофиты (Rodrigues and Samuels, 1990), не вызывающие никаких симптомов возможных заболеваний, из листовых жилок нераскрывшихся листьев веерной пальмы из рода *Licuala*. *Fusarium oxysporum* и *F. solani* были обнаружены у эпифитной орхидеи *Epidendrum stangeanum*, а *F. oxysporum* – у наземной орхидеи *Platanthera praeclara* (Arditti and Pridgeon, 1997). Более того, отмечено (Vujanovic et al., 2000), что изоляты *Fusarium* способны стимулировать прорастание и формирование протокормов у семян наземной орхидеи умеренного климата *Cypripedium reginae*, тем самым подтверждая возможность этих микромицетов быть эндофитами для орхидей.

Помимо представителей рода *Fusarium*, среди ассоциативных микромицетов, колонизирующих здоровые растения орхидей из эпифитного рода *Dendrobium* были отмечены и другие: *Xylaria* spp., *Guignardia mangiferae*, *Clonostachys rosea*, *Trichoderma chlorosporum*, *Fusarium solani*, выделенные из *D. nobile* (Yuan et al., 2009); *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Chaetomella* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Sirodesmium* sp. и *Thielavia* sp. были обнаружены на *D. loddigesii* (Chen et al., 2010). При этом представители *Fusarium* и *Acremonium* составляли около 45% от всех выделенных изолятов; *F. solani*, *F. venfricosum* и *Acremonium* spp. предпочитали заселять корни растения, а *Colletotrichum* spp. – исключительно его листья (Chen et al., 2010).

У дикорастущих видов дендробиума среди микромицетов, стабильно заселяющих их корни, обнаружены *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., а также *Trichoderma* sp., причём именно триходерма наряду с ризоктонией были наиболее часто встречаемыми изолятами (Chang, 2007). Представителей рода *Trichoderma* выделяют из корней орхидей как из тропических, так и из умеренных широт (Alconero, 1969; Arditti and Pridgeon, 1997). Микромицеты рода *Trichoderma* широко распространены в природе и являются обязательными и весьма активными компонентами многих микробных сообществ почв, играя существенную роль в перераспределении органических и неорганических веществ (Великанов и Сидорова, 1988; Smith, 1995). Триходерма успешно конкурирует за жизненное пространство благодаря способности выделять антимикотики и

антимикробные соединения и токсины, а также разнообразные ферменты (целлюлазы, ксиланазы, липазы, лигнин-дегидрогеназы, хитиназы, пектиназы), паразитируя на других грибах и подавляя их рост и развитие (Ghisalberti and Sivasithamparam, 1991; Великанов, 1997; Kubicek, 2001; Садыкова и др., 2015; Sachdev and Singh, 2020). Эту антогонистическую способность часто используют в сельском хозяйстве для защиты растений от фитопатогенных грибов как при культивировании в теплицах, так и в открытом грунте (Samuels, 1996). Известно, что *Trichoderma* ингибирует рост и/или паразитирует на грибах из родов *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Heterobasidion*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Phomopsis*, *Aspergillus*, *Rhizoctonia* (Ghisalberti and Sivasithamparam, 1991; Samuels, 1996; Agrios, 1997). Различные штаммы триходермы могут проявлять значительную вариабильность по антибиотической и микопаразитической активности в отношении возбудителей корневых гнилей растений (Садыкова и др., 2010). *Trichoderma harzianum* Rifai используют для защиты картофеля от *Rhizoctonia solani* (Александрова и др., 2000); *T. viride* значительно уменьшает гниль цитрусовых, вызываемую грибом из рода *Penicillium*, а *T. koningii* эффективно подавляет развитие на кукурузе и салате патогенного *Fusarium solani* (Agrios, 1997; Sachdev and Singh, 2020). Показано (Gutiérrez-Miceli et al., 2008), что проростки орхидеи *Guarianthe skinnerii*, инокулированные *T. harzianum*, лучше акклиматизировались, выживаемость инокулированных проростков после пересадки их в горшечную культуру в 1,6 раз превышала выживаемость растений в контрольной группе, а высота инокулированных растений в 3,6 раз превышала контрольные.

Таким образом, орхидеи проявляют себя уникальными растениями в своих биотических связях с микромицетами. С одной стороны, это необходимость соблюдения тонкого равновесия во взаимодействии между растением-хозяином и грибами, как формирующими микоризу с прорастающими семенами, так и с эндофитными видами, заселяющими корни взрослых орхидей, что в свою очередь гарантирует экологическую стабильность и обеспечивает конкурентные преимущества и для растения, и для гриба. С другой стороны, среди ассоциативных и эндофитных партнёров могут выступать совершенно разные представители аско- и базидиомицетов, механизмы взаимодействия с которыми и биологическая активность которых до сих пор остаются неизученными. Взаимоотношения же с другими микроорганизмами – бактериями вообще практически не были изучены, а их роль в жизни орхидных оставалась невыясненной до последнего времени.

1.3. Разнообразие и роль бактерий, вступающих в ассоциативные отношения с растениями

Растения вступают в тесные взаимодействия с различными микроорганизмами и микробными сообществами, заселяющими не только область ризосферной почвы (слой почвы около 2-3 мм, примыкающий к корням), но также ризоплану и филлоплану (корневая поверхность и поверхность вегетативных частей растений, соответственно). В процессе своей жизнедеятельности растения постоянно и в значительных количествах выделяют в виде экссудатов широкий спектр разнообразных органических соединений: (водорастворимые углеводы, органические кислоты, спирты и аминокислоты, летучие метаболиты, высокомолекулярные полисахариды), количество которых может достигать 30% от всего углерода, ассимилированного растением при фотосинтезе (Умаров, 1986). Интенсивное поступление корневых экссудатов в область ризопланы и ризосферы создает высокую энергетическую обеспеченность этой зоны, представляя питательный субстрат для различных гетеротрофных микроорганизмов, и являясь по сути благоприятной эконишей для заселения ее ассоциативными микроорганизмами. Количество и состав таких экссудатов отличаются между видами и даже между сортами растений (Duineveld et al., 1998), а также могут зависеть от области корневой системы (дистальная или проксимальная часть корней) и изменяться в течение жизни растения. За счет различия растительного материала и экскреций беспозвоночных животных и насекомых, состав таких микробно-растительных ассоциаций не является стабильным и постоянно изменяется (Кравченко, 2000). Другие авторы (Duineveld et al., 2001), впрочем, указывают, что в бактериальном сообществе корневые экзометаболиты не вызывают коренные изменения популяций, а лишь некоторые "тонкие модификации". Состав и количество самих корневых экзометаболитов растений может изменяться, например, при микоризации растений грибами (Ames and Bethlenfalvay, 1987).

Взаимодействие бактерий с растениями может определяться совершенно разными стратегиями: от типичного антагонизма и фитопатогенеза до комплексной симбиотической зависимости партнёров друг от друга. Выделяют трофические (например, с микоризными грибами или азотфиксирующими бактериями) и защитные (с эндо- и эпифитными микробами, подавляющими развитие фитопатогенов) ассоциации, при формировании которых возможно объединение коммуникативных межорганизменных связей, метаболических систем и интеграция генов партнёров, в результате чего формируется надорганизменные генные комплексы, позволяющие развивать новые симбиотические фенотипы с развитием новых надорганизменных тканей или клеточных

структур, что в свою очередь, способствует значительному расширению адаптивных потенциалов партнёров (Тихонович и Проворов, 2011а, б). Подобные ассоциации формируют по сути отдельный объект, что согласуется с концепцией холобионта, введённой Л. Маргулис (Margulis, 1991), рассматривающей макрохозяина и сопутствующего ему симбиотических микроорганизмов как единую полигеномную общность, развивающуюся как единая единица эволюции и отбора. Изучение такого симбиогенома (совокупность генов партнёров) позволит реализовывать новые генно-инженерные, селекционные и биотехнологические программы по повышению продуктивности и экологической устойчивости растительно-микробных ассоциаций (Тихонович и Проворов, 2007). Симбиотические отношения предполагают локализацию бактерий внутри тканей растения, продолжительный контакт между партнерами и облигатность и взаимовыгодность таких отношений. Однако всё больше внимания отводят рассмотрению многокомпонентных ассоциаций, в которых с одним макросимбионтом (растение) вступают в тесные взаимодействия несколько микросимбионтов (Smith and Douglas, 1987). Сопутствующие бактериальные популяции обозначают, как бактерии-спутники (Forni et al., 1990; Bashan et al., 1995), которые в свою очередь играют значительную роль в становлении, стабильном развитии и эффективном функционировании многокомпонентных консорциумов. Например, известно, что микоризообразующие грибы трудно освободить от сопутствующих бактерий, а рост некоторых микоризообразователей возможен только в их присутствии или же значительно стимулируется почвенными бактериями. Представители эктомикоризных грибов (*Hebeloma*, *Laccaria*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*) взаимодействуют подобным образом с бактериями, принадлежащими к родам *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, а микромицеты арбускулярной микоризы (*Glomus*, *Endogone*) – с бактериями из тех же родов, а также с *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* (Frey-Klett et al., 2007). Показано, что так называемые helper-bacteria образуют биоплёнкоподобные структуры непосредственно на гифах микоризообразователей (например, в консорциуме *Laccaria bicolor* S238N и *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8). Бактерии улучшают восприимчивость корней к микоризообразующему грибу, способствуя установлению симбиотических отношений растения с микромицетом; стимулируют прорастание грибных спор, способствуют лучшей адаптации и выживанию мицелия, при этом сам гриб выделяет и определённым образом селекционирует необходимые популяции таких бактерий-помощников (Frey-Klett et al., 2007).

Взаимодействия бактерий и грибов рассматривают и в более широком аспекте, как динамические ко-эволюционирующие сообщества, определяющие функционирование

целых экосистем (участие в глобальных циклах химических элементов), и формируя сложную сеть между многочисленными, участвующими в ней микроорганизмами (Deveau et al., 2017). Всё больше накапливается данных, подтверждающих важнейшую роль именно ассоциативных микроорганизмов в формировании и эффективном сосуществовании сложных многокомпонентных консорциумов. Кроме растения-хозяина в качестве макропартнера и доминантного микросимбионта (например, гриба-микоризообразователя), значимую и важнейшую роль в таких консорциумах играют именно ассоциативные бактериальные популяции, динамически меняющиеся в жизненном цикле этой единой системы. Ряд авторов даже применяет термин "ассоциативный симбиоз", как отдельный термин (Емцев, 1994). Необходимо также отметить, что пропорции в составе таких консорциумов могут различаться между разного типа микроорганизмами, и тогда как при рассмотрении экто- и эндомикоризы, доминантным микросимбионтом являются грибы, в широко представленных синцианозах – это, в первую очередь, фототрофные цианобактерии. Несмотря на то что цианобактериальные симбиозы (синцианозы) – факультативные и партнёры могут существовать отдельно, их тесное сожительство приводит к стабильному и гармоничному существованию единого консорциума растение-ассоцианты (Rai et al., 2000).

1.3.1. Цианобактерии

Цианобактерии являются древнейшими наземными прокариотами, способными к оксигенному фотосинтезу и азотфиксации, и обладают широким разнообразием осуществляемых метаболических реакций. Основным метаболизмом для них является фотоавтотрофия, но известно, что некоторые цианобактерии могут переключаться на анаоксигенный фототсинтез, например, когда концентрации сероводорода превышают 3 М (Cohen et al., 1986) или даже существовать в гетеротрофных условиях. Перемещаясь из фотических слоев в ризосферу, они способны переходить на темновой образ жизни (Панкратова, 2001). Различные представители цианобактерий развили механизмы захвата молекулы CO_2 в зависимости от её доступности в окружающей среде и наличия различных С-транспортёров с разным сродством и специфичностью по отношению к CO_2 или HCO_3^- (Badger et al., 2006). При этом в факультативно фотогетеротрофных условиях некоторые цианобактерии могут использовать сахара и расти, например, на поверхности разлагающихся растительных остатков (Rippka et al., 1979). Виды, способные к росту в гетеротрофных условиях сохраняют в темноте способность к азотфиксации (Гусев и Никитина, 1979) и чаще всего используют глюкозу, фруктозу и сахарозу (Rai et al., 2000).

Также у цианобактерий отмечена миксотрофия, когда они дополняют автотрофную фиксацию CO_2 потреблением органических соединений. Клеточная дифференцировка у нитчатых форм цианобактерий позволяет осуществлять им одновременно взаимоисключающие биохимические процессы: фотосинтез и азотфиксацию. Клетки цианобактерий, находясь в постоянном контакте с солнечной радиацией, содержат целый набор компонентов, помогающих избежать её ингибирующего и летального действия: это высокое содержание каротиноидов и ксантофиллов, а также наличие структур, увеличивающих светорассеивание: газовых вакуолей и кальцинированных чехлов (van Liere and Walsby, 1982). Подобная структурно-функциональная пластичность является основой адаптационной устойчивости цианобактерий, что позволяет им приспосабливаться к различным вариациям условий окружающей среды и заселять местообитания, в том числе такие экстремальные, как, например, горячие источники и щелочные озера, солёные морские и пресноводные водоёмы, а также наземные и симбиотические экониши (Панкратова, 2001; Badger et al., 2006).

Считается, что цианобактерии в полном своём современном разнообразии существовали на Земле не менее 2,5 миллиардов лет, а их микрофоссилии и ископаемые строматолиты обнаруживают в осадках, насчитывающих от 3,4 до 3,8 млрд. лет (Knoll, 1994; Заварзин, 2008). Наиболее вероятно, что именно цианобактериальные маты – высокоспециализированные микробные консорциумы, объединяющие (зачастую в вертикальной проекции) различные группы микроорганизмов и формирующие замкнутую экосистему, где структурирующую и основную функциональную роль продуцента играют цианобактерии, стали доминирующими сообществами субаэральной поверхности суши, которые наряду с альго-бактериальными сообществами были первыми её колонизаторами (Заварзин, 2008). По сути, цианобактериальные сообщества, нарастающие в виде биоплёнок и матов, создавали первые примитивные почвы, характеризующиеся органоминеральным слоем и органоминеральным комплексом в виде кутана (Добровольский, 2006; Заварзина, 2013). Развитие микроорганизмов проходило через периоды резкого изменения абиотических факторов, где наиболее существенное влияние оказывало увеличение концентрации O_2 , снижение концентрации CO_2 , а также постоянные и значительные (даже суточные) колебания в освещенности и температурном режиме, что послужило развитию способности цианобактерий, а также тесно ассоциированных с ними микроорганизмов, не только приспосабливаться и выживать в условиях широких флуктуаций окружающей среды, но и получить преимущественное распространение (Badger et al., 2006).

Особой значимостью в поддержании стабильной локальной среды внутри цианобактериальных консорциумов обладают их слизистые выделения (главным образом,

состоящие из высокомолекулярных гетерополисахаридов) и чехлы цианобактерий, которые выполняют защитную (от механических повреждений, высыхания, воздействия физико-химических факторов), коммуникативную (в слизь выделяются и концентрируются различные экзометаболиты микроорганизмов, химические сигнальные вещества, вторичные метаболиты) и структурирующую роль при формировании различных функционально-специфических сообществ микроорганизмов (Панкратова, 1987; Pereira et al., 2009). У цианобактерий выделяют экзополисахариды (ЭПС), тесно связанные с клеточной стенкой, отличающиеся между собой по составу и толщине (например, чехлы, капсулы) и полисахариды, выделяющиеся в окружающую среду (De Philippis and Vincenzini, 2003). В цианобактериальном ЭПС присутствуют уроновые кислоты и сульфатные группы, придающие отрицательный заряд и способность ЭПС проявлять "липкость", а также аффинность к катионам (преимущественно, ионам металлов), что например, немаловажно при осуществлении азотфиксации (Mancuso Nichols et al., 2005). ЭПС также характеризуются гидрофобностью за счёт наличия этерифицированных ацетильных групп, а также присутствия дезоксисахаров (фукоза, рамноза), которые также придают эмульсифицирующие свойства полисахаридам, сохраняя их реологические свойства, без чего составляющие ЭПС полисахариды были бы высокогидрофильными и растворились бы в водной среде (Shepherd et al., 1995; Pereira et al., 2009). Основными углеводами, идентифицированными в составе ЭПС цианобактерий, являются гексозы (глюкоза, галактоза, манноза и фруктоза), пентозы (рибоза, ксилоза, арабиноза), дезоксигексозы (фукоза, рамноза и метилрамноза), кислые гексозы (глюкуроновая и галактоуроновая кислоты) (De Philippis and Vincenzini, 2003). Многие исследования подтвердили роль ЭПС цианобактерий в защите от дегидратации, защите от УФ воздействия, фагоцитоза (De Philippis and Vincenzini, 2003), а также в адгезивной способности, позволяющей цианобактериям прикрепляться к твёрдым поверхностям и, например, защищать их от потоков воды (Pereira et al., 2009). На примере *Nostoc commune*, наиболее широко распространённой нитчатой цианобактерии, была показана ведущая роль ЭПС (который составляет более 60% от веса сухой биомассы) в их предохранении от высыхания и замерзания (Tamaru et al., 2005). Так, высушенные на воздухе колонии всё равно содержали около 10% (по весу) воды, а при попадании в условия атмосферной влажности, крайне быстро абсорбировали её из воздуха и регидратировали. Другие функции ЭПС включают защиту от детритофикации и биоминерализации, а также активную защиту от УФ облучения, в том числе за счёт наличия в ЭПС пигментов сцитонемина, не пропускающего УФ лучи, особенно зелёного и жёлтого спектров (Dillon et al., 2002), а также микоспорин-подобной аминокислоты, известной своими УФ

защитными свойствами (Adhikary and Sahu, 1998). Например, водорастворимый микоспорин, поглощающий в области 312 и 335 нм, представляющий собой комплексную смесь из двух хромофоров, связанных с различными аминокислотами и олигосахаридами, обнаружен в достаточно высоких количествах в составе внеклеточной слизи наземных колоний *Nostoc commune* (Böhm et al., 1995).

Для гетеротрофных микроорганизмов (бактерии и грибы), вступающих в ассоциативные отношения с цианобактериями, ЭПС последних также оказывает защитную роль, а кроме того, является готовым субстратом в виде внеклеточных выделений, содержащих органические кислоты, растворимые полисахариды, жирные кислоты, различные биологически активные вещества и полипептиды (Stewart, 1983; Панкратова и Мезенцева, 1985). В то же время, бактериальные метаболиты (витамины, аминокислоты, фитогормоны, другие биологически активные вещества) используются цианобактериями; гетеротрофные бактерии могут инактивировать ингибирующие вещества, содержащиеся в продуктах жизнедеятельности цианобактерий, и уменьшать концентрацию кислорода вокруг цианобактерий, что способствует увеличению нитрогеназной активности цианобактерий (Андреюк и др., 1990). В качестве спутников цианобактерий описано более 300 штаммов сапрофитных бактерий (Панкратова, 2001), многие из которых участвуют в круговороте азота. Часто в слизи цианобактерий преобладают псевдомонады, в меньшей степени взаимодействуют с цианобактериями бациллы, микрококки, флавобактерии и микобактерии (Андреюк и др., 1990). Видовой состав спутников при этом может изменяться в зависимости от условий окружающей среды и занимаемого экотопа, а попытки удалить бактерии-спутники приводят к ослаблению аксеничной культуры цианобактерий (Панкратова и др., 2008). Поэтому, наличие бактерий-спутников в слизи цианобактерий необходимо для гомеостаза консорциума всех участвующих в нём микроорганизмов в целом.

Искусственно составленные консорциумы из цианобактерий (например, *Nostoc paludosum* или *N. punctiforme*) и ризобактерий *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* или *Arthrobacter* функционируют как стабильные и самодостаточные ассоциации и пригодны для их перспективного использования как биоудобрения: обработка такими консорциумами семян различных бобовых растений приводит к повышению их всхожести и урожайности (Панкратова и др., 2008; Сытников и др., 2010).

При этом одним из биопротекторных свойств цианобактерий для растений, с которыми они вступают в ассоциации, помимо азотфиксации может быть также и их фунгицидная активность в отношении ряда фитопатогенных грибов. Так, использование цианобактериальных культур *Anabaena variabilis* RPA59 и *A. laxa* RPA8 для

культивирования растений томатов показало, что цианобактерии колонизируют растения, а также улучшали рост, урожайность и качество плодов, а кроме того, значительно увеличивали резистентность растений к возбудителю фузариоза томатов *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Prasanna et al., 2013). При анализе антигрибных свойств культуральной жидкости ряда цианобактерий (*Anabaena*, *Nostoc*, *Phormidium*) было показано, что все они ингибировали рост таких фитопатогенов, как *Fusarium verticillioides*, *Rhizoctonia solani* и *Sclerotium rolfsii* (Rizk, 2006). Кроме того, известно, что фенольные компоненты, обнаруженные в культуральной жидкости *Nostoc muscorum* значительно (на 88-89%) ингибировали рост болезнетворных для человека дрожжей *Candida albicans* и бактерий *Staphylococcus aureus* (de Cano et al., 1990). Цианобактерии, участвующие в многокомпонентных микробных сообществах, формируют ассоциативные и взаимовыгодные отношения с одними партнёрами, селективно ингибируя развитие и возможную экспансию других. При этом именно цианобактерии известны как основной партнёр в синцианозе с грибами в классическом примере симбиотического консорциума – лишайниках .

1.3.1.1. Цианобактерии – партнёры и симбионты растений

Несмотря на то что цианобактерии широко представлены в природе свободноживущими формами, несколько родов этих микроорганизмов включают виды симбиотических микроорганизмов, которые активно формируют симбиозы (синцианозы) с широким кругом эукариотических партнёров: простейшими и губками, водорослями и грибами, с низшими и высшими растениями. Подробное разнообразие синцианозов, роль и механизмы взаимодействия партнёров, факторы, определяющие дифференцировку цианобактерий, и регуляцию этих процессов со стороны цианобактерий, а также описание процессов фиксации азота, азотный и углеродный метаболизмы цианобионтов рассмотрены в ряде обзорных статей (Adams, 2000; Rai et al., 2000; Meeks, Elhai, 2002; Adams et al., 2006; 2013).

Считается, что цианобактерии, вступающие в симбиоз, образуют гетероцисты, а также подвижные формы – гормогонии, которые при возникновении новых синцианозов двигаются по направлению к растению-хозяину, затем происходит узнавание и дальнейшие метаболические и морфологические изменения, в том числе дифференциация гетероцист (Campbell and Meeks, 1989; Rai et al., 2000). Все цианобионты формируют гормогонии, но не все цианобактерии, образующие гормогонии, могут участвовать в синцианозах (Rasmussen and Nilson, 2002). Известно, что в условиях, лимитированных по азоту, мох *Anthoceros punctatus* синтезирует и выделяет низкомолекулярное соединение,

стимулирующее образование гормогониев у штаммов ностока (Meeks and Elhai, 2002). А высшие растения (гуннера) выделяют флавоноиды, сходные по действию с таковыми в бобово-ризобийных симбиозах (Rai et al., 2000).

Выгода, которую получают цианобактерии из симбиозов, не всегда очевидна, хотя для цианобионтов создаются условия стабильной окружающей среды с более богатым пулом питательных веществ, а специальные структуры (компарменты) макросимбионта, создающие микроаэробные условия, способствуют защите нитрогеназы цианобактерий от кислорода и стимулируют их азотфиксирующую активность (Rai et al., 2000). Внешние же источники связанного азота (аммоний или нитраты) в некоторых синцианозах мало влияют на процесс азотфиксации (Stewart et al., 1983), подавляя его исключительно у свободноживущих азотфиксаторов. В лабораторных условиях формирование синцианозов возможно только в лимитированных по азоту условиях, а при достаточном содержании азота, даже в уже сформированном симбиозе, партнеры имеют тенденцию к отдельному существованию (Rai et al., 2000).

В водных экосистемах цианобактерии вступают в ассоциации с водным папоротником *Azolla*, диатомовыми водорослями, губками и динофлагеллятами; среди цианобактериальных партнёров этих микроорганизмов наиболее известны представители *Rhizelia*, *Calothrix*, *Oscillatoria*, *Phormidium* и *Cyanothece* (Rasmussen and Nilson, 2002). В наземных же симбиозах доминирующим родом среди цианобактерий является *Nostoc*, штаммы которого обнаруживаются в синцианозах с грибами (образуя бикомпонентные или трёхкомпонентные с участием водорослей лишайники), мхами и печеночниками, папоротником *Azolla*, голосеменными растениями порядка *Cycadales* (саговники), а также с единственным представителем покрытосеменных, *Gunnera*, – многолетними тропическими и субтропическими травами, внешне напоминающими ревени (Rai et al., 2000; Adams and Duggan, 2008; Lindblad, 2009). В то же время, в лишайниках также обнаруживают одноклеточные цианобактерии (*Gloeocapsa*, *Gloeotheca*, *Synechocystis* и *Hyella*), нитчатые, содержащие гетероцисты (*Nostoc*, *Calothrix* и *Scytonema*), а также ветвящиеся содержащие гетероцисты представителей *Fischerella*. И хотя *Nostoc* превалирует у саговниковых растений (*Cycas*), в этих растениях были идентифицированы также *Anabaena* и *Calothrix* (Grobbelaar et al., 1987). Штаммы *Calothrix* и *Chlorogloeopsis* встречаются в синцианозах со мхами (Rai et al., 2000; Rasmussen and Nilson, 2002).

Особый интерес вызывает *Geosiphon pyriformis* (Kütz.) v. Wettstein – единственный известный случай внутриклеточного симбиоза гриба и цианобактерий (*Nostoc punctiforme*), представители которого пока что обнаружены исключительно на территории Германии и Австрии. Гриб образует одноклеточное многоядерное образование-

симбиосому (около 1-2 мм), своеобразный "пузырь", в который включены эндосимбионтные нитчатые цианобактерии (Adams et al., 2006). Грибной микобионт филогенетически принадлежит к *Glomeromycota*, все остальные представители которого образуют арбускулярную микоризу с высшими растениями. Также, в состав этого симбиоза входит и третий партнёр – бактериеподобные организмы (так называемый, "BLOs, - bacteriallike organisms"), которые остаются пока что неизученными (Schüßler and Kluge, 2001). Известно, что все представители *Glomeromycota* в природе не способны к сапрофитному образу жизни и зависят от своих растительных партнёров в получении C-соединений (Adams et al., 2006). Наряду с цианобионтами в синционазах нередко обнаруживают бактерии-спутники (Grobellaar et al., 1987).

Цианобактериально-растительные симбиозы встречаются повсеместно, а сочетание процессов автотрофии и азотфиксации позволяет синцианозам колонизировать бедные по питательным веществам места обитания. Напочвенные лишайники редко встречаются на плодородных почвах из-за сильной конкуренции с высшими растениями, предпочитая места, лимитированные по питательным веществам или даже с неблагоприятными и экстремальными климатическими условиями (Гарибова и др., 1978). Однако симбиоз подразумевают компартментализацию цианобионта в структурах и тканях партнёра, которые могут быть локализованы внутри- или внеклеточно; поэтому несмотря на широкую распространённость цианобактерий, строго симбиотические отношения с покрытосеменными растениями можно выделить исключительно с гуннерой. В 80-х годах М.В. Гусеву с сотр. удалось показать успешность искусственных (модельных) синцианозов, созданных на основе каллусных растительных тканей. Так, каллусы табака (*Nicotiana tabacum* L.), инокулированные азотфиксирующей *Anabaena variabilis*, формировали успешную ассоциацию, где цианобактерии локализовались внутри тканей и на поверхности побегов, образовывали гетероцисты и были способны к азотфиксации (Gusev et al., 2002). Для создания модельных синцианозов в настоящее время используют протопласты растений, культуры изолированных клеток и тканей, каллусные ткани, суспензионные культуры дифференцированных растительных клеток, растения-регенеранты или целые растения (Rai and Bergman, 2002; Gusev et al., 2002; Baulina, 2012). В качестве цианобактериальных партнёров используют *Synechococcus* (в ассоциациях со суспензионными культурами *Nicotiana tabacum*, *Dioscorea deltoidea* Wall.), *Anabaena* (с каллусами и растениями-регенерантами табака, а также *Medicago sativa* L. (люцерна), *Chlorogloeopsis* (в ассоциациях со суспензионными культурами *Panax ginseng* C.A. Mey (женьшень), а также *Nostoc muscorum*, которым инокулировали корни черенков люцерны (Baulina, 2012).

К настоящему времени описаны примеры растительно-цианобактериальных ассоциаций с рядом сельскохозяйственных растений. Семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.), выращенные на вермикулите и инокулированные разными штаммами цианобактерий родов *Nostoc* и *Desmonostoc*, показали высокую корреляцию накопления массы корней растений с биомассой рост-стимулирующих штаммов цианобактерий (Дидович и др., 2017); хотя другие штаммы этих же видов, наоборот, проявляли себя как ингибиторы роста растений. Представители родов *Nostoc* и *Anabaena* успешно колонизируют и в некоторых случаях проникают в корни растений риса, кукурузы, сахарного тростника, мангровых деревьев и пшеницы при их культивировании в жидких гидропонных и песчаных культурах (Svircev et al., 1997; Rai et al., 2002). Несмотря на то что локализация цианобактерий в этих случаях была исключительно внеклеточной – на поверхности корней или в трещинах эпидермиса, эффективность цианобактерий была показана, особенно в безазотной гидропонной культуре (Spiller et al., 1993).

Создание искусственных синцианозов рассматривают как один из перспективных способов бактеризации сельскохозяйственных растений с целью улучшения их роста и развития, повышения урожайности и расширения адаптивных возможностей таких ассоциаций, особенно в лимитированных по азоту условиях. Основной функцией цианобионтов является фиксация атмосферного азота и снабжение хозяина связанным азотом (Панкратова, 1987). Имеются также данные об образовании цианобактериями стимуляторов роста растений – ауксинов (Селях и Семенова, 2000; Liaimer, 2002), которые влияют на размягчение клеточных стенок растений, что позволяет симбиотическим цианобактериям проникать внутрь и заселять растительные клетки (Liaimer, 2002).

Азолла, саговники и гуннера являются обитателями тропического и субтропического климата. Эпифитные орхидеи, как было описано выше, формируют воздушные корни, покрытые губчатой "дышащей" тканью веламена, которая способна накапливать и удерживать воду. Подобная структура корней орхидных, а также условия произрастания эпифитов представляют благоприятную экологическую нишу для заселения ассоциативными diaзотрофными цианобактериями. Однако в литературе до начала наших исследований существовало лишь единичное упоминание о вероятном присутствии в веламене орхидей этих микроорганизмов (Гладкова, 1982).

1.3.2. Ассоциативные бактерии и свойства PGPB (plant growth-promoting bacteria)

Считается, что взаимодействие ассоциативных бактерий с растениями не приводит к их обособленной компартментализации и формированию каких-либо специализированных структур, как например клубеньки, однако, может сопровождаться образованием специфических бактериальных соединений и структур типа биоплёнок, субпопуляций и микроколоний, объединённых внеклеточным матриксом, который способствует прикреплению микроорганизмов на корнях растений (Bashan et al., 1995). Ассоциативные бактерии могут включать как штаммы, заселяющие ризосферу, эпифитные бактерии ризопланы и филлопланы, так и эндофитов, проникающих во внутренние ткани растений. При этом эндофиты не оказывают негативного влияния на рост и развитие растения-хозяина (Hallmann et al., 1997).

Формирование бактериальных ассоциаций с растением может включать несколько стадий: перемещение микроорганизмов к корням за счет хемотаксиса; их прикрепление и “заякоривание” в ризоплане; проникновение внутрь корня и колонизация межклеточного пространства, проникновение внутрь коровой паренхимы (Каменева и Муронец, 1999; Turnbull et al., 2001). Подвижные бактерии получают преимущество, поскольку хемотаксис облегчает начальный контакт микроорганизмов с корнями, выделяющими с экссудатами различные питательные и сигнальные вещества (Turnbull et al., 2001). Наиболее отчетливо эти факторы проявляются при формировании бобово-ризобийных симбиозов.

В то же время известно, что распределение микробных популяций в корневой зоне и ризосфере имеет волновой характер, который прослеживается не только вдоль растущего корня (Semenov, 1999), но также и в направлении, перпендикулярном его росту (Кожевин, 1989). Для адгезии на корневой поверхности в качестве агрегирующего и иммобилизующего агента бактериальные популяции используют секретируемый ими межклеточный матрикс. Образованный отдельными клетками, он формируется в виде капсул, псевдокапсул и/или внеклеточной слизи и состоит преимущественно из полисахаридов, липополи- и липоолигосахаридов, циклических глюканов, а также фибриллярных структур (Ботвинко, 1985; Высоцкий, 1988; Сафронова и Ботвинко, 1998; Каменева и Муронец, 1999; Sutherland, 2002). У бактерий, ассоциированных с растениями, можно выделить структуры от небольших кластеров до разросшихся биоплёнок (Ramey et al., 2004). Массивные покровы экзополисахаридного матрикса образуются грамотрицательными бактериями, тогда как у грамположительных бактерий матрикс

повторяет очертания самой клетки (Павлова и др., 1990). При этом необходимо отметить, что поверхность корня не является стабильной структурой, – активно растущий корень обычно имеет высокий уровень экссудации, что влияет на содержание питательных веществ в окружающей среде, а следовательно, и на эффективность образования субпопуляций и биоплёнок на корневой поверхности. Например, представители *Pseudomonas*, стимулирующие рост растений, осуществляют прерывистую колонизацию поверхности корня и развиваются как небольшие биопленки вдоль трещин эпидермиса (Bloembergen et al., 2000), в то время как фитопатогенные псевдомонады формируют плотные, сливающиеся биопленки на поверхностях корней (Walker et al., 2004).

В сущности, на растительной поверхности содержится огромное количество бактерий, которые, однако, распределены крайне неравномерно, – существует чередование пустых областей с областями, обильно заселенными бактериями, чаще всего, формирующими микроколонии или биопленки, являющиеся идеальным местом для межбактериальной коммуникации, в том числе quorum sensing (Lugtenberg et al., 2002). Главная стратегия таких бактериальных скоплений – 1) это защита популяции микроорганизмов, находящейся внутри, под покровом межклеточного матрикса, 2) эффективное использование низких концентраций питательных веществ, в том числе вырабатываемых другими микроорганизмами, 3) ослабление или полное подавление конкурентных микроорганизмов (Lugtenberg et al., 2002).

Таким образом, чрезвычайно разнообразные функции бактериального межклеточного матрикса (по большей части, экзополисахаридного), а именно защита клеток от обезвоживания (за счет его гидратированности), излучений, действия физико-химических факторов, антибиотиков и хищных видов простейших, участие в диффузии газов, адсорбции различных молекул и регуляции их поступления в клетки бактерий, позволяют этой структуре одновременно участвовать в трофических связях и создавать локальную окружающую среду вокруг клеток микроорганизмов и их колоний (Uhlir and White, 1983; Sutherland, 2002). Межклеточный матрикс играет существенную роль в поддержании общего гомеостаза бактериальной колонии (Сафронова и Ботвинко, 1998) и в структурировании природных ценозов (Олескин и др., 2000). Кроме того, многие полисахариды сами выступают в роли сигнальных молекул (липополисахариды, низкомолекулярные фракции ЭПС, циклоглюканы), обеспечивая успешность взаимодействия бактерий с растением и оптимизируя формирование микробно-растительных ассоциаций и симбиозов (Каменева и Муронец, 1999). Однако гиперсинтез ЭПС, к которому склонны фитопатогенные бактерии, может приводить к увяданию и

болезням растений из-за того, что большие полисахаридные молекулы, блокируют сосудистую систему растения, вызывая в итоге его гибель (Denny, 1995).

Бактерии намного активнее (в десятки и сотни раз) заселяют области экссудации растений, причём область ризосферы – это всего лишь миллиметры почвы (или субстрата), прилегающей к корню. В отличие от ризосферы, под ризопланой или филлопланой понимают непосредственно поверхность растений: корней или их вегетативных надземных частей. Все растения выделяют с корневыми экссудатами помимо воды, кислорода, и различных ферментов разнообразные органические соединения: прежде всего сахара, органические кислоты и аминокислоты, а также целый ряд различных соединений и вторичных метаболитов (Bais et al., 2006). Растительные экссудаты можно разделить на низкомолекулярные (аминокислоты, сахара, органические кислоты, фенольные соединения и вторичные метаболиты), отличающиеся большим разнообразием, и высокомолекулярные (слизистые выделения олиго- и полисахаридов, пептиды и белки), которые не так разнообразны, но могут составлять основную массу в составе экссудатов (Bais et al., 2006). Корневые эксудаты оказывают колоссальное влияние на развитие всего консорциума живых организмов. По некоторым данным, около 15% корневой поверхности покрыто микроорганизмами (Goswami et al., 2016).

Корневые экссудаты влияют на содержание почвенных элементов, действуя как хелаторы и повышая доступность микроэлементов, включая железо, медь, цинк или марганец (Dakora and Phillips, 2002). Органические кислоты могут также действовать как хелаторы ионов, но их главная роль заключается в солюбилизации фосфора. Выделяя фитотоксины в составе экссудатов, растение участвует в конкурентной борьбе и способно подавлять развитие других видов растений (аллелопатия; Bais et al., 2006). Но наибольшую значимость выделение корневых экссудатов приобретает в инициации своеобразного "перекрёстного разговора" растения с окружающими его микроорганизмами за счёт "общения" с помощью химических сигнальных молекул и соединений, участвующих в хемотаксисе. Хемотаксис и продуцируемые растением флавоноиды необходимы для нодуляции, распознавания и взаимодействия с клубеньковыми бактериями (например, *Bradyrhizobium japonicum*) и для симбиотических грибов микоризы, ассоциативных PGPB, но также фитопатогенов (*Phytophthora sojae*) и даже растений-паразитов (*Striga* sp.). Считается, что именно углеводы и аминокислоты в составе экссудатов привлекают ассоциативные PGPB штаммы (Somers et al., 2004). Кроме того, корневые экссудаты ускоряют и способствуют подвижности ряда почвенных бактерий, что является необходимым условием для успешной конкуренции и последующей колонизации корневой поверхности (Bais et al., 2006). Более того, ризосфера

является динамичной областью, в которой вновь образуемый углерод, получаемый с теми же корневыми экссудатами, а также "древний" углерод в составе почвенного органического вещества становятся доступными для роста и развития микроорганизмов, что значительно влияет на состав микробных сообществ (Haichar et al., 2008).

Основываясь на локализации бактерий, колонизирующих корневую систему растений, их группируют в ассоциативные бактерии ризосферы, ризо- или филлопланы, а также в группу эндофитов (Hallmann et al., 1997; Lodewyckx et al., 2002). Однако подобное разделение зачастую несёт лишь условный характер, так как представители одной группы легко переходят в другую или же могут встречаться во всех трёх группах одновременно. Вообще, большинство бактерий, заселяющих ризосферу, ризо- и филлоплану, формируют комплексные ассоциации, которые могут динамично меняться по своему таксономическому составу или функциональной организации микробных сообществ (Шапошников и др., 2011). Многие, а по современным представлениям, большинство ассоциативных бактериальных популяций играют значительную роль, оказывая положительное влияние на рост и развитие растения, повышая его всхожесть и урожайность, увеличивая общую биомассу за счёт стимуляции ризогенеза (корнеобразования) или формирования большего количества побегов и листьев, тем самым, увеличивая общую площадь фотосинтетической поверхности, влияя на более успешную адаптацию к изменяющейся окружающей среде и воздействию различных абиотических стрессов (чрезмерные осадки и подтопление, засуха, заморозки, засоление почвы) и биотических факторов (активность различных фитопатогенов: бактерий, грибов, простейших и нематод). Благоприятно-воздействующие на растение бактерии относят к рост-стимулирующим ризобактериям (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR), или к более общей категории, не приуроченной к корневой области, – PGPB (plant growth-promoting bacteria). При этом, например, эндофитные бактерии, которые встречаются в различных типах тканей у всех изученных в этом отношении высших растений (Lodewyckx et al., 2002), более эффективны, чем, например, ризосферные микроорганизмы, прежде всего, за счёт непосредственной локализации в тканях растения и прямого контакта с клетками растения-хозяина (Hallman et al., 1997), хотя механизмы их влияния такие же, как и у любых других PGPB штаммов (Jha et al., 2013).

Некоторые авторы разделяют PGPB по функциональной роли между трофической (обеспечивающей питание и рост растений) и защитной (способствующей защите и устойчивости растений) ролями (Шапошников и др., 2011). Но большинство исследователей оценивают влияние PGPB за счёт прямого или же опосредованного воздействия на растение-хозяина. Например, прямое воздействие микроорганизмов

вносит изменения в баланс фитогормонов или стимулирует метаболизм растения, что приводит к общему повышению адаптивных способностей растения-хозяина (Glick, 2014), тогда как не прямое воздействие требует участия собственных защитных механизмов растения, которые активируются в ответ на бактериальные элиситоры, причём зачастую не прямое воздействие PGPR становится наиболее очевидным в стрессовых условиях, будь то абиотические факторы или активность фитопатогенных организмов (Goswami et al., 2016).

К прямому воздействию, например, относится активность diaзотрофных прокариот, фиксирующих молекулярный азот за счёт активности исключительно бактериального фермента – нитрогеназы. **Азотфиксация** является процессом, характерным только для прокариот, который позволяет естественным образом пополнять почвенные запасы азота. Считается, что в северных широтах diaзотрофы ассимилируют от 5-10 до 25-94 кг/га азота, тогда как в тропиках это значение достигает 90-600 кг/га (Умаров, 1986; Dart, 1986). По другим данным бактериальная азотфиксация колеблется в пределах 20-30 кг усвоенного азота на гектар в год (Goswami et al., 2016). При этом за счёт большего распространения и разнообразия PGPR, ассоциативная азотфиксация представлена значительно шире, чем симбиотическая, а её вклад в баланс азота на Земле существенно выше, чем у симбиотической (Умаров, 1986). Помимо известных азотфиксаторов в бобово-ризобияльных симбиозах (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Sinorhizobium*), представителями симбиотических diaзотрофов являются актиномицеты *Frankia*, формирующие симбиотические отношения с деревьями из родов *Alnus* и *Casuarina*, а также значительная часть цианобактерий, среди которых наиболее активными представителями считаются образующие гетероцисты *Anabaena*, *Nostoc*, *Scytonema* и *Calothrix*, нитчатые, не образующие гетероцисты, *Oscillatoria* и *Phormidium*, а также одноклеточных *Prochloron*, *Aphanocapsa* и *Synechocystis* (Bergman et al., 2007).

Активными азотфиксаторами среди свободноживущих и ассоциативных бактерий являются представители родов *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Klebsiella*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* и *Paenibacillus* (Bhattacharyya and Jha, 2012; Goswami et al., 2016), а наиболее эффективными эндофитными diaзотрофами – *Azoarcus*, *Gluconacetobacter* и *Herbaspirillum*. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azorhizobium caulinodans* и некоторые штаммы *Azospirillum*, заселяющие коровую паренхиму корней, во многих исследованиях отмечены как PGPR штаммы, оказывающие своё положительное воздействие именно за счёт азотфиксации. Колонизируя внутренние части корней с пониженным парциальным давлением кислорода, эндофиты получают преимущества для осуществления

азотфиксации и оптимизируют таким образом условия для активности нитрогеназы (Lodewyckx et al., 2002). Так, при расчётах количества азота, полученного из воздуха в процессе азотфиксации ассоциативными и симбиотическими бактериями было показано что, например, для ассоциаций с рисом у *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* этот показатель составил от 20 до 28%, для *Herbaspirillum* – 19-47%, а для *Klebsiella pneumoniae* – 42% (Jha et al., 2013).

Среди спорообразующих грамположительных бактерий почвы доля азотфиксаторов из рода *Bacillus* может достигать 19% (Мелентьев, 2007). Выделенные в отдельный род *Paenibacillus*, некоторые виды, ранее принадлежавшие к бациллам, также способны к азотфиксации, – это *P. odorifer*, *P. graminis*, *P. peoriae*, *P. brasilensis*, а у других представителей этого рода (*P. azotofixans*, *P. macerans*, *P. polymyxa*, *P. graminis*, *P. odorifer*) обнаружен кластер *nif* генов (Goswami et al., 2016). Именно представители *Paenibacillus* наиболее широко распространены и встречаются среди ассоциативных PGPR различных растений, в том числе эндофитно.

Солюбилизация фосфатов, которые обычно находятся в почве в нерастворимых формах (фосфаты, апатиты, оксо- и гидроксиапатиты, трикальцийфосфаты и фосфорсодержащие горные породы), а также в виде органических почвенных фитатов (фосфаты инозита), нуклеиновых кислот, глицерофосфатов и фосфолипидов, фосфо-моно- и триэфиров, также является важнейшим свойством PGPB (Glick et al, 2007). Недоступность фосфора для растений обусловлена тем, что растения могут поглощать лишь растворимые дигидрофосфат- (H_2PO_4^-) и, в меньшей степени, гидрофосфат- (HPO_4^{2-}) ионы (Bhattacharyya and Jha, 2012). За счёт образования таких органических кислот как уксусной, лимонной, молочной, глюконовой, янтарной, масляной, яблочной, гликолевой, α -кетоглутаровой и фумаровой бактерии, колонизирующие ризосферу и ризоплану, повышают доступность фосфора для растений, тем самым снижая голодание по этому макроэлементу (Агафонова и др., 2014). Ряд ферментов, участвующих в солюбилизации фосфатов, – это бактериальные С-Р лиазы, неспецифические кислые фосфатазы и фитазы. Бактерии также осуществляют и обратный процесс перевода фосфатов в нерастворимое состояние за счёт их минерализации, путём образования фосфатаз, гидролизующих органические эфиры фосфорных кислот (Glick, 2012).

По некоторым оценкам, общее количество фосфат-солюбилизирующих бактерий достигает 20-40% от всех культивируемых бактерий, выделяемых из почвы (Goswami et al., 2016). Среди них наиболее активными являются представители родов *Bacillus*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Citrobacter*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Serratia* и *Rhizobium* (Park et al., 2010;

Achemad and Kibert, 2014), а также многие представители метилотрофов – фитосимбионтов растений: *Ancylobacter*, *Delftia*, *Methylobacillus*, *Methylobacterium*, *Methylophilus*, *Methylovorus*, *Methylopila* (Агафонова и др., 2014).

Непосредственным воздействием PGPB на рост и развитие растения-хозяина является способность микроорганизмов к **биосинтезу стимуляторов роста растений**, прежде всего ауксинов (ключевое соединение – индолил-3-уксусная кислота), а также в меньшей степени цитокининов и гиббереллинов (подробно речь об этих фитогормонах, механизмах их биосинтеза и их роли пойдет в главе 3).

Многие ассоциативные бактерии обладают способностью повышать системную устойчивость растения-хозяина в стрессовых условиях, например, при недостатке или избытке влаги, экстремально высоких или низких температурах, в присутствии тяжёлых металлов, засолении. В частности, это свойство индуцируется при образовании микроорганизмами АЦК-деаминазы, фермента, который трансформирует 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (АЦК) в α -кетобутират и аммиак. При этом АЦК является предшественником синтеза этилена – основного ингибитора роста растений и его биосинтез активизируется при воздействии стрессовых а- и биотических факторов. Активность АЦК-деаминазы выявлена у бактерий *Azospirillum*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Ralstonia*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Serratia* и а дрожжей *Hansenula saturnus* (Белимов и Сафронова, 2011; Achemad and Kibert, 2014). Некоторые бактерии могут использовать АЦК как источник азота и углерода, а АЦК-утилизирующие бактерии обнаружены как среди сапротрофных, так и патогенных микроорганизмов почвы, ризосферы, ризопланы и филлосферы различных растений (Белимов и Сафронова, 2011). Известно, что многие бактерии, образующие АЦК-деаминазу, принадлежат к роду *Pseudomonas*, среди которого есть как патогенные виды растений, так и виды, стимулирующие системную устойчивость у растений. Также, среди активных продуцентов этого фермента выделяют различных представителей симбиотических ризобактерий из родов *Mesorhizobium*, *Rhizobium* и *Sinorhizobium*, поскольку известно, что этилен в высоких концентрациях препятствует формированию симбиоза между клубеньковыми бактериями и бобовыми растениями (Guinel and Geil, 2002; Белимов и Сафронова, 2011).

К непрямому механизму воздействия PGPR относят образование этими бактериями **сидерофоров**. Из-за того, что в аэробных условиях и физиологическом pH двухвалентное железо нестабильно, основная форма, в которой оно встречается в природе – это окисленное (Fe^{3+}). Сидерофоры – это низкомолекулярные водорастворимые хелаторы ионов трёхвалентного железа (Fe^{3+}). Железо (Fe^{3+}), образуя комплекс с сидерофором,

восстанавливается до состояния Fe^{2+} и далее высвобождается внутри клетки. Для его переноса через мембрану грамотрицательные бактерии, например, *Pseudomonas aeruginosa*, имеют специализированные белки-рецепторы, связывающие комплекс Fe^{3+} -сидерофор и проводящие его активный перенос в периплазму против градиента концентрации (Леонов и др., 2016). Сидерофоры представляют собой небольшие пептидные молекулы, имеющие боковые цепи и функциональные группы, которые представляют собой высоко-аффинные лиганды, связывающие и координирующие ионы железа. В зависимости от химической природы этих групп их можно разделить на несколько классов – катехолаты (образуемые, например, энтеробактериями и стрептомицетами), фенолаты (как у *P. aeruginosa* или представителей *Yersinia*), гидроксаматы (образуемые *Alcaligenes denitrificans*, *Bordetella pertussis*, *Streptomyces pilosus*), карбоксилаты (*Streptomyces pilosus*, *Erwinia chrysanthemi*), а также сидерофоры смешанного типа, соответствующие одновременно двум классам: например, у *B. cereus*, *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Rhodococcus erythropolis* (Леонов и др., 2016). По сути, сидерофоры действуют как солибилизирующие агенты для металлов, находящихся в составе минералов или в составе органических веществ.

Сидерофоры, образуемые микроорганизмами, также могут формировать комплексы с другими, в том числе тяжёлыми, металлами, например, алюминием, кадмием, медью, цинком, свинцом (Kiss and Farkas, 1998; Neubauer et al., 2000). В этом случае, бактерии, находящиеся в почве, облегчают негативное воздействие тяжёлых металлов на растение. Известно о способности PGPR стимулировать рост растений на загрязнённых тяжёлыми металлами почвах, в том числе за счёт связывания их сидерофорами и образования комплексных соединений. Это было показано, в частности, на примере представителей *Arthrobacter mysorens* 7, *Flavobacterium* sp. L-30 и *Klebsiella mobilis* CIAM 880, которые снижали токсичное действие кадмия на рост растений ячменя (Pishchik et al., 2002). Кроме того, сидерофоры катехолатного типа, образуемые diaзотрофными *Azospirillum lipoferum*, играют важную роль в условиях лимитированных не только по железу, но и по азоту, когда этот тип сидерофоров участвует в транспорте в клетку железа и молибдена, необходимых для работы нитрогеназы. Образование сидерофоров PGPB также рассматривают как один из аспектов антагонизма, так как бактерии получают преимущество при поглощении соединений железа в лимитированных условиях, лишая фитопатогенных грибов этого макроэлемента, что было показано на примере взаимодействия псевдомонад и фитопатогенного *Fusarium oxysporum* (Kloepper et al., 1980). Имеются данные, что микробные сидерофоры улучшают поглощение железа растениями, так как растения способны распознавать бактериальные железо-сидерофорные комплексы

(Masalha et al., 2000; Dimkpa et al., 2009), однако, до сих пор не ясно, насколько значительным является вклад сидерофор-образующих бактерий в удовлетворение потребностей растений в железе.

К другим механизмам, стимулирующим рост растений и повышающим их системную устойчивость, можно отнести образование **летучих органических соединений** (ЛОС): например, *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* выделяют 2,3-бутандиол, значительным образом стимулирующий защитные механизмы у проростков арабидопсиаса (Ryu et al., 2004). *Enterobacter cloacae* образует ацетоин – 3-гидрокси-2-бутанон (Khalifa et al., 2016), известный элиситер, индуцирующий системную устойчивость растений. Так, ацетоин, выделяемый *E. aerogenes*, повышает устойчивость растений кукурузы к фитопатогенному грибу *Setosphaeria turcica* (D'Alessandro et al., 2014). Одним из механизмов действия летучих компонентов является регуляция гомеостаза и баланса индолил-3-уксусной кислоты в растении, что было показано на примере штамма *Bacillus subtilis* GB03, летучие соединения которого вызывали уменьшение накопления ауксина в листьях и увеличение их содержания в корнях за счёт изменения экспрессии ряда генов (Zhang et al., 2007). Другие авторы отмечают возможность ЛОС регулировать баланс Na^+ в растительных клетках. В условиях солевого стресса, высокоафинный НКТ1-переносчик ионов калия, который является K^+ , Na^+ -симпортером принимает непосредственное участие в регуляции импорта ионов натрия в корни. ЛОС *Bacillus subtilis* GB03 увеличивают устойчивость растения к солевому стрессу за счет регуляции активности НКТ1, снижая её в корнях и повышая в побегах, соответственно, что приводит к общему снижению накопления Na^+ в растении (Yang et al., 2009).

Известно, что PGPR штаммы могут также способствовать повышению устойчивости растений в условиях **окислительного стресса** и токсичного действия перекиси водорода, а также защите от супероксид иона ($\text{O}_2^{\cdot-}$), синглетного кислорода ($^1\text{O}_2^{\cdot-}$) и гидроксильного радикала ($\text{OH}^{\cdot}$). Эти активные формы кислорода разлагаются под воздействием растительных ферментов, таких как пероксидаза, супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, аскорбатпероксидаза и глутатионредуктаза, которые содержатся преимущественно в хлоропластах и митохондриях (Apel and Hirt, 2004). Было показано, что PGPR штаммы регулируют активность этих ферментов, особенно в условиях воздействия стрессовых факторов: например, инокуляция растений томатов, выращенных в условиях солевого стресса, штаммом *B. cereus* AR156 повышала синтез и активность пероксидазы, СОД и каталазы (Goswami et al., 2016). При инокуляции растений латука (*Lactuca sativa* L. cv. Tafalla) культурой *Pseudomonas mendocina* также наблюдали

значительное повышение синтеза растительных ферментов пероксидазы и каталазы, особенно в условиях солевого стресса (Kohler et al., 2009).

К непрямому воздействию на рост растений также относят антагонистические свойства многих PGPR, которые ингибируют рост патогенных микроорганизмов за счёт образования антибиотиков, сидерофоров или внеклеточных литических ферментов. Среди продуцентов **антимикробных** соединений наиболее всего изучены "биоконтрольные агенты" – бациллы и псевдомонады. Различные виды рода *Pseudomonas* образуют антимикробные соединения, механизм действия которых связан с нарушением синтеза клеточной стенки, проницаемостью мембран, нарушением синтеза белков и ингибированием активности дыхательных ферментов (Максимов и др., 2015). Так, широкий спектр антибиотиков, образуемых *P. fluorescens* и *P. aeruginosa* включает производные феназинов (гетероциклических азот-содержащих соединений) – феназин-1-карбоновую кислоту, феназин-1-карбоксамид; фенилпирролы – пирролнитрин (Lugtenberg and Kamilova, 2009), поликетидные антибиотики – пиолеуторин, флороглюцин и 2,4-диацетилфлороглюцинол (DAPG). Среди антифунгальных соединений, образуемых псевдомонадами, можно также выделить оомицин А, вискозинамид, бутиролактоны, экомицины, амнолипиды, цепацимид А. Антибактериальными свойствами обладают псевдомоновая кислота и азомицин, противовирусными – каралицин, а противоопухолевыми – соединение FR901463 и цепафунгин (Fernando et al., 2005). Выделяемые псевдомонадами DAPG и феназины (PHZ) показали высокую активность в отношении фитопатогенных грибов – *Sclerotinia sclerotiorum* и *Fusarium oxysporum* (Jha et al., 2013).

Феназины, помимо псевдомонад, также образуют представители родов *Burkholderia*, *Brevibacterium*, *Streptomyces* (Fernando et al., 2005). Для различных видов бацилл отмечено образование бактериоцинов, сходных с пептидными лантибиотиками и педиоцин-подобными пептидами молочнокислых бактерий. Эти соединения ингибируют рост различных бактерий, а также мицелиальных грибов и дрожжей. Так, часто обнаруживаемая среди ассоциативных бактерий многих растений *Bacillus pumilus* образует пумилицин с антибактериальной активностью в отношении ванкомицин-устойчивого *Enterococcus faecalis* (Aunpad and Na-Bangchang, 2007). Среди бацилярных антибиотиков наиболее известны канозамин, цвиттермицин А, итурин А (циклопептид), бацилломицин, плипастатин А и В (Fernando et al., 2005). Антибиотики, выделяемые бациллами, активны в отношении таких фитопатогенных грибов, как *F. oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria solani*, *Aspergillus flavus*, *Helminthosporium maydis*, *Phomopsis gossypii* и *Botryosphaeria ribis* (Максимов и др., 2015).

Летучие соединения также обладают антимикробной активностью, например, альдегиды, спирты, кетоны и HCN. Лактоны, выделяемые псевдомонадами, например N-ацил-гомосерин лактон, известный как сигнальное соединение, регулирующие взаимодействия как внутри колонии микроорганизмов, так и коммуникацию между различными бактериями в микробном сообществе по типу кворум-сенсинга (Олескин и др., 2000), также оказывает воздействие на экспрессию генов, ответственных за синтез ряда вторичных метаболитов, в том числе антимикробных соединений (Pierson et al., 1998).

Бактерии могут ограничивать рост других микроорганизмов за счёт образования гидролитических **ферментов**, таких как хитиназа, β -1,3-глюканаза, протеаза. Первые два фермента разрушают, соответственно, хитин и глюканы, входящие в состав клеточной стенки микромицетов. *Serratia marcescens* и *Paenibacillus* sp. выделяют хитиназы с выраженной антифунгальной активностью в отношении *Sclerotium rolsii* и *Fusarium oxysporum*, соответственно (Ordentlich et al., 1988). *Burkholderia cepacia* подавляет развитие других фитопатогенных микромицетов – *Rhizoctonia solani*, *R. rolsii* и *Pythium ultimum* за счёт синтеза β -1,3-глюканазы (Jha et al., 2013). Другая бактерия, *Lysobacter enzymogenes*, также за счёт образования этого фермента, является биоконтролирующим агентом заболеваний, вызываемых возбудителями листовой пятнистости (*Bipolaris* sp.) овсяницы и увядания (*Pythium* sp.) сахарной свеклы (Palumbo et al., 2005). Хитиназы, образуемые флуоресцентными псевдомонадами, способствуют антигрибной активности в отношении возбудителя красной гнили сахарного тростника – *Colletotrichum falcatum* (Viswanathan and Samiyappan, 2001). Комплекс внеклеточных ферментов: хитиназ, хитозаназ, глюканазы и протеаз, выделяемых штаммом *B. subtilis*, оказался активным в отношении ряда фитопатогенных грибов: *Fusarium culmorum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata* и *Bipolaris sorokiniana* (Актуганов и др., 2007). Целый ряд соединений и токсинов, которые образуют псевдомонады и бациллы, также обладают активностью против нематод и насекомых. Отмечено, что при пониженных температурах в процессе хитинолиза возрастает роль грибов, а среди бактерий преобладают протеобактерии, тогда как при высоких температурах основными деструкторами хитина становятся прокариоты, преимущественно из группы *Actinobacteria* (Манучарова и др., 2011).

К другим свойствам RGPB можно отнести образование **биосурфактантов** (биоПАВ) – поверхностно-активных соединений, представляющих собой амфифильные молекулы, состоящие из гидрофильной и гидрофобной частей, снижающих межфазное и поверхностное натяжение воды (Льонг и др., 2015; Kügler et al., 2015), что позволяет формировать гели с малорастворимыми гидрофобными соединениями и повышать, таким

образом, их доступность для растений в ризоплане и филлоплане (Макисмов и др., 2015). К низкомолекулярным биоПАВАм с высокой активностью относят гликолипиды, жирные кислоты, фосфолипиды и липопептиды, а к высокомолекулярным – полисахариды, белки, липопротеины и липосахариды, которые обладают высокой эмульгирующей активностью, но при этом не снижают поверхностное натяжение (Льонг и др., 2015). Наиболее активными продуцентами биосурфактантов являются представители актинобактерий порядка *Actinomycetales*: *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Norcadia*, *Gordonia*, *Anthrobacter*, а образование этих соединений повышается при росте на гидрофобных углеродсодержащих соединениях, а также в стрессовых по доступности питательных веществ условиях (Kügler et al., 2015).

Таким образом, ассоциативные PGPB, колонизирующие ризоплану и филлоплану, предоставляют растению широкий спектр "услуг", отдельно и в совокупности, благоприятствующих росту, развитию, расширению адаптационных возможностей и повышению устойчивости растения-хозяина. В результате формирования тесных растительно-микробных взаимоотношений на поверхности и во внутренних тканях растений формируются сообщества микроорганизмов, которые выполняют роль фитостимуляторов, биоудобрения, агентов биоконтроля заболеваний, а также участвуют в биоремедиации и повышении иммунного статуса растения-хозяина, указывая на необходимость существования именно таких комплексных консорциумов для формирования биома растений.

1.4. Фитогормоны и гормоноподобные соединения, образуемые микроорганизмами

Одной из характеристик PGPB является их способность к образованию фитогормонов – стимуляторов роста растений, которые оказывают непосредственное воздействие на развитие растения и его физиологические и метаболические процессы. Фитогормоны и их основополагающая роль в физиологических процессах растений известна с конца 30-х годов прошлого века, когда F.W. Went и K.V. Thimann (1937) опубликовали свою работу в книге "Фитогормоны" (цит. по Tudzynski and Sharon, 2002). При этом первыми биологически-активными веществами, к которым был применен термин "фитогормон" были именно ауксины. К классической "пятёрке" фитогормонов в настоящее время относят ауксины, гибберелины (гибберелловые кислоты), цитокинины, этилен и абсцизовую кислоту (Чайлахян, 1982; Weyers and Paterson, 2001), а также жасмоновую кислоту, брассиностероиды (брассинолиды) и олигосахариды. В

русскоязычной литературе, термин "гормон роста" был использован в работе Н.Г. Холодного (Холодный, 1939), когда действие фитогормонов связывали, прежде всего, с влиянием на ростовые характеристики растений. Однако эти соединения играют ключевую роль в регуляции и координации целого ряда процессов, включая прорастание и введение в состояние покоя, образование и рост корней, цветение и созревание плодов, устойчивость к фитопатогенам и абиотическим стрессам; они индуцируют или подавляют экспрессию ряда генов и образование ферментов и метаболитов (Цавкелова 2006а). При этом и ауксины (индолил-3-уксусная кислота), и гиббереллины исходно были обнаружены не в растениях, а в микромицетах, – *Rhizopus suinus* и *Fusarium fujikuroi*, соответственно, – задолго до их выделения из высших растений (Tudzynski and Sharon, 2002).

Биосинтез фитогормонов широко распространён среди микроорганизмов, ассоциированных с растениями. Некоторые фитопатогены также могут образовывать стимуляторы роста растений, однако, зачастую в количествах, значительно превосходящих их уровень, необходимый для растений. Так, при заражении, например, *Ralstonia (Pseudomonas) solanaceum* концентрация ауксинов в растении может повышаться в сотни раз (Agrios, 1997). Подобный гиперсинтез приводит к дисбалансу в гормональной системе растения (Yamada, 1993), что может вызывать задержку роста и увядание, или наоборот, чрезмерное ветвление и разрастание вегетативных частей растения, а также провоцировать развитие ряда заболеваний, например, галловых обрастаний, пузырчатой головни, килы (Yamada, 1993; Shimada et al., 2000; Chung et al., 2003; Yurekli et al., 2003). Такая же ситуация наблюдается и при агрессивном поведении фитопатогенных грибов, которые вызывают ряд симптомов, связанных с гиперсинтезом ими фитогормонов – например, при резком удлинении стеблей риса при заражении *Fusarium fujikuroi*, образующим значительные количества гиббереллинов.

В то же время, способность к биосинтезу фитогормонов является одной из основных характерной чертой симбиотических бактерий и микоризообразующих грибов, а также различных RGPB, ассоциированных с растениями. Кроме того, микроорганизмы, чья жизнедеятельность не связана с растениями, тоже образуют фитогормоны. К основным стимуляторам роста растений относят ауксины, гиббереллины и цитокинины.

1.4.1 Ауксины

Ауксины являются производными индолов и являются ключевыми стимуляторами роста растений, проявляя разнообразные и многочисленные эффекты, прежде всего в процессах морфогенеза растений за счет стимуляции деления, роста и растяжения, а также дифференциации клеток и тканей растений (Davies, 1995; Чуб, 2003). Наибольшей

биологической активностью обладает индолил-3-уксусная кислота (ИУК, рис. 7), но в растениях встречаются также и некоторые другие близкие по строению к ИУК соединения с ауксиновой активностью, такие как индолил-3-масляная и фенилуксусная кислоты. ИУК индуцирует прорастание и ускоряет процессы ксилемо- и корнеобразования, регулирует процессы вегетативного роста, тропизма, цветения и плодоношения растений, а также влияет на фотосинтез, образование пигментов, биосинтез различных метаболитов и устойчивость растений к стрессовым факторам (Peleg and Blumwald, 2011).

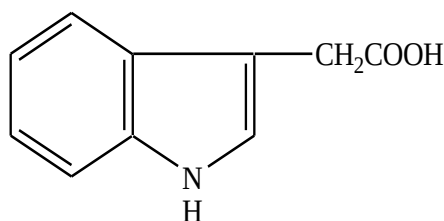


Рисунок 7. Индолил-3-уксусная кислота.

Поглощение ИУК клеткой осуществляется в режиме симпорта с протоном. Поэтому одним из первых ответов на воздействие ИУК в растительных клетках является активация мембранной H^+ -АТФазы, осуществляющей выкачивание протонов из клетки, а также калиевых и кальциевых ионных каналов, обеспечивающих поступление в клетку K^+ и Ca^{2+} , соответственно (Шишова и др., 1999; Benjamins and Scheres, 2008). Формирование трансмембранного градиента протонов обеспечивает поступление в клетку сахаров, слабых кислот, аминокислот и других соединений, необходимых для роста клетки (Полевой, 1982; Benjamins and Scheres, 2008). Однако, противоположные процессы также связаны с работой протонной помпы, когда активация кислых гидролаз может вызывать в клетке процессы старения и деградации. Непосредственное влияние ауксин оказывает и на экспрессию генов растения, связываясь со специфическими рецепторами и проникая в ядро, где активирует синтез РНК. Ауксин может влиять и на трансляцию, увеличивая число полисом, а также активировать синтез специфических белков (Полевой, 1982).

Способность к образованию ауксинов обнаружена у многих бактерий, заселяющих ризосферу, ризоплану и филлоплану растений. Некоторые исследователи считают, что около 80% от изолятов бактерий, выделенных из ризосферы, способны в той или иной мере к биосинтезу ИУК (Patten and Glick, 1996; Khalid et al., 2004), а эпифитная микрофлора играет ключевую роль в конверсии триптофана, выделяемого с корневыми экссудатами высших растений в ауксин (Мишке, 1988; Кравченко, 2000). Образование ИУК обнаружено, например, у *Azotobacter*, *Flavobacterium*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Alcaligenes*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas* (Costacurta and Vanderleyden, 1995; Каменева и Мыронец, 1999; Datta and

Basu, 2000; Цавкелова и др., 2006а; Spaepen et al., 2011; Ahemad and Kibret, 2014; Tsavkelova et al., 2016а). Биосинтез ИУК также широко представлен у различных видов псевдомонад, бацилл и пенибацилл (Мордухова и др., 1991; Олюнина и Шабает, 1996; Suzuki et al., 2003; Цавкелова и др., 2006а; Beneduzi et al., 2008; Ali et al., 2009; Jha et al., 2013), а также у стрептомицетов (Manulis et al., 1994) и метилобактерий, в том числе *Methylobacterium*, *Methylovorus*, *Aminobacter*, *Paracoccus*, *Xanthobacter*, *Albibacter* (Троценко и др., 2001; Доронина и др., 2002; Kwak et al., 2014).

Среди цианобактерий образование ауксинов отмечено как у свободноживущих, так и у симбиотических видов, принадлежащих к родам *Nostoc*, *Chlorogloeopsis*, *Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Anabaenopsis*, *Gloeotheca*, *Plectonema*, *Calothrix* (Mohan and Mukerji, 1979; Селях и Семенова, 2000; Sergeeva et al., 2002; Liaimer, 2002; Hussain et al., 2010; Hashtroudi et al., 2013). Данные о биосинтезе ИУК фототрофными эукариотическими микроорганизмами не так многочисленны и представлены результатами исследований на представителях некоторых бурых (*Fucus*, *Ascophyllum*), красных (*Botryocladia*) и зелёных (*Enteromorpha*, *Chlorella*, *Synechocystis*, *Cladophora*, *Dunaliella*) водорослей (Basu et al., 2002; Тараховская и др., 2007; Stirk et al., 2013).

Биосинтез ИУК и других ауксинов обнаружен у фитопатогенных грибов *Ustilago*, *Alternaria*, *Taphrina*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Plasmodiophora*, *Colletotrichum*, *Rhizoctonia*, *Phymatotrichum*, *Lentinus* и *Sclerotium* (Gunasekaran and Weber, 1972; Gunasekaran, 1978; Robinson et al., 1998; Yurekli et al., 2003; Chung et al., 2003; Maor et al., 2004; Цавкелова и др., 2006а; Reineke et al., 2008; Tsavkelova et al., 2012) и среди симбиотических микоризообразователей из родов *Rhizopogon*, *Laccaria*, *Amanita*, *Pisolithus*, *Hebeloma*, *Paxillus* (Gopinathan and Raman, 1992; Laurans et al., 2001; Niemi et al., 2002; Rincon et al., 2003). ИУК образуется и другими представителями мицелиальных грибов, например, *Rhizopus*, *Absidia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monilia*, *Phoma*, *Pythium*, *Actinomucor* и *Trichoderma* (Gunasekaran and Weber, 1972; Мишке, 1988; Shin et al., 1991; Furukawa et al., 1996; Shimada et al., 2000; Wu, 2002; Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2006а), а также у некоторых дрожжей: *Rhodotorula graminis* и *Rhodotorula mucilaginosa*, – эндофитов тополя (Xin et al., 2009), или других родов: *Candida*, *Rhodosporidium*, *Torulaspora*, *Lodderomyces*, выделенных из филлопланы сахарного тростника (Limtong et al., 2014).

При этом известно, что количество образуемой ИУК может значительно отличаться не только среди видов, принадлежащих к одному роду, но и внутри одного вида, когда встречаются и высокоактивные, и низкоактивные штаммы-продуценты ауксинов, а также изоляты, не образующие ИУК (Thakur and Vyas, 1983; Мишке, 1988;

Мордухова и др., 1991; Олюнина и Шабает, 1996; Боронин, 1998; Ansari and Sridhar, 2000; Sergeeva et al., 2002; Цавкелова и др., 2006а; Tsavkelova, 2011). Например, из более чем двухсот штаммов ризосферных псевдомонад, были выявлены штаммы, образующие значительные количества ИУК, и практически не активные в этом отношении штаммы (Мордухова и др., 1991). У энтеробактерий содержание ауксинов также варьирует, например, у *Erwinia herbicola* отмечен биосинтез ИУК, соответствующий 140 мкг/мл ИУК (Lindow et al., 1998), а у колонизирующей корни бактерии *Enterobacter cloacae* – лишь 1,0 мг/мл ИУК (Koga et al., 1991).

В большинстве исследований обнаружение ИУК проводили в культуральной жидкости бактерий или фильтратах культур грибов, подтверждая то, что основная часть ауксинов, как и многих других вторичных метаболитов, экскретируются микроорганизмами вовне. Однако, в ряде работ показано наличие ИУК непосредственно внутри клеток микроорганизмов (Tudzynski and Sharon, 2002). Ек с соавторами (1983) измерили содержание ИУК в фильтратах 19-ти изолятов микоризообразующих грибов, из которых 17 образовывали ауксин в концентрации от 0,016 до 20 мкг/мг (сухой массы) мицелия, причём у большинства из грибов ИУК обнаруживалась в среде, однако, у представителя *Senococcum graniforme* только 27 нг/мг (в пересчете на вес сухой биомассы) детектировалось в фильтрате, тогда как большее содержание ауксинов – около 80 нг/мг находилось именно в мицелии этого гриба.

В высших растениях ауксины образуются преимущественно в меристематических тканях молодых листьев, цветов и плодов, в камбии и проводящих пучках, а также в пыльце и формирующихся семенах. Биосинтез ИУК происходит в основном *de novo* из молекулы триптофана с формированием промежуточных соединений – индолил-3-пировиноградной кислоты (ИПвК, IPA) или индолил-3-ацетамида (ИАМ, IAM), или через триптамин (ТАМ) с образованием индолил-3-уксусного альдегида (ИАльд, IAld) (рис. 8).

Возможно наличие триптофан-независимых путей биосинтеза ИУК, хотя их активность досконально и полностью еще не изучены (Woodward and Bartel, 2005). Также растения получают ИУК путём окисления индолил-3-масляной кислоты или гидролизуя ИУК-конъюгаты, в которых ИУК связана с аминокислотами, сахарами или пептидами. Инактивация ауксина происходит при его ферментативном окислении оксидазой, повышенная активность которой наблюдается, например, в корнях и при старении тканей растений (Agrios, 1997).

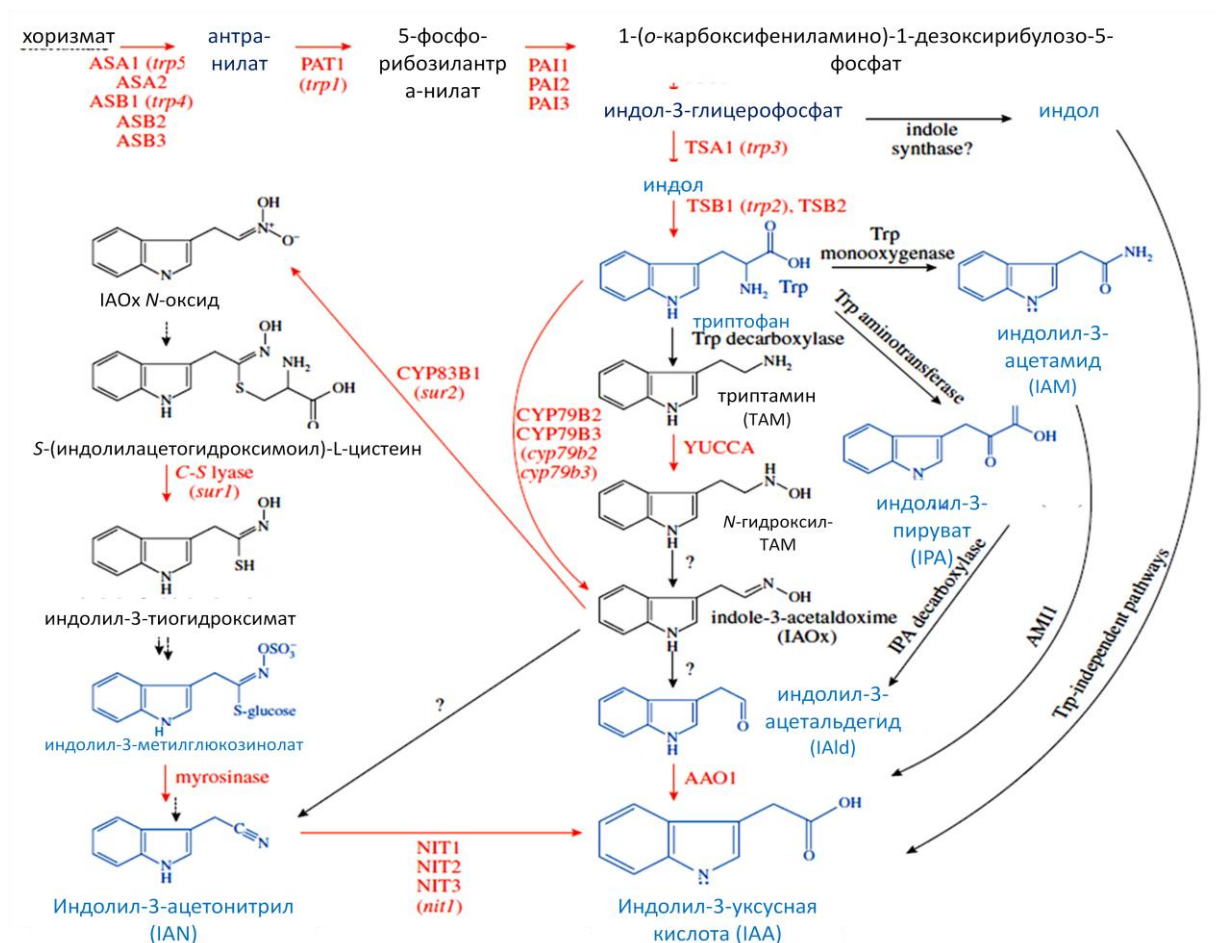


Рисунок 8. Пути биосинтеза ИУК на примере арабидопсиса. Механизмы биосинтеза ИУК (IAA) *de novo* инициируются из триптофана (Trp) или триптамина (Trp). Соединения, количественно определённые в арабидопсисе отмечены синим цветом; ферменты, для которых идентифицированы гены, имеющиеся у арабидопсиса, отмечены красным цветом, а гены, активные у полученных мутантов арабидопсиса отмечены курсивом. Вопросительным знаком отмечены предполагаемые пути, которые не подтверждены экспериментально. Биосинтез и конверсия триптофана проходят в хлоропластах, тогда как многие Trp-зависимые ферменты биосинтеза ИУК являются цитоплазматическими (с изменениями по источнику: Woodward and Bartel, 2005).

Основные пути образования ауксина у микроорганизмов также напрямую связаны с метаболизмом триптофана (Costacurta and Vanderleyden, 1995; Каменева и Муронец, 1999; Spaepen et al. 2007, 2011) и происходят по пяти основным известным путям биосинтеза ИУК (рис. 9). У многих микроорганизмов могут осуществляться несколько путей одновременно, в то время как у других – превалирует какой-то один из них:

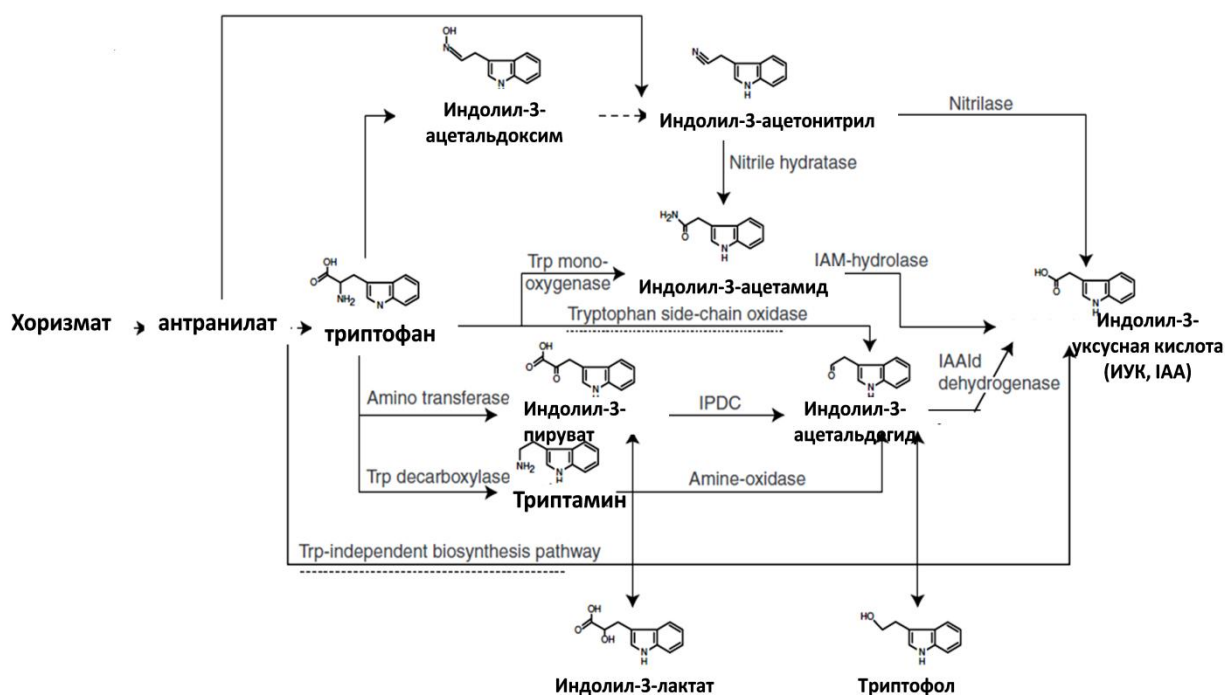


Рисунок 9. Пути биосинтеза ИУК у бактерий (с изменениями по источнику: Spaeren et al., 2011).

1. Образование ИУК через **индолил-3-пировиноградную кислоту (ИПвК)** и индолил-3-уксусный альдегид (индолил-3-ацетальдегид, ИУАльд), которые являются основными интермедиатами при биосинтезе ауксинов у растений, обнаружены и у большинства исследованных микроорганизмов, например, фитопатогенной бактерии *Erwinia herbicola* (Manulis et al., 1998) и грибов из родов *Fusarium*, *Rhizoctonia* и *Colletotrichum*, сапрофитных видов бактерий, принадлежащих к родам *Agrobacterium/Rhizobium* (Kaneshiro et al., 1983) и *Pseudomonas*, у многих представителей PGPB – *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* и *Paenibacillus* (Koga et al., 1994; Brandl and Lindow, 1996; Муронец, 1997; Manulis et al., 1998; Каменева и Муронец, 1999; Цавкелова и др., 2006а; Spaeren et al., 2011), метиловых бактерий (Иванова и др., 2001), симбиотической азотфиксирующей цианобактерии *Nostoc* sp. (Sergeeva et al., 2002) и дрожжей *Saccharomyces uvarum* (Shin et al., 1991). Для фитопатогенного гриба *Ustilago maydis* помимо метаболитов, присущих этому пути, была также обнаружена экспрессионная активность генов, ответственных за биосинтез характерных для этого пути ферментов (Reineke et al., 2008).

На первых этапах этого пути триптофан превращается в ИПвК с участием триптофан-аминотрансферазы. Далее ИПвК декарбоксилируется в следующей реакции с участием ключевого фермента – индолил-3-пируватдекарбоксилазы (ИПДК, IPDC) и превращается в ИУАлд, который окисляется до конечного продукта – ИУК. ИПДК

кодируется геном *ipdC*; он был выделен, например, из *Azospirillum brasilense* и *Az. lipoferum*, *En. cloacae*, *Ps. putida* и *Pantoea agglomerans* (Sphaeren et al., 2007). При этом специфичность этого фермента по субстратам может отличаться между различными бактериями из-за отличий в аминокислотном составе: так, например, у микобактерий (*Mycobacterium tuberculosis*) он также участвует в реакциях декарбоксилирования ряда α -кетокислот (Werther et al., 2008). Инактивация этого гена может приводить к потере способности к биосинтезу ИУК до 90% от общего количества ауксинов. Метаболиты этого пути, ИПВК и ИУАлд, не являются стабильными соединениями и могут конвертироваться в индолил-3-молочную кислоту (индолил-3-лактат, ИМК) и триптофол (ТОЛ). У цианобактерии *Nostoc punctiforme* также обнаружен ген, кодирующий индолил-пируватдекарбоксилазу (Liaimer, 2002).

2. Биосинтез ИУК через **индолил-3-ацетамид (ИАМ)** проходит в две стадии: в первой молекула триптофана превращается в реакции окислительного декарбоксилирования под действием триптофан-монооксигеназы (фермент *IaaM* кодируется геном *iaaM*) в ИАМ. Далее ИАМ-гидролаза (фермент *IaaH* кодируется геном *iaaH*) осуществляет гидролиз ИАМ до ИУК и аммония. Функционирование этого пути отмечено у ряда фитопатогенных бактерий *A. tumefaciens* и *Ps. savastanoi*, *P. agglomerans* и *E. herbicola* (Manulis et al., 1998; Sphaeren et al., 2007) и грибов, например, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* (Chung et al., 2003; Maor et al., 2004). Долгое время считалось, что биосинтез по ИАМ пути вообще является типичным для фитопатогенных микроорганизмов, однако, оба ключевых гена этого пути были обнаружены и охарактеризованы как у вышеперечисленных фитопатогенов, так, например, и у симбиотических азотфиксаторов – представителей родов *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* (Sphaeren et al., 2011).

Известно, что у *Agrobacterium tumefaciens* гены ИАМ пути располагаются на рТi (tumor inducing) плазмиде, в непосредственной близости от *ipt* генов, кодирующих диметилаллилпирофосфат:АМФ-диметилаллилтрансферазу, которая ответственна за биосинтез другого типа фитогормонов – цитокининов (Costacurta and Vanderleyden, 1995). У фитопатогена *P. savastanoi* pv. *savastanoi* оба гена локализуются на плазмиде pIAA1, причём они объединены в своеобразный миникластер (*iaa* оперон); утрата плазмиды ведёт к полной потере способности к биосинтезу ИУК культурой, а штаммы, утратившие плазмиду, не способны более формировать галлы (Comai et al., 1982; Sphaeren et al., 2011). Другая галлообразующая бактерия, *P. agglomerans* pv. *gypsophylae*, имеет оба основных пути биосинтеза ауксинов, однако, гены, ответственные за биосинтез ИУК по ИПВК пути, активируются в начальной стадии взаимодействия этой бактерии с растением-хозяином,

тогда как гены, ответственные за биосинтез по ИАМ пути активируются на поздних стадиях, связанных с формированием галлов, из-за чего и было сделано заключение, что ИАМ путь скорее связан с фитопатогенезом (Manulis et al., 1998). В то же время, на примере *Ustilago maydis*, также способного вызывать галловые обрастания на инфицированных растениях кукурузы, делеционные мутанты которого были лишены возможности синтезировать ИУК как по ИПвК пути, так и по пути с образованием индолил-ацетальдегида в качестве интермедиата, было показано, что, несмотря на то что уровень биосинтеза ИУК сократился в 5-10 раз, микромицет сохранял способность инфицировать растение, а изменение способности синтезировать ИУК никак не влияло на формирование галловых опухолей (Reineke et al., 2008). Авторы делают вывод, что способность к синтезу ИУК у этого гриба непосредственно не связана с фитопатогенезом. Однако на примере другого фитопатогена, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, синтезирующего значительное количество ИУК по ИАМ пути, в том числе за счёт активности гена *IaaM*, кодирующего триптофан-монооксигеназу, было установлено, что именно экспрессия этого гена в инфицированных тканях растения способствует образованию типичного фенотипа, характерного для заболевших растений, и более того, усиливает восприимчивость таких растений к другому фитопатогену, – бактерии *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Yin et al., 2014).

У симбиотических бактерий, *Rhizobium fredii* и *Bradyrhizobium japonicum*, также предполагали наличие пути биосинтеза ИУК через индолил-3-ацетамид, однако, активность соответствующих этому пути ферментов и экспрессия соответствующих генов долгое время не подтверждалось. Затем ген *bam*, идентичный гену ИАМ-гидролазы *iaaH*, был изолирован из *B. japonicum* (Sekine et al., 1989), а присутствие метаболитов, характерных для ИАМ пути было подтверждено для штамма *Rhizobium* sp. NGR234 (Theunis et al., 2004). Метаболиты ИАМ-пути были также обнаружены у некоторых стрептомицетов (Manulis, 1994; Рудик и др., 2000), сапрофитных псевдомонад *Pseudomonas putida* и *P. fluorescens* (Мордухова и др., 1991) и метиловых бактерий *Methylobacterium mesophilicum* и *Aminobacter aminovorans* (Троценко и др., 2001). Основным путём биосинтеза ИУК у фитопатогенного гриба *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*, образующего значительные количества ИУК в культуре является именно ИАМ-путь (Robinson et al., 1998), что также было подтверждено активностью соответствующих ферментов (Maor et al., 2004). У ряда исследованных цианобактерий не было обнаружено генов, кодирующих ферменты ИАМ пути (Liaimer, 2002).

3. Конверсия триптофана в индолил-3-уксусный альдегид может проходить альтернативным путём через **триптамин**, который декарбоксилируется с помощью

триптофандекарбоксилазы и затем превращается в ИУАльд под воздействием аминоксидазы, как это было показано на примере *Bacillus cereus*, некоторых псевдомонад и азоспирилл (Spaepen and Vanderleyden, 2011; Spaepen, 2015). Наличие этого пути предполагалось у неидентифицированного гриба-микоризообразователя орхидеи *Ophrys lutea* Cav. (Barroso et al., 1986) и цианобактерий *Chlorogloea fritschii* (Ahmad and Winter, 1969). Однако к настоящему моменту, несмотря на то, что это один из основных путей биосинтеза у растений, для микроорганизмов нет чётких доказательств его активности, так как гены и участвующие в нём ферменты до сих пор не охарактеризованы.

4. Биосинтез ИУК, проходящий при превращении триптофана в **индолил-3-уксусный нитрил** (ИУН), выявлен среди бактерий у *Alcaligenes faecalis* (Kobayashi et al., 1993) и, возможно, у цианобактерии *Synechocystis* sp. (Liaimer, 2002). У нескольких представителей *Agrobacterium* и *Rhizobium* нитрилдегидратазная и амидазная активности были обнаружены, предполагая конверсию ИУН в ИУК через индолил-3-ацетамид (Kobayashi et al., 1995).

5. У *Pseudomonas fluorescens* CHA0 была обнаружена еще одна возможность образования ИУК – через активность **оксидазы боковой цепи триптофана**, которая конвертирует триптофан сразу же в ИУАльд с его последующим окислением дегдрогеназой (Oberhansli et al., 1991). Этот же путь и активность его ключевого фермента были выявлены у некоторых метиловых бактерий (Фёдоров и др., 2011).

6. Путь, **независимый от триптофана**, встречается у растений, ответвляясь от индола или индолил-3-глицерофосфата, но ферменты этого пути или гены, ответственные за него, пока не обнаружены (Woodward and Bartel 2005). Возможность функционирования этого пути у *A. brasilense* подтверждается экспериментами с меченым триптофаном, который конвертировался в искомые продукты реакции без образования промежуточных интермедиатов (Prinsen et al. 1993), хотя строгого генетического или биохимического подтверждения этому также пока не найдено.

Биосинтез ауксинов у микроорганизмов зависит от ряда факторов, в том числе от состава среды, температуры, аэрации (Цавкелова и др., 2006а) и в подавляющем большинстве случаев является триптофан-зависимым: в определённых пределах содержание ИУК увеличивается по мере повышения концентрации экзогенного триптофана, причём это показано для образования ауксинов как у бактерий, так и у грибов. Без экзогенного триптофана подавляющее большинство микроорганизмов характеризуются отсутствием или невысоким уровнем образования ауксинов, тогда как

при добавлении этой аминокислоты выход ИУК может составить 80-100 и даже выше мкг/мл. Поэтому способность эффективной конверсии триптофана, активно выделяющегося с корневыми экссудатами растений (Кравченко, 2000), превращая его в основной стимулятор роста растений, рассматривается как одна из ведущих характеристик PGPR штаммов. У многих микроорганизмов функциональны несколько путей биосинтеза ИУК, что существенно расширяет возможности ассоциативных бактерий и грибов при установлении стабильных отношений с растениями и увеличивает их адаптационные и конкурентные преимущества внутри микробно-растительных сообществ. Образование ауксинов в неблагоприятных условиях для роста микроорганизмов может играть значительную роль, повышая вероятность формирования ассоциации между растением-хозяином и его ассоциативными партнёрами (Олюнина и Шабает, 1996). Максимальные количества ИУК, как и многих вторичных метаболитов микроорганизмов, необходимых для коммуникации, как между участниками микробных популяций, так и между различными организмами внутри комплексных консорциумов, вырабатываются бактериями в стационарной фазе роста.

Многие симбиотические ризобии, формирующие симбиозы с бобовыми растениями, изменяют содержание ИУК в растительных тканях, особенно непосредственно в клубеньках. Так, клубеньки, инфицированные делеционным мутантом *Rhizobium* с низким уровнем образуемого ИУК, содержали значительно меньше ауксинов по сравнению с аналогичными клубеньками, инфицированными диким типом ризобиума с высокой активностью в отношении биосинтеза ауксинов (Theunis, 2004). Большее содержание ИУК оказалось в клубеньках и корнях *Medicago truncatula*, инокулированных генномодифицированным штаммом (overexpression mutant) *Sinorhizobium meliloti* с высокой экспрессией генов ИАМ-пути биосинтеза ИУК (Bianco and Defez, 2009). Кроме того, этот штамм ризобактерии демонстрировал повышенную невосприимчивость к стрессовым факторам, а растение, инфицированное им, также оказалось устойчивым к солевому стрессу (Bianco and Defez, 2009).

На примере микоризообразующих грибов было показано, что трансгенные штаммы эктомикоризного *Hebeloma cylindrosporum* со сверхэкспрессией ИУК проявляли повышенную способность проникать в ткани корней растения-хозяина – *Pinus pinaster* по сравнению с исходным диким типом (Chanclud and Morel, 2016). В большинстве случаев, также как и в случае с симбиотическими ризобиями, растения, вступающие во взаимодействие с микоризообразующими грибами, содержат более высокое количество ауксинов (Barker and Tagu, 2000; Meixner et al., 2005).

Известно, что ионы аммония и глутамин ингибируют биосинтез ИУК (Мордухова и др., 1991; Муронец и др., 1997; Datta, Basu, 1998; Иванова и др., 2001), что связано с этапом дезаминирования триптофана (рис. 9).

Некоторые микромицеты (*Pisolithus tinctorius*, *Paxillus involutus*) и бактерии (*P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *Agrobacterium* sp.) способны образовывать связанные (неактивные) формы ИУК (Costacurta and Venderleyden, 1995; Niemi et al., 2002), которые известны, в основном, для растений. Кроме того, в качестве запасного соединения у бактерий может рассматриваться соединение ИМК (индолил-3-молочная кислота), в которую зачастую обратимо конвертируется ИПвК (Sraepen et al., 2011).

В растениях ферменты ИУК-оксидаза или полифенолоксидаза инактивируют ИУК (Чуб, 2000). Также ИУК-оксидазная активность выявлена у некоторых изоформ пероксидазы (Лисицына и Рахимбаев, 1980). Среди бактерий, в основном заселяющих ризосферу, обнаруживается не только способность к биосинтезу, но и к разложению и деградации молекулы ИУК (Leveau and Gerards, 2008). Такая активность встречается у представителей *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Xanthomonas* и *Agrobacterium* (Libbert and Risch, 1969; Barea et al., 1976; Leveau and Gerards, 2008). Позже был охарактеризован локус *iac*, вовлечённый в деградацию ИУК у псевдомонады *P. putida* (Leveau and Lindow, 2005; Leveau and Gerards, 2008). На примере *Bradyrhizobium japonicum* показано, что ИУК ферментативно окисляется с образованием антранилата (Egebo et al., 1991).

1.4.1.1. Регуляция биосинтеза ИУК у микроорганизмов. ИУК – сигнальная молекула

Биосинтез ауксинов считается "дорогостоящим" для клетки процессом, прежде всего за счёт синтеза молекулы триптофана (Sraepen, 2015). Потому экзогенный триптофан охотно и эффективно конвертируется микроорганизмами в ИУК. У бактерий гены, отвечающие за образование ауксинов, находятся как в плазидах, так и в хромосоме (Sraepen, 2015). У фитопатогенных бактерий гиперсинтез ауксинов связан с Ti-плазидами, а у сапротрофных микроорганизмов образование ИУК чаще всего определяется генами хромосомы. Подобная локализация генов может значительно изменять концентрацию образуемых ауксинов, так как плазмиды могут находиться в клетке в нескольких копиях (Sraepen and Vanderleyden, 2011). Это было подтверждено на примере сравнения уровня образуемой ИУК двумя фитопатогенными псевдомонадами: *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, у которой гены биосинтеза ИУК расположены на плазмиде

pIAA1 и обладающей высоким уровнем биосинтеза ИУК, и *P. syringae* pv. *syringae* с хромосомным расположением генов биосинтеза ауксинов со значительно более низким уровнем ИУК. Однако образование ИУК увеличивается в несколько раз при внедрении в клетки *P. syringae* pv. *syringae*, плазмиды которой несёт оперон биосинтеза ИУК (Patten and Glick 1996; Spaepen and Vanderleyden, 2011). На примере агробактерий также показано, что гены биосинтеза ИУК находятся под регуляцией сильных промоторов, специфичных к растениям, и поскольку этот участок ДНК передаётся при трансформации, то пул триптофана, имеющегося в растении начинает использоваться для биосинтеза новых молекул ИУК, которые в совокупности с высокими концентрациями цитокининов провоцируют развитие галловых разрастаний (Jameson, 2000).

В настоящее время накоплено достаточно данных, позволяющих определить ИУК как сигнальную молекулу, поскольку ауксины оказывают воздействие не только на физиологические реакции, но и на экспрессию ряда генов. Подробные исследования регуляции генной экспрессии и активности ферментов путей биосинтеза ИУК проведены, однако, лишь на небольшом числе микроорганизмов. На примере *Azospirillum brasilense* Sp245 показано, что экспрессия ключевого гена ИПВК пути биосинтеза ИУК, *ipdC*, регулируется за счёт положительной обратной связи, то есть конечным продуктом – ИУК, а также другими индолами, например, нафталеновой и фенилуксусной кислотами (Vande Broek et al., 2005; Spaepen and Vanderleyden, 2011). Анализ *in silico* выявил в промоторной области этого гена наличие нескольких предполагаемых *cis*-регуляторных элементов, как например, короткие последовательности ауксинового "элемента отклика" (auxin response element) – AuxRE, таких же, как обнаружены и в растительных генах, а также RpoN-связывающий сайт (Vande Broek et al., 2005). Известно, что последовательность rpoN ("RNA polymerase, Nitrogen-limitation", РНК-полимераза, лимитирование по азоту) была изначально идентифицирована как регулятор генов, участвующих в азотном метаболизме, особенно в условиях нехватки азота в среде (Nixon et al., 1986). Так, под регуляцией сигма-фактора (σ^{54}), который кодируется этой последовательностью, находятся гены *nif* и *fix*, необходимые для ассоциативных и эндофитных азотфиксаторов, таких как *Azospirillum brasilense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* (Pedrosa and Elmerich, 2007). В настоящее время показано, что сигма-факторы регулируют различные процессы в микробной клетке, в том числе, формирование жгутиков у *Caulobacter crescentus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, некоторых видов *Vibrio* и *Pseudomonas* (Tsang and Hoover, 2014), а также образование биоплёнок у патогенной бактерии *Burkholderia cenocepacia* (Fazli et al., 2017).

У многих γ -Proteobacteria биосинтез ИУК и экспрессия генов *ipdC* регулируются альтернативным сигма-фактором, RpoS, – основным медиатором реакций бактериальных клеток на различные стрессовые условия и голодание, как это было показано для ряда видов и штаммов *Pseudomonas* и *Pantoea* (Spaen and Vanderleyden, 2011; Spaepen, 2015). В других бактериях также были обнаружены факторы, оказывающие регуляторное действие на экспрессию генов: у *E. cloacae* UW5 показана прямая индукция экспрессии гена индолил-пируват декарбоксилазы за счёт активности регуляторного белка TylR, участвующего в транспорте и метаболизме ароматических аминокислот, в том числе триптофана и тирозина (Ryu and Patten, 2008). А у фитопатогенов *Ralstonia solanacearum*, *P. agglomerans* pv *gypsophilae* и *P. savastanoi* (Valls et al., 2006), показана связь между биосинтезом ИУК и активностью секреторной системой третьего типа (Type III secretion system, TTSS), которая функционирует преимущественно у патогенных для растений и животных грамотрицательных бактерий (Huesk, 1998), но также у симбиотических представителей рода *Rhizobium* и флюоресцентных псевдомонад, использующихся в качестве биоагентов против фитопатогенов (Rezzonico et al., 2004). Эти белковые иглоподобные структуры способствуют распознаванию эукариотических организмов-хозяев и их дальнейшему инфицированию.

Именно тот факт, что ИУК влияет на экспрессию генов бактерий, позволяет причислить её к сигнальным молекулам. Например, у фитопатогенной агробактерии *A. tumefaciens* показано, что ИУК подавляет экспрессию гена *vir* из-за конкуренции с сигналом, поступающим от растения-хозяина и представляющего собой соединение фенольной природы. Подобный механизм контроля означает для бактериальной клетки, что процесс трансформации (перенос и экспрессия T-DNA в растительной клетке) оказался успешным (Liu and Nester, 2006; Spaepen and Vanderleyden, 2011).

Известно, что ауксины оказывают стимулирующее воздействие на рост и развитие не только растений, но и ряда микроорганизмов, например, бактерий *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, цианобактерий *Nostoc* и *Anabaena*, грибов *Saccharomyces*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Pleurotus* и водорослей *Caloglossa*, *Bostrychia*, *Rhizoclonium*, *Pithophora*, *Cosmarium* (Berliner, 1981; Nowak et al., 1988; Мишке, 1988; Liaimer, 2002; Prusty et al., 2004, Цавкелова и др., 2006a; Tsavkelova 2007a). Например, ауксины увеличивают нитрогеназную активность у культур цианобактерий *Nostoc punctiforme* (Liaimer, 2002) и *Anabaena doliolum* (Kapoor and Sharma, 1981). В то же время в концентрации 0,001-1,0 мкг/мл ИУК, наоборот, ингибирует образование нитрогеназы у гетеротрофного азотфиксатора, *Azospirillum lipoferum*, а на другой вид этого рода (*A. brasilense*) никакого действия не оказывает (Silveira-Schrank and Drozdowicz, 1983). На

примере клеток *E. coli* было показано, что ИУК оказывает стимулирующее (upregulated) действие на ряд генов глиоксилатного шунта, цикла трикарбоновых кислот и биосинтеза аминокислот (Bianco et al., 2006b). Кроме того ИУК способствует большей устойчивости клеток к воздействию различных стрессовых агентов, возможно, за счёт индукции формирования трегалозы, липополисахаридов и экзополисахаридов, входящих в состав внеклеточного матрикса и способствующих формированию биоплёнок (Bianco et al., 2006a).

ИУК стимулирует спорообразование у микромицета *Neurospora crassa* (Nakamura et al., 1982). На примере фитопатогена *Fusarium delphinoides* показано, что эффект ИУК на его прорастание является зависимым от используемых концентраций: в низких количествах ИУК стимулировала рост гриба, тогда как высокие концентрации, наоборот, подавляли его (Kulkarni et al., 2013). ИУК способствует адгезии, увеличению размеров клеток и филаментации дрожжей *S. cerevisiae* (Yanagishima et al., 1968; Prusty et al., 2004) и *Candida albicans* (Rao et al., 2010), а также ускоряет рост мицелия у микромицетов *Fusarium oxysporum* и *Aspergillus* sp. (Мишке, 1988). ИУК способствует развитию устойчивости к различным абиотическим стрессовым факторам (температура, соленость) у водорослей (Nowak et al., 1988), индуцирует формирование полярности у зигот бурых водорослей *Fucus vesiculosus* L. (Полевой и др., 2003) и *F. distichus* L. (Basu et al., 2002).

В пекарских дрожжах был обнаружен сайт активации транскрипции YAP-1. Причём, делеционный *yap1-1* мутант оказался гиперчувствительным к воздействию экзогенной ИУК, – это предполагает, что именно Yap-1 является ключевым фактором транскрипции (медиатором) в ответных реакциях клетки на воздействие ауксина (Prusty et al., 2004). Более того, АААР пермеазы – переносчики аминокислот/ауксин:(симпорт протона) (amino acid/auxin:proton symport permease, АААР), имеющие гомологию с *AUX1* (предполагаемый переносчик ИУК в растениях), в делеционном мутанте *yap1-1* также имели повышенную (увеличенную) экспрессию (upregulated). А делеции по этим переносчикам вызывали значительное уменьшение поглощения ИУК клетками *Saccharomyces cerevisiae* (Prusty et al., 2004).

1.4.2. Гиббереллины

Другим обширным классом фитогормонов, оказывающих своё влияние на жизненный цикл растения, являются гиббереллины (гибберелловые кислоты, ГК) – дитерпены, состоящие из 19-20 изопреноидных остатков, обычно образующие тетра- или пентациклическую структуру (рис. 10). Действие гиббереллинов направлено, прежде

всего, на деление и элонгацию клеток, входящих в состав интеркалярных меристем, но также они управляют, например, процессами прорастания семян и старения, цветения и формирования плодов, созревания пыльцы и эмбрионального развития (Tudzynski and Sharon, 2002; Sponsel and Hedden, 2004).

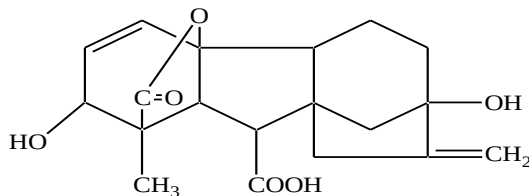


Рисунок 10. Гибберелловая кислота (ГК₃, GA₃).

Помимо регуляции морфогенеза в растениях гиббереллины контролируют ориентацию микротрубочек в процессе взаимодействия локализованных в ядре клетки так называемых DELLA-белков (участвующих в рецепторном и сигнальном взаимодействии с ГК) с комплексом префолдинов – двудоменными кошаперонами, необходимыми для сборки тубулина (Zhang and Zhang, 2016). В присутствии ГК DELLA- белки деградируют, а комплекс префолдинов остаётся в цитоплазме, продуцируя активные тубулиновые субъединицы (Locascio et al., 2013). Эластичность клеточных стенок растений, которая значительно увеличивается под воздействием биологически-активных ГК, связана с повышением активности фермента ксилоглюкан-эндотрансгликозидазы, находящегося в положительной регуляции от ГК (Jan et al., 2004). Гиббереллины также стимулируют образование α -амилаз, таким образом, влияя на активацию синтеза мембран, в частности эндоплазматического ретикулума, стимулируя образование микротелец, содержащих гидролитические ферменты. Инактивация гиббереллинов в растении происходит, например, при их гидроксировании во втором положении, либо их конъюгации с углеводами, карбоновыми кислотами или спиртами. ГК и их предшественники и метаболиты могут транспортироваться пассивно с ксилемным и флоэмным токами.

К настоящему времени известно около 136 соединений гиббереллиновой природы, обозначаемых от ГК₁ (гибберелловая кислота, gibberellic acid, GA) до ГК₁₃₆. Первое описание гиббереллина, выделенного как основное действующее вещество фитопатогенного гриба *Fusarium fujikuroi* (телеоморфа *Gibberella fujikuroi*) – возбудителя фузариоза риса, провоцирующего чрезмерное вытягивание его побегов, было сделано в 1926 году Е. Kurosawa (Tudzynski and Sharon, 2002; Bömke and Tudzynski, 2009). В культуре этот микромицет способен образовывать более 1000 мг/л ГК. Несмотря на огромное разнообразие соединений, образуемых растениями и микроорганизмами, и

имеющими общую сходную структуру гиббереллинов, считается, что только четыре (ГК₁, ГК₃, ГК₄ и ГК₇) из них активны как фитогормоны растений (Sponsel and Hedden, 2004). К 70-м годам прошлого века были проведены работы с использованием ¹⁴C-меченых уксусной и мавалоновой кислот, позволившие установить интермедиаты образования гиббереллинов в растениях (Bearder, 1983), с последующим в 1990-х гг. изучением генов, ответственных за биосинтез ГК в растениях (Hedden and Phillips, 2000) и грибах – на примере *F. fujikuroi* (Tudzynski and Höltér, 1998) и *Phaeosphaeria* sp. (Kawaide et al., 1997).

В растениях гиббереллины содержатся преимущественно в несформированных полностью семенах и плодах, в листовых примордиях в молодых растущих листьях и в верхушечных меристемах корня. Биосинтез большинства гиббереллинов осуществляется из ацетата через мевалоновую кислоту, изопентенилпирофосфат, геранилпирофосфат, геранилгераниолпирофосфат (ГГПФ) и *энт*-каурен с последующим окислением до гидроксикауреновой кислоты и образованием ГК₁₂-альдегида, который является общим предшественником всех гиббереллинов, образующихся как в растениях, так и в грибах (Hedden and Phillips, 2000). У растений *энт*-каурен образуется в пластидах и для этого требуется две дитерпен-циклазы: *энт*-копалилпирофосфат-синтаза [КПС, CPP synthase (CPS)] и, действующая затем *энт*-каурен-синтаза [КС, *ent*-kaurene synthase (KS)], под действием которой образуется тетрациклическое соединение *энт*-каурен. В растениях циклизация геранил-гераниол-пирофосфата (ГГПФ) с образованием *энт*-каурена и *энт*-копалил-дифосфата в качестве промежуточных продуктов происходит в пластидах (рис. 11). Далее, уже в эндоплазматическом ретикулуме, происходят реакции окисления *энт*-каурена через *энт*-кауреналь и *энт*-кауреновую кислоту в *энт*-7 α -гидроксикауреновую кислоту, которая затем в цитоплазме превращается в ГК₁₂-альдегид (Hedden and Phillips, 2000).

Примечательным отличием биосинтеза гиббереллинов у грибов, в отличие от растений, является то, что у микромицетов действует один бифункциональный фермент (CPS/KS), объединяющий обе функции и катализирующий оба шага, в результате чего происходит циклизация ГГПФ (GGPP) в *энт*-копалилпирофосфат (CPP) и затем в *энт*-каурен (Tudzynski, 2005). Лучше всего изучен биосинтез гибберелловых кислот на примере *F. fujikuroi*, образование которых начинается также с ацетил-КоА через мевалоновую кислоту с формированием изопентенилпирофосфата (ИПП, IPP). Образование геранилгераниолдифосфата (ГГДФ, GGDP) катализируется в отличие от растений двумя различными ГГДФ-синтазами – GGS1 и GGS2, причём считается, что ГГДФ, необходимый для последующего биосинтеза ГК, синтезируется под воздействием синтазы

GGS2 (Tudzynski and Hölder, 1998; Bömke and Tudzynski, 2009). Стадии, ведущие к образованию ГК₁₂-альдегида, идентичны таковым, происходящим в растениях.

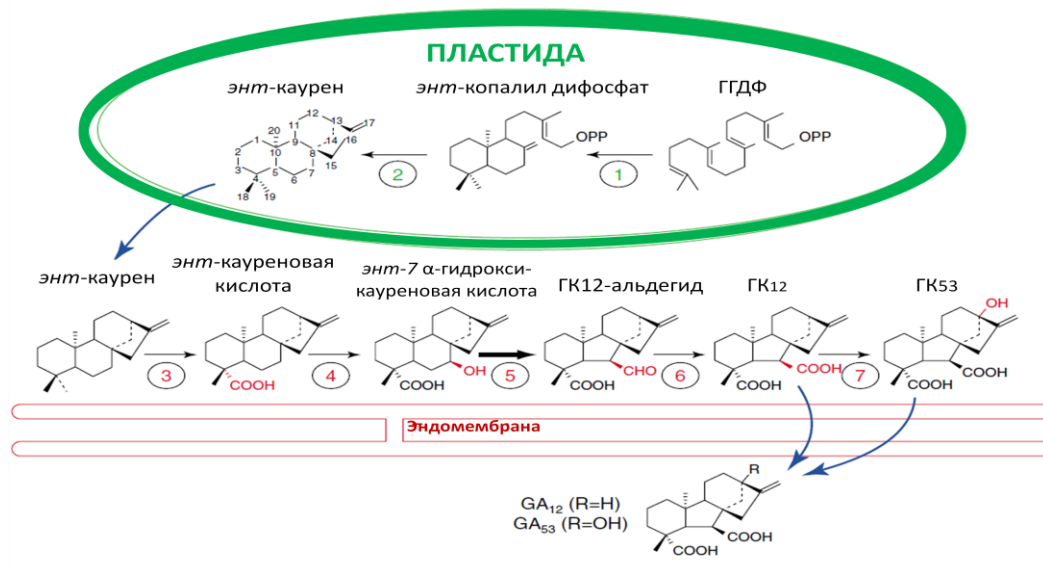


Рисунок 11. Первые этапы образования гиббереллинов в растениях (с изменениями, источник: Hedden and Phillips, 2000).

После образования ГК₁₂-альдегида, пути биосинтеза ГК у растений и грибов также отличаются. Дальнейшая модификация радикалов и замыкание дополнительных циклов приводят к появлению разнообразных по строению и активности гиббереллинов. У растений имеет место серия окислительных реакций, где основную роль играют 2-оксоглутарат-зависимые диоксигеназы (2ODD). У большинства растений ГК₁₂-альдегид окисляется с образованием ГК₁₂, которая затем либо окисляется с образованием C₁₉ гибберелловой кислоты ГК₉, либо гидроксيليруется в 13-ом положении с образованием ГК₅₃, которая, в свою очередь, окисляется с образованием C₂₀ гибберелловой кислоты ГК₂₀ (Hedden and Phillips, 2000; Bömke and Tudzynski, 2009). Физиологически-активные гибберелловые кислоты ГК₄ и ГК₁ образуются из ГК₉ и ГК₂₀, соответственно, под воздействием ГК-3β-гидроксилазы. У некоторых видов ГК₉ и ГК₂₀ также превращаются в ГК₇ и ГК₃, соответственно, через 2,3-дидегидро-ГК₉ и ГК₅ интермедиаты (Hedden and Phillips, 2000). Чаще всего реакции, катализируемые CYP, происходят в эндоплазматическом ретикулуме, так как большая часть растительных ферментов – мембран-связанные, тогда как окисление с помощью 2ODD проходит в цитозоле (Sponsel and Hedden, 2010).

В грибах ГК₁₂-альдегид подвергается 3β-гидрокселированию в ГК₁₄-альдегид, который затем окисляется с образованием C₇ ГК₁₂ (Urrutia et al., 2001); последующая конверсия этого соединения в ГК₄ происходит аналогично образованию ГК₉ и ГК₂₀ у

высших растений путём окисления соединения ГК₄ под воздействием фермента десатуразы (DES), который конвертирует её в ГК₇, которая затем окисляется (P450-3) в ГК₃, – основной продукт у *F. fujikuroi*. ГК₄ также может превращаться в другое активное соединение – ГК₁ в случае гидроксилирования молекулы по 13-ому положению, однако, этот продукт образуется в незначительном количестве (MacMillan, 1997; Tudzynski, 2005; Bömke and Tudzynski, 2009). Таким образом, на этапе введения гидроксильных групп у *F. fujikuroi* ГК₁₂-альдегид, гидроксилируясь, превращается в ГК₁₄-альдегид, тогда как в растениях он конвертируется в ГК₁₂, которая затем гидроксилируется с образованием ГК₅₃ (Tudzynski, 2005).

У растений ГК присутствуют в тканях в невысоких количествах – 0.1–100.0 нг/г свежей массы, при этом гены, ответственные за биосинтез этих фитогормонов в растениях, на примере анализа генома *Arabidopsis* расположены на всех пяти хромосомах. В отличие от растений, у *F. fujikuroi* гены, ответственные за биосинтез ГК, объединены в один кластер (Tudzynski and Höltér, 1998), содержащий кроме специфической геранилгераниолдифосфат-синтазы (*ggs2*) и *энт*-копалилдифосфат/*энт*-кауренсинтазы (*cps/ks*) четыре монооксигеназы цитохрома P450 (от P450-1 до P450-4) и десатуразу ГК4 (*des*) (Rojas et al., 2001; Tudzynski et al., 2001, 2002, 2003; Tudzynski, 2005). У грибов единственный ген *cps/ks* ответственен за синтез фермента бифункциональной *cps/ks* синтазы, осуществляющей реакции превращение ГГДФ в *энт*-каурен. Известно, что как и *ggs2* и *cps/ks*, P450-4 и P450-1 формируют единую транскрипционную единицу (рис. 12), имея единую двунаправленную промотерную область (bidirectional promoter) (Tudzynski, 2005).



Рисунок 12. Строение кластера генов, ответственных за биосинтез гиббереллинов у *Fusarium fujikuroi* (источник: Tudzynski, 2005).

У грибов практически все окислительные реакции при биосинтезе ГК осуществляются при помощи цитохром Р-450-монооксигеназ. В *F. fujikuroi* P450-4 и P450-1 играют ту же роль, что и *энт*-каурен оксидазы (КО; CYP701As) и оксидазы *энт*-кауреновой кислоты (КАО; CYP88As) в растениях, соответственно (Rojas et al., 2001; Tudzynski et al., 2001). В то время, как у грибов ранние этапы биосинтеза ГК связаны с оксидазами P450, где, например, P450-1 в дополнение к оксидазной активности в отношении *энт*-кауреновой кислоты обладает 3β-гидроксилазной активностью и катализирует четыре окислительные стадии до образования ГК₁₄, у растений

заключительная 3 β -гидроксилазная реакция осуществляется 2-оксоглутарат-зависимыми диоксигеназами (2ODD). Единственный окислительный фермент, отличный от P450 у грибов – это ГК₄-десатураза. Более подробно функции и отличия этих ферментов от растительных аналогов рассмотрены в статьях: Rojas et al., 2001; Tudzynski et al., 2001, 2002, 2003; Bömke and Tudzynski, 2009.

В растениях уровень ГК поддерживается за счёт регуляции экспрессии генов биосинтеза ГК, в том числе за счёт сигналов, получаемых из внешней среды (например, длительности светового дня, температуры и стрессовых условий), активности других фитогормонов, таких как ауксины и абсцизовая кислота, положительной обратной связи регуляции конечными продуктами и разложения и деградации соединений ГК (Hedden and Phillips, 2000; Yamaguchi, 2008). Механизмы транскрипционной регуляции биосинтеза ГК за счёт активатора транскрипции (RSG), действующего по типу "лейциновой молнии", подробно рассмотрен в статьях ранее (Fukazawa et al., 2000; Ishida et al., 2004). В растениях деактивация ГК, таких как ГК₄ или ГК₁, происходит под действием гиббереллин-2-оксидазы, когда в результате гидроксилирования образуются неактивные их формы: ГК₃₄ и ГК₈ (Thomas et al., 1999).

Возможен также механизм эпоксилирования двойной связи в положениях 16 и 17 с помощью цитохрома-P450 монооксигеназы (Zhu et al., 2006; Bömke and Tudzynski, 2009). Среди ключевых компонентов сигнальной системы регуляции биосинтеза ГК у растений идентифицированы также рецептор ГК GID1 (Hirano et al., 2008) и белки DELLA (Jiang and Fu, 2007), входящие в состав транскрипционных факторов семейства GRAS (объединяющее более 30 белков), и которые также взаимодействуют, например, с абсцизовой кислотой, таким образом, осуществляя комплексную регуляцию физиологических процессов в растении (Weiss and Ori, 2007).

1.4.2.1. Распространение способности к биосинтезу гиббереллинов среди микроорганизмов

Исследования на примере микромицетов, принадлежащих к роду *Fusarium*, показали, что биосинтез ГК подвергается азотной метаболитной репрессии и ингибируется высокими концентрациями азотных соединений, особенно таких, как глутамин и аммонийный азот (Brückner and Blechschmidt 1991; Muñoz and Agosin 1993). Биологический смысл этого явления объясняется отсутствием необходимости использования дополнительных энергозатратных путей использования альтернативных

источников азота и экспрессии дополнительных генов при наличии более легкодоступных источников азота (Bömke and Tudzynski, 2009). В условиях лимитирования по азоту основным фактором, активирующим транскрипцию генов, является GATA-связывающий белок, AreA: инактивация гена *areA-GF* у *F. fujikuroi* приводит к значительному снижению количеств образуемых ГК, и наоборот, комплементация делеционных мутантов по этому гену полностью восстанавливает их способность образовывать ГК (Tudzynski et al., 1999). AreA регулирует активность шести генов "гипбереллинового" кластера за исключением P450-3 (Tudzynski et al., 2003). Среди других, хотя и второстепенных, факторов, регулирующих активность генов кластера ГК, экспрессия которых подавляется за счёт наличия высоких концентраций азота в среде, можно выделить регулятор Nmr, который ингибирует активность AreA за счёт высокоспецифичных белок-белковых взаимодействий между ними (Mihlan et al., 2003; Schönig et al., 2008), а также MeaB, который действует как дополнительный ингибитор генов с уже подавленной экспрессией за счёт активности основного фактора AreA. В отличие от дрожжей, *Saccharomyces cerevisiae*, у которых основную роль в регуляции азотного метаболизма играет рапамицин протеин-киназа (target of rapamycin, TOR), её активность крайне незначительна в отношении влияния на экспрессию генов ГК кластера в условиях азотной метаболитной репрессии у мицелиального гриба *F. fujikuroi* (Teichert et al., 2006). Было обнаружено, что аммоний-пермеаза, MerB, помимо транспортных функций, а также глутамин-синтаза (GS) также оказывают регулирующее действие на экспрессию генов ГК кластера (Teichert et al., 2008; Bömke and Tudzynski, 2009).

Как отдельная таксономическая группа представители рода *Fusarium* были выделены в 1809 г, однако, до настоящего времени их систематика грибов была затруднена за счёт высокой вариабельности по морфологии, или когда сходные по морфологическим характеристикам виды имеют различия на генетическом и метаболических уровнях. В настоящее время применяют три основные концепции при идентификации видов *Fusarium* и сравнительном анализе их родства: i) морфологическую, учитывающую морфофизиологические особенности строения микромицетов, ii) филогенетическую, основанную на анализе последовательности нуклеотидов ДНК, и несвязанных локусов малой субъединицы митохондриальной рибосомы (mtSSU): рДНК, β-тубулина, кальмодулина, трансляционного элангационного фактора EF-1α и генов канонического гистона H3, а также iii) биологическую, которая основывается на возможности (или невозможности) штаммов скрещиваться друг с другом и давать фертильное потомство (mating populations, MP; Bömke and Tudzynski, 2009; Стахеев и др., 2016). Так, в составе монофилетического комплекса видов *Gibberella fujikuroi* (бесполая

стадия *F. fujikuroi*) выделено по крайней мере 11 популяций (от MP-A до MP-I), а также около 30 нескрещивающихся видов (Leslie, 1995; O'Donnell et al., 1998; Zeller et al., 2003). Представители этих MP зачастую предпочитают определённые растения и могут отличаться между собой по образованию вторичных метаболитов, например, фумонизинов, фузариновой кислоты, боверицина, фузапролиферина, монилиформина, фузаринов, а также гибберелловых кислот (Jestoi, 2008). При изучении различных видов рода *Fusarium* долгое время считалось, что способность к биосинтезу ГК характерна исключительно для представителей комплекса видов *Gibberella fujikuroi* (GFSC). Большинство видов, входящих в этот комплекс, имеют полный кластер генов биосинтеза ГК или лишь часть кластера; штаммы *F. verticillioides* (MP-A), *F. anthophilum* и *F. nisikadoi* имеют только два кластерных гена, *des* и *P450-4*, тогда как штаммы *F. circinatum* (MP-H) и *F. napiforme* имеют каждый по одному гену – *des* и *P450-3*, соответственно. Представители *F. konzum* (MP-I) имеют все 7 генов (или у некоторых штаммов отсутствует *P450-3*) кластера (Bömke and Tudzynski, 2009). Однако кроме *F. fujikuroi* и некоторых штаммов *F. konzum*, другие указанные виды не образуют ГК. В тех же случаях, когда штаммы имеют полный состав кластера ГК и всё равно не синтезируют гиббериллины, были обнаружены мутации в генах *ggs2* и *cps/ks*, вероятно, блокирующие биосинтез ГК (Malonek et al., 2005a,b). Виды, не входящие в GFSC, например, *F. graminearum*, вообще не содержат генов кластера ГК. Виды *F. verticillioides*, *F. anthophilum* и *F. nisikadoi* содержат рудиментарный кластер, потеряв пять из семи необходимых генов, при этом у *F. verticillioides* сохраняется система регуляции транскрипции всех генов, входящих в кластер (Bömke et al., 2008b).

У фитопатогенного гриба *Sphaceloma manihoticola* (телеоморфа *Elsinoë brasiliensis*) была обнаружена ГК₄ в культуральной жидкости (Rademacher, 1992). Позже было показано, что кластер генов биосинтеза ГК у этого гриба содержит пять генов: *cps/ks*, *ggs2* и три гена цитохром-монооксигеназы P450 (*P450-1*, *P450-2* и *P450-4*), некоторые из которых инвертированы по сравнению с направлением считывания у *F. fujikuroi* (Bömke et al., 2008a). Как и у *F. fujikuroi*, гены *cps/ks* и *ggs2*, а также *P450-1* и *P450-4* расположены последовательно и имеют общий бифункциональный промотер (рис. 13). Из-за отсутствия генов десатуразы (*des*) и 13-гидроксилазы (*P450-3*), *S. manihoticola* способна образовывать ГК₄, но не ГК₁, ГК₃ или ГК₇ (Rademacher, 1992; рис. 13). Отсутствие крайних генов в кластере ГК подтверждает гипотезу некоторых авторов о возможном горизонтальном переносе кластеров генов вторичных метаболитов и их присутствие у некоторых отдалённых и неродственных представителей (Bömke and Tudzynski, 2009).

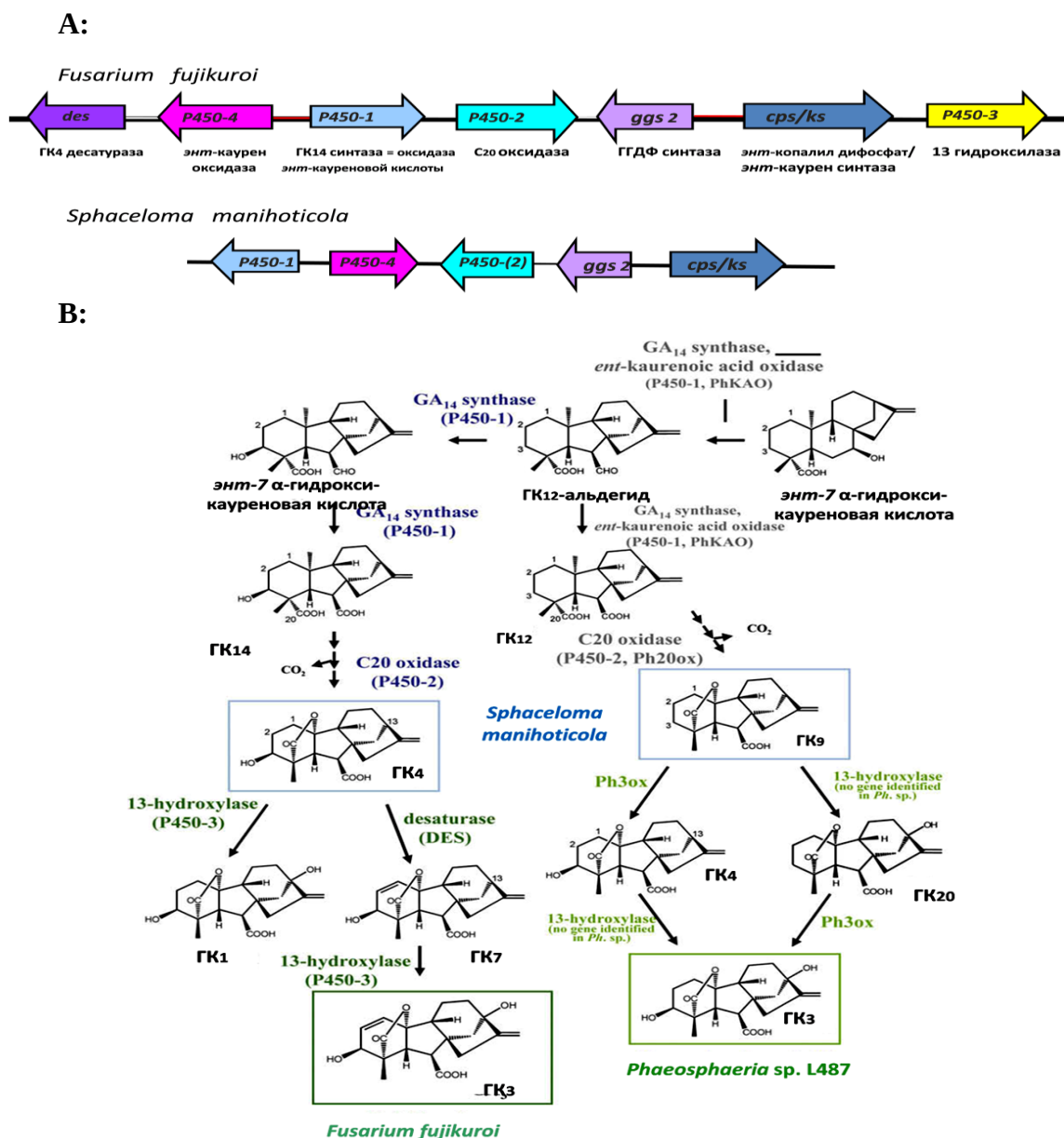


Рисунок 13. Структура кластера генов биосинтеза гиббереллинов у *Fusarium fujikuroi* и *Sphaceloma manihoticola* и сравнительная схема образования конечных ГК у *S. manihoticola* и *Phaeosphaeria* sp. по сравнению с *F. fujikuroi*. С изменениями по Tudzynski, 2005; Bömke et al., 2008a и Bömke and Tudzynski, 2009.

Способность к биосинтезу ГК обнаружена у *Phaeosphaeria* sp. L487 (Kawaide et al., 1997). Этот гриб синтезирует GK₁, GK₄ и GK₉, однако, метаболиты GK₁₄ и соответственно GK₃ не обнаружены в КЖ этого микромицета, а интермедиат GK₉ конвертируется в GK₄ или GK₂₀ и GK₁ по типу биосинтеза ГК у растений (Kawaide et al., 2006). Пять структурных генов, ответственных за биосинтез ГК, также формируют миникластер, среди которых гены, кодирующие дитерпенциклазу и четыре цитохром (P450) монооксигеназы, три из которых сходны с образуемыми *F. fujikuroi* P450-4, P450-1 (PhKAO) и P450-2, а четвёртый (Ph3ox) – сходен с растительной C-3 оксидазой. Примечательно, что в кластере

отсутствует *ggs2* синтаза, а фермент PhКАО, видимо, не обладает 3-оксидазной активностью, поскольку среди метаболитов не обнаруживается ГК₁₄ и, скорее всего, на этом этапе биосинтез ГК проходит по растительному, а не грибному типу (Kawaide, 2006).

Наличие гиббереллинов было выявлено у некоторых других микромицетов, например, *Penicillium funiculosum*, *P. cyclopium*, *P. corylophilum*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Rhizopus stolonifer*, *Verticillium* sp., *Neurospora crassa*, *Shizophillum commune*, (Kawanabe et al., 1985; Cihangir and Aksöz, 1993; Hasan, 2002). Часть этих данных, однако, была получена преимущественно за счёт косвенных методов анализа, без исследования присутствия и активности необходимых генов и ферментов, что зачастую не даёт точной информации о реальной способности этих грибов к биосинтезу ГК. Идентификация биологически-активных гибберелловых кислот в последнее время позволила выявить ГК₁, ГК₄, ГК₇ у *Aspergillus caespitosus*; ГК₁, ГК₄, ГК₃ – у *Aspergillus clavatus* (You et al., 2015); ГК₁, ГК₃, ГК₄, ГК₇ – у фитопатогена *Cadophora malorum* (You et al., 2013); а также ГК₁, ГК₃, ГК₄, ГК₇ – у различных видов пенициллиума: *P. formosus*, *P. citrinum*, *P. funiculosum*, *P. minioluteum* (по Salazar-Cerezo et al., 2018). Несмотря на то что образование значительных количеств гибберелловых кислот зачастую встречается у фитопатогенных грибов, таких как *F. fujikuroi*, *Phaeosphaera* sp., *Sphaceloma manihoticola*, *Cercospora rosicola* (Coolbaugh et al. 1985; Rademacher and Graebe, 1979; Bömke and Tudzynski, 2009), также появляются данные о способности к биосинтезу ГК грибами-эндофитами, не вызывающими симптомов каких-либо заболеваний у растений: например, *Penicillium commune*, выделенного из корней кунжута восточного, который синтезирует значительные количества ГК₃, ГК₄, и ГК₇ (Choi et al., 2005), или *Arthrinium phaeospermum*, изолированного из корней осоки (*Carex kobomugi*), который синтезирует биоактивные ГК₁, ГК₃, ГК₄, и ГК₇ и при этом обладает рост-стимулирующими характеристиками (Khan et al., 2008), связанными, по мнению авторов, именно с биосинтезом гиббереллинов. Khan с соавторами (2013) также показали на примере растений сои и огурца, что образование гиббереллинов культурой эндофитных грибов *Penicillium funiculosum* LHL06 и *Exophiala* sp. LHL08 оказывает положительное влияние на рост и развитие в условиях солевого и теплового стрессов. У эндофитного гриба, заселяющего растения, *Chaetomium globosum*, обнаружены ГК₁, ГК₄, ГК₉, ГК₁₂ и ГК₂₀ (Khan et al., 2012b).

Что касается других микроорганизмов, то данные об их способности к биосинтезу ГК долгое время по большей части представляли собой лишь свидетельства результатов биотестов или тонкослойной хроматографии. Таким образом, например, гиббереллиноподобные соединения были обнаружены у некоторых представителей зеленых (*Tetraselmis* sp., *Caulerpa* sp.), бурых (*Fucus* sp.), красных (*Porphyra* sp.) и харовых

(*Chara* sp.) водорослей (Sciuto et al., 1981; Мишке, 1988; Jacobs, 1993; Kazmierczak et al., 1999). Последние исследования с помощью, например, LC-MS анализа, выявили содержание около 20-ти различных метаболитов ГК в микроводорослях, принадлежащих к семействам *Chlorophyceae*, *Trebouxiophyceae*, *Ulvophyceae* и *Charophyceae*, причём медленно растущие виды (*Scotiellopsis terrestris* МАСС 44, *Gyoeffiana humicola* МАСС 334, *Nautococcus mamillatus* МАСС 716 и *Chlorococcum ellipsoideum* МАСС 712) содержали большее количество ГК, тогда как минимальные количества ГК были обнаружены в быстрорастущих видах (*Raphidocelis subcapitata* МАСС 317 и *Coelastrum excentrica* МАСС; Stirk et al., 2013b). Во всех штаммах детектировали максимальное содержание биологически активной ГК₆ с формированием конечных продуктов ГК₁₃ и ГК₅₁. В целом, общее содержание ГК₁, ГК₃, ГК₄, ГК₅, ГК₆, ГК₇ составляло от 5 до 33% от всего содержания гиббереллиноподобных соединений. Авторы предполагают наличие следующих путей биосинтеза ГК у микроводорослей: основным является путь образования ГК₆ (ГК₁₂ → ГК₅₃ → ГК₄₄ → ГК₁₉ → ГК₂₀ → ГК₅ → ГК₆), включая возможность формирования неактивного метаболита ГК₁₃ из ГК₁₉, а также образование ГК₁ из ГК₂₀. Предположительно, путь образования ГК₄ из ГК₁₅ является минорным, несмотря на значительное содержание ГК₁₅ в исследованных микроводорослях (Stirk et al., 2013b).

1.4.2.2. Биосинтез гиббереллинов у бактерий

Среди бактерий способность к биосинтезу ГК была показана у фототрофных цианобактерий *Cylindrospermum* и *Anabaenopsis* (Mohan and Mukerji, 1979), а также у гетеротрофных представителей – симбионтов, фитопатогенов и ассоциативных ризосферных бактерий. Так, возможность образования гиббереллинов была выявлена у *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Flavobacterium*, *Herbaspirillum*, *Xanthomonas*, *Clostridium* (Barea et al., 1976; Мишке, 1988; Цавкелова и др., 2006а; Gutiérrez-Mañero et al., 2001; MacMillan, 2002). На примере ризосферных бацилл: *B. cereus*, *B. macroides* и *B. pumilus*, *B. licheniformis* было показано, что наряду с наиболее физиологически активными ГК₁, ГК₃, ГК₄ и ГК₇ они синтезируют и другие гиббереллины – ГК₅, ГК₈, ГК₃₄, ГК₄₄ и ГК₅₃ (Gutiérrez-Mañero et al., 2001; Joo et al., 2004). Cacciari с соавторами (1989) показали, что ко-культура *Arthrobacter giacomelloi* и *Azospirillum brasilense* образовывала большее количество ГК, чем эти культуры синтезируют по отдельности. Некоторые исследователи показали наличие сходного с растениями фермента (2-оксоглутарат-зависимой диоксигеназы) у бактерий *Azospirillum lipoferum* и *A. brasilense*, которые в экспериментах

in vivo, при бактеризации ими проростков риса (*Oryza sativa* L.), оказались способными конвертировать ГК₂₀ в ГК₁ (Bottini et al., 1989; Piccoli et al., 1996).

Наиболее точные современные исследования, с использованием аналитических методов идентификации метаболитов и молекулярно-генетических методов анализа генов, их экспрессии и активности ферментов были применены при изучении способности к биосинтезу ГК у симбиотических клубеньковых бактерий. Так, было обнаружено, что кластер из генов, кодирующих три цитохрома *P450*, ГГДП-синтазу и две потенциальных (ди)терпен-синтазы (*CPS* и *KS*) были выявлены у штаммов *Rhizobium* NGR234 (Freiberg et al., 1997), *Bradyrhizobium japonicum* (Tully and Keister, 1993) и некоторых других представителей семейства *Rhizobiaceae* (Keister et al., 1999). С помощью анализа ГХ-МС было показано, что *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* 8002 образует ГК₁ и ГК₄. В последнее время появляется всё больше данных о том, что именно бактерии, ассоциированные с растениями, способны к биосинтезу ГК и обладают полноценным опероном генов, необходимых для этого (Morrone et al., 2009; Hershey et al., 2014; Lu et al., 2015; Levy et al., 2017; Nagel and Peters, 2017; Nagel et al., 2018; Salazar-Cerezo et al., 2018).

К настоящему моменту считается, что биосинтетический оперон ризобий содержит гены, кодирующие восемь ферментов (рис. 14). В состав оперона входят две дитерпен-циклазы, с помощью которых образуется *энт*-каурен из ГГДФ (GGDP), – причём эти две реакции разделены и происходят последовательно с участием двух, как у растений, ферментов: *энт*-копалил дифосфат синтазы и *энт*-каурен синтазы (BjCPS и BjKS), что было показано на примере штамма *Bradyrhizobium japonicum* (Morrone et al., 2009; Lu et al., 2015). Также в состав бактериального оперона входит ген, кодирующий изопренил дифосфат-синтазу (IDS), которая образует ГГДФ из изопентенилдифосфата (ИДФ) и диметилаллил-дифосфата (ДМАДФ, DMADP) (Nagel et al., 2018). Кроме того, в опероне присутствуют, как минимум, три оксидазы цитохрома *P450* типа: (CYPs), CYP112, CYP114 и CYP117 (Tully et al., 1998). У другого штамма этого же вида брадиризобиума (USDA 110), помимо вышеперечисленных генов, были обнаружены гены, кодирующие ферредоксин- (Fd) и короткоцепочечную алкогольдегидрогеназу/редуктазу (SDR): Fd необходим для окислительной реакции, катализируемой CYP114, в результате которой образуется ГК₁₂-альдегид, который затем окисляется в ГК₁₂ с участием SDR (Nagel and Peters, 2017). Кроме этих основных генов, в составе оперона обнаружена изопентенилдифосфатизомераза (IDI), которая, вероятнее всего, участвует в реакции взаимодействия и взаимопревращения ИДФ и ДМАДФ с образованием ГГДФ, а также дополнительная оксидаза CYP115 (Nagel and Peters, 2017). В то время как, "основной

состав" оперона позволяет осуществить биосинтез до ГК₉, наличие оксидазы CYP115 обеспечивает формирование биоактивной ГК₄ (Nagel et al., 2018).

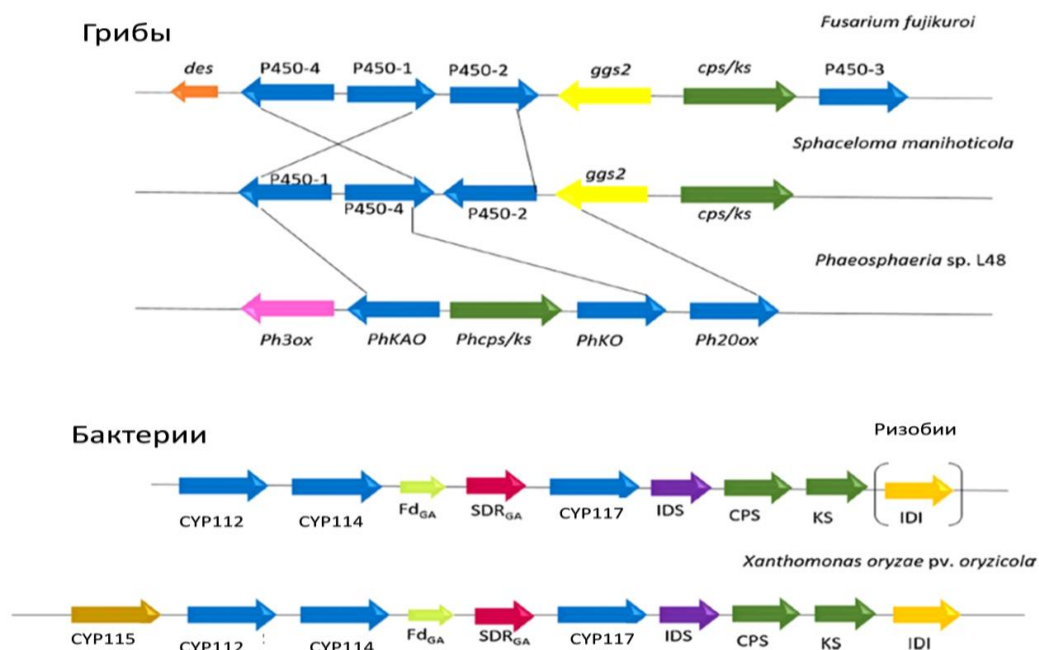


Рисунок 14. Сравнение кластеров генов биосинтеза гиббереллинов у некоторых грибов и бактерий. Бактериальные кластеры содержат три гена, кодирующих цитохром р450 (P450 и CYP), один – *энт*-копалилдифосфат синтазу (CPS) и один – *энт*-каурен-синтазу (KS). Сокращения: *des* – десатураза; *P450* – цитохром; *ggs2* – геранилгераниол-дифосфат синтаза 2; Ph3ox – растительно-подобная C-3 оксидаза; PhKAO – оксидаза *энт*-кауреновой кислоты P450-1; PhKO – *энт*-каурен оксидаза P450-4; Ph20ox – C-20 оксидаза P450-2; CYP – цитохром P450; Fd – ферредоксин; SDR – алкогольдегидрогеназа/редуктаза с короткой цепью; IDS – изопренил-дифосфат синтаза; CPS – *энт*-копалил-дифосфат синтаза; KS – *энт*-каурен-синтаза; IDI – изопентенил-дифосфат изомеразы. Стрелка указывает направление транскрипции. С изменениями по источнику: Salazar-Cerezo et al., 2018.

В то время как фитопатогенные бактерии (например, γ -протеобактерии из родов *Xanthomonas* и *Erwinia*) содержат CYP115, среди ризобий (группа α -протеобактерий) менее 20% штаммов имеют этот ген, тогда как подавляющее большинство содержат неполный оперон (Nett et al., 2017a), поэтому большинство симбиотических ризобий образуют только неактивную ГК₉. В геноме другой бактерии из группы β -протеобактерий, – *Paraburkholderia mimosarum* LMG 23256^T, формирующей клубеньки с тропическими растениями *Mimosa pigra*, также выявлено наличие оперона без гена CYP115. Предполагается, что в процессе эволюции произошло приобретение этого оперона от γ -протеобактерий, а затем утеря CYP115. Это подтверждает гипотезу, что образование биологически-активной ГК₄ может иметь отрицательное влияние на развитие симбиоза с бобовыми растениями и формирование клубеньков (Nagel et al., 2018). Биосинтетический

оперон, позволяющий образовывать биологически-активную ГК₄, был описан у фитопатогенной *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* и включает следующие гены: CYP115, CYP112, CYP114, FDGA, SDRGA, CYP117, IDS, CPS, KS, а также IDS (Salazar-Cerezo et al., 2018), которые гомологичны таковым у видов *Bradyrhizobium* (Nett et al., 2017a,b).

В целом, отличие в биосинтезе гиббереллинов между растениями, грибами и бактериями отражено на рисунке 15. На рисунке можно видеть, что начальные стадии вплоть до образования ГК₁₂-альдегида являются практически одинаковыми у всех, за тем исключением, что у грибов задействован бифункциональный фермент для образования *энт*-каурена из ГГДФ, тогда как у растений и бактерий – это два различных фермента: *энт*-копалил дифосфат синтаза (CPS) и *энт*-каурен синтаза (KS) (Tudzynski, 2005; Morrone et al., 2009; Hedden and Thomas, 2012; Hershey et al., 2014; Nett et al., 2017a; Salazar-Cerezo et al., 2018). В высших растениях ГК₁₂-альдегид конвертируется в ГК₁₂ и далее, вследствие гидроксирования по С-13, он превращается в ГК₅₃. Соединения ГК₁₂ и ГК₅₃ являются предшественниками для двух других цепочек реакций, которые затем без и с гидроксированием по С13 атому окисляются по С-20 положению с образованием ГК₉ и ГК₂₀, соответственно (Hedden and Thomas, 2012). В растениях конечным этапом является 3β-гидроксирование этих соединений с образованием ГК₄ и ГК₁, соответственно. У грибов, например у *F. fujikuroi*, ГК₁₂-альдегид сначала гидроксится с образованием ГК₁₄-альдегида, который затем окисляется в положении С-7 с образованием ГК₁₄, который, окисляясь, конвертируется в ГК₄ (Urrutia et al., 2001; Tudzynski, 2005). ГК₄ является биологически-активной ГК, которая превращается с участием десатуразы в ГК₇, которая затем конвертируется в ГК₃ путём гидроксирования по 13 атому углерода. ГК₁ образуется в другой (минорной) реакции при гидроксировании ГК₄. Таким образом, наиболее отличительной чертой на этом этапе между грибами и растениями является стадия 3β- и 13-гидроксирования: тогда как у грибов ГК₁₂ альдегид 3β-гидроксится в ГК₁₄-альдегид, а 13-гидроксирование имеет место только на заключительном этапе с образованием ГК₃ из ГК₇, у растений финальным шагом является 3β-гидроксирование ГК₇ и ГК₂₀ с образованием ГК₄ и ГК₁, соответственно (Salazar-Cerezo et al., 2018).

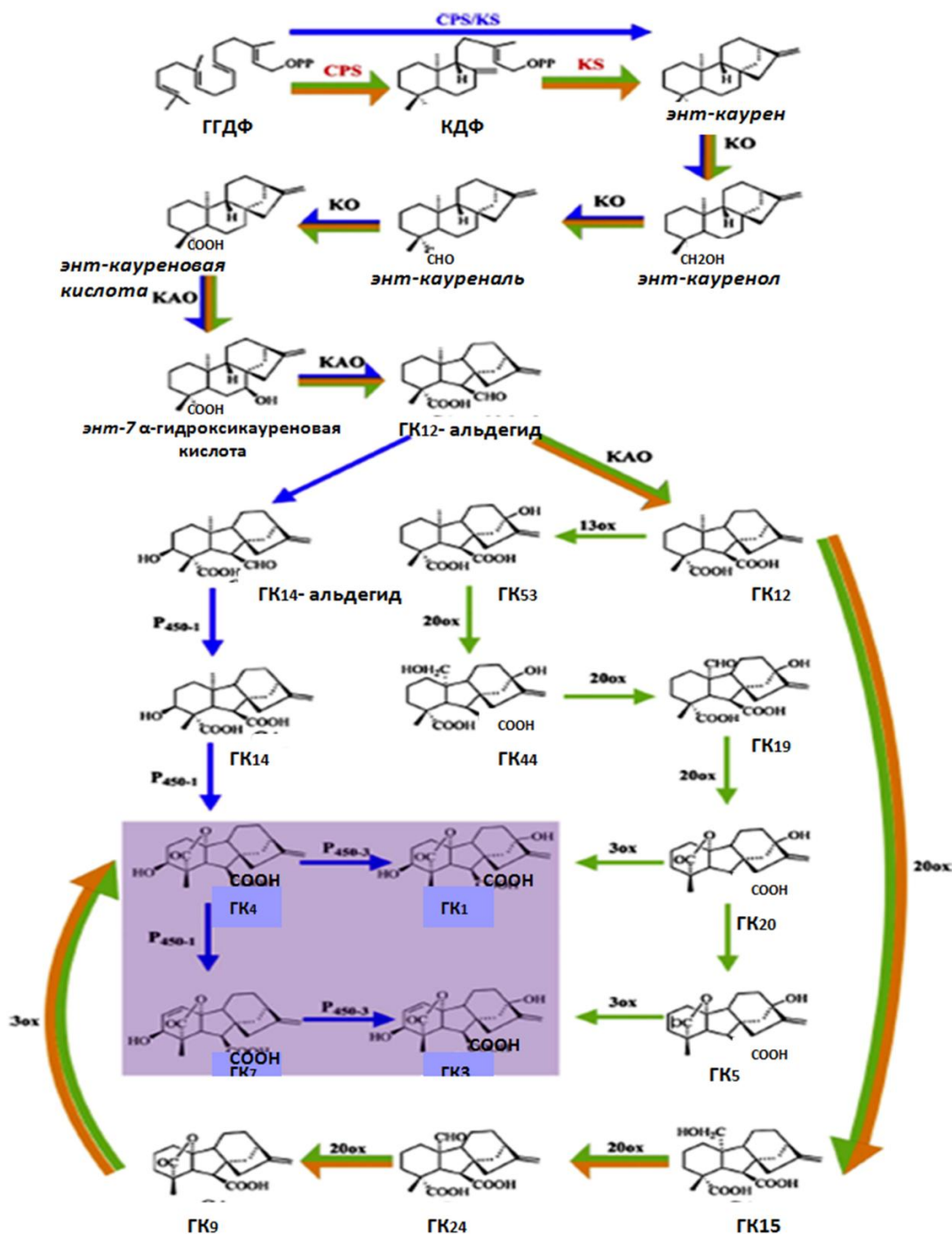


Рисунок 15. Пути образования гиббереллинов у растений (зелёный), грибов (синий) и бактерий (коричневый). Биоактивные ГК отмечены в закрашенном поле. Исходные, промежуточные и конечные соединения, а также ферменты указаны для каждого шага. Сокращения: ГГДФ – геранилгераниол-дифосфат; КДФ – *энт*-копалил-дифосфат; CPS – *энт*-копалилдифосфат синтаза; KS – *энт*-каурен-синтаза; CPS/KS, бифункциональный фермент грибов; КО – *энт*-каурен оксидаза; КАО – оксидаза *энт*-кауреновой кислоты; 13ox – 13 оксидаза; 20окс – 20-оксиглутарат-зависимая диоксигеназа; 3ox – 3 оксидаза; P450-1 – цитохром P450 монооксигеназа 1; P450-3 – цитохром P450 монооксигеназа 3. С изменениями по источнику: Salazar-Cerezo et al., 2018.

У бактерий биосинтез ГК сходен с таковым у растений по пути без гидроксирования по C13 атому, при котором ГК₁₃-альдегид конвертируется в ГК₁₂ через окисление по C7, затем ГК₁₂ окисляется по C-20 с образованием ГК₁₅, который также окисляется с образованием ГК₂₄, с последующей потерей C20 и формированием лактонного кольца, что приводит к образованию ГК₉ (Méndez et al., 2014; Nett et al., 2017a, b); ГК₉ подвергается 3β-гидроксированию с образованием биологически-активного ГК₄ (Nagel et al., 2017; Salazar-Cerezo et al., 2018). Недавние исследования путей образования ГК показали, что пути образования ГК у растений, грибов и бактерий эволюционировали независимо друг от друга; хотя они и содержат одинаковые интермедиаты, наиболее значимые ферменты принадлежат к разным семействам, хотя и к одному классу и имеют невысокое сходство на молекулярном уровне (Nett et al., 2017a; Nagel and Peters, 2017b; Salazar-Cerezo et al., 2018). Например, бактериальные ферменты CPS и KS по аминокислотному составу имеют сходство лишь на 20% с гомологичными ферментами растений и грибов (Salazar-Cerezo et al., 2018).

У бактерий их способность к биосинтезу ГК рядом авторов рассматривается, как одно из свойств фитопатогенов, например, за счёт подавления эффекта другого гормона, продуцируемого растениями, жасмоновой кислоты, что, в свою очередь, угнетает защитные свойства растения (Nett et al., 2017a). Однако наличие кластера генов биосинтеза ГК и активный биосинтез биологически-активных ГК симбиотическими ризобиями, вероятнее всего, необходим для нормального и стабильного формирования клубеньков и симбиотических отношений с бобовыми растениями (Tully and Keister, 1993).

Известно, что экзогенные гибберелины могут стимулировать рост и развитие бактерий из родов *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, некоторых представителей дрожжей и мицелиальных грибов (Barea et al., 1974; Мишке, 1988). ГК₃ ускоряет рост и способствует азотфиксации цианобактерии *Anabaena* (Kapoor and Sharma, 1981), а также повышает образование литических ферментов некоторыми бактериями и грибами (Barea et al., 1974). На примере гриба *Trichoderma reesei* (Zamost and Mc Clary, 1983) показано, что ГК₃ в 2 раза повысит образование этим микромицетом целлюлаз, при этом не влияя на увеличение его биомассы, что авторы связывают с повышением проницаемости клеточных стенок гриба, вследствие чего усиливается выход литических ферментов в среду.

Гиббереллины широко используют в сельском хозяйстве и цветоводстве, в частности, для увеличения числа цветочных почек и количества цветов на растении, для более раннего их цветения (da Silva Vieira et al., 2010), чтобы улучшить и ускорить

созревание плодов после опыления, а также для получения обильных кистей бескосточковых плодов винограда (Lu et al., 1995). Для этих целей используют прежде всего глубинное культивирование основного продуцента *Fusarium fujikuroi*, поскольку другие способы – химический синтез или экстракция из растений экономически не выгодны (Rodrigues et al., 2012).

Кроме того, различные штаммы микроорганизмов также могут быть использованы для улучшения роста и развития растений благодаря своим свойствам биосинтеза ГК. Так, культура *B. methylotrophicus* KE2 увеличивала количество прорастающих семян растений салата *Lactuca sativa* L., дыни *Cucumis melo* L., сои *Glycine max* L. и капусты *Brassica juncea* L. (Radhakrishnan and Lee, 2016). Кроме ауксинов, которые также образует эта культура, в культуральной жидкости обнаружены следующие ГК: ГК₁, ГК₃, ГК₇, ГК₈, ГК₉, ГК₁₂, ГК₁₉, ГК₂₀, ГК₃₄, ГК₅₃. Влияние этого микроорганизма за счёт образуемых ГК было подтверждено значительным увеличением содержания ГК в растениях риса – делеционных мутантах по биосинтезу ГК, отличающихся карликовостью. На примере таких мутантных растений было показано, что микромицеты *Paecilomyces formosus* (Khan et al., 2012a), *Penicillium* sp. и *Cadophora malorum* (You et al., 2013), а также *Talaromyces pinophilus* (Khalmuratova et al., 2015), у которых отмечен биосинтез биологически-активных ГК, способствуют и улучшают рост таких растений, однако, авторы не дают чёткого определения, происходит ли это лишь за счёт гибберелловых кислот, или же одновременного влияния ауксинов, которые также могут влиять на этот процесс. Отличительной чертой является способность ГК-образующих микроорганизмов стимулировать рост растений в стрессовых условиях: например, при повышенной солёности, что было показано на примере использования микромицетов *Phoma glomerata* и *Penicillium* sp. с семенами огурца (Waqas et al., 2012) и *Penicillium janthinellum* – с семенами томата (Khan et al., 2013). Гиббереллин-образующие штаммы *Azospirillum lipoferum* (Cohen et al., 2009) и *Sphingomonas* sp. (Halo et al., 2015) повышали резистентность растений в условиях водного (засуха) и соляного стрессов, соответственно.

Таким образом, интерес к ГК в последнее время повысился, что связано как с целым рядом невыясненных фундаментальных вопросов о механизмах и различных путях биосинтеза ГК, регуляции экспрессии генов и их локализации, так и о многогранных проявлениях влияния этого фитогормона на растения и микроорганизмы, а также его роли во взаимодействии между растением-хозяином и его микробными партнёрами, а также об условиях, приводящих к биосинтезу различных биологически-активных ГК.

1.4.3. Цитокинины

Цитокинины представляют собой встречающиеся в природе N6-замещенные производные аденина (аминопурины) с изопреноидной или ароматической боковой цепью. К настоящему моменту известно около 40 различных соединений цитокининовой природы, содержащихся в растениях, однако, первое вещество с цитокининовой активностью было получено Ф. Скугом с коллегами из ДНК спермы сельди и названо кинетином (рис. 16; Miller et al., 1955). Затем из растения кукурузы (*Zea mays* L.) был выделен фактор, ответственный за процесс деления клеток, транс-зеатин (tZ), который является одним из наиболее широко представленных в растениях цитокинином, а позже – изопентениладенин (iP), который был найден в качестве минорного основания двух сериновых транспортных РНК дрожжей и *E. coli* (рис. 17). Этот цитокинин наиболее распространён в природе и встречается у млекопитающих, растений, грибов и бактерий

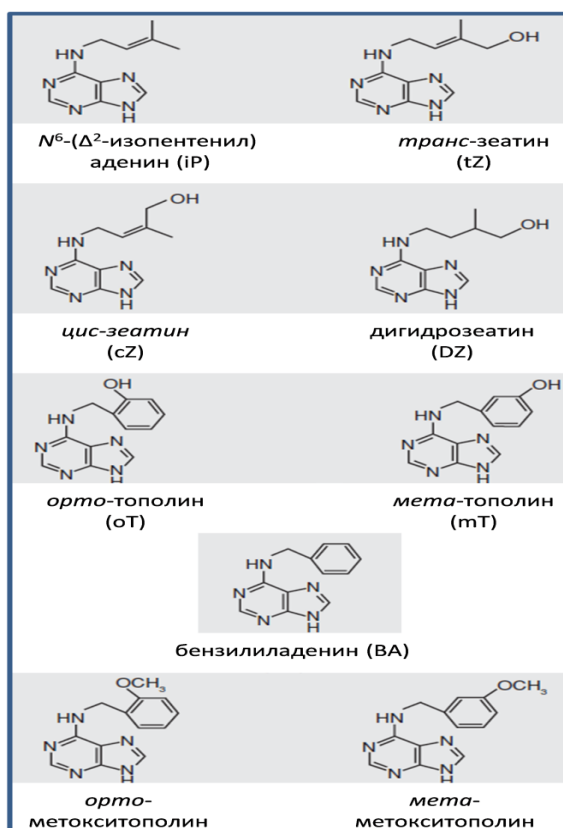
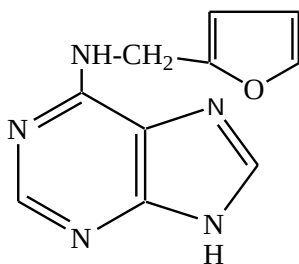


Рисунок 16. Кинетин.

Рисунок 17. Структурные формулы некоторых цитокининов.
С изменениями по источнику: Sakakibara, 2006.

В высших растениях цитокинины преимущественно образуются в растущих корнях и затем транспортируются с током по ксилеме в другие органы. В растениях цитокинины обнаружены как в свободном виде, так и в форме глюкозидов или рибозидов, чья активность снижена или полностью отсутствует. Подобные гликозидные формы

необходимы для регуляции активности цитокининов в растении (Дерфлинг, 1985). В зависимости от химического строения (структуры заместителя и его положения в пуриновом кольце) активность этих фитогормонов также может варьировать. Цитокинины участвуют во многих физиологических реакциях и процессах: они активируют синтез РНК и белка в клетке, стимулируют прорастание семян и деление клеток, способствуют цветению и ветвлению, прерывают состояние покоя в почках, регулируют формирование хлоропластов, повышают стабильность фотосинтетического аппарата при водном стрессе и общую устойчивость клеток к различным неблагоприятным абиотическим факторам среды и болезнетворным грибам и вирусам (Дерфлинг 1985; Laten 1995; Кузнецова и Вайшля, 2001; Кулаева и Кузнецов, 2002; Morrison et al., 2015). Цитокинины, воздействуя на синтез РНК и белков, увеличивают активность РНК-полимераз и матричную активность хроматина. В арабидопсисе (*Arabidopsis*) *транс*-зеатин и изопентенил-аденин превалируют, тогда как в растениях кукурузы и риса *цис*-формы зеатина также обнаруживаются в высоких концентрациях (Mok and Mok, 2001; Sakakibara, 2006).

Считается, что существует два основных пути образования цитокининов. Путь образования *de-novo* из моно-, ди-, или трифосфатов и диметилаллилпирофосфата, который наиболее характерен для фитопатогенных бактерий, тогда как у растений долгое время вообще не могли обнаружить гены, ответственные за биосинтез ряда ферментов этого пути. Другой (непрямой) путь встречается широко и у растений, и у микроорганизмов: цитокинины образуются при распаде тРНК, к адениновому основанию которой присоединяется изопентенил в реакции, катализируемой тРНК-изопентенилтрансферазой (t-RNA-IPT). Гены *miaA*, ответственные за синтез фермента, участвующего в этой реакции у бактерий, присутствуют, например, у фитопатогенной *Agrobacterium tumefaciens*, но также и у *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizobium* sp. и *Methylobacterium oryzae*. Аналогичный ген, *mod5*, обнаружен у некоторых дрожжей (Gray et al., 1996; Kwak et al., 2014). На примере фитопатогенной *A. tumefaciens* показано, что даже в отсутствие Ti плазмиды и с делецией по генам *de-novo* синтеза цитокининов, агробактерии образуют значительные количества изопентиладенина (iP) именно за счёт этого пути (Gray et al., 1996). При деградации тРНК могут образовываться как неактивные *цис*-изомеры, так и биологически-активные *транс*-изомеры цитокининов (Ajitkumar and Cherayil, 1985; Троценко и др., 2001; Kakimoto, 2003).

Путь *de-novo* обнаружен у многих фитопатогенных бактерий: *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi*, *Rhodococcus fascians* и *Erwinia herbicola* и осуществляется с участием фермента аденилат:изопентенилтрансферазы (цитокинин синтазы, IPT), который катализирует реакцию между диметилаллил-пирофосфатом и

аденозинмонофосфатом с образованием изопентениладенин-монофосфата (Gray et al., 1996; Kakimoto, 2003). Ключевой фермент (изопентенилтрансфераза, IPT) кодируется гомологичными генами: у *A. tumefaciens* это *ipt* (isopentenyltransferase) и *tzs* (trans-zeatin); у *Pseudomonas solanacearum* – это *ipt*, а у *E. herbicola* – *etz* (Lichter et al., 1995; Gray et al., 1996). Затем происходит активация рибозилированных фосфорилированных форм цитокининов с участием так называемых "lonely guy" (LOG) ферментов и их превращение в *транс*-зеатин и изопентениладенин, что было впервые показано на растениях риса (Kurakawa et al., 2007; Frébort et al., 2011).

У растений при биосинтезе цитокининов также участвует фермент IPT (или t-RNA-IPT), который осуществляет перенос изопентенильной цепи на аденозин-монофосфат, в результате чего образуются рибозилирофанные и фосфорилированные формы (Sakakibara, 2006). К настоящему моменту известно также, что источником изопреноидной боковой цепи может быть два пути: изопреноидные боковые цепи N^6 -(Δ^2 -изопентенил) аденина (iP) и *транс*-зеатина (tZ) преимущественно происходят из метилэритритолфосфатного пути (MEP), тогда как большая часть боковой цепи *цис*-зеатина (cZ) – из мевалонатного пути (MVA) (Kasahara et al., 2004).

Долгое время гены IPT в растениях не удавалось идентифицировать. К настоящему моменту их присутствие подтверждено у *Arabidopsis*, петунии (*Petunia hybrida*) и у хмеля (*Humulus lupulus*; Sakakibara, 2006). Тогда как первые упоминания об IPT генах в бактериях появились именно на примере фитопатогенной *Agrobacterium tumefaciens* еще в восьмидесятых годах прошлого века (Akiyoshi et al., 1984, Barry et al., 1984; Kakimoto, 2001). Агробактерия имеет два IPT гена, обозначенные как *Tmr* (tumor morphology rooty) и *Tzs* (tZ synthesizing). Первый располагается в T-DNA области *Ti*-плазмиды, а *Tzs* находится в области вирулентности *Ti*-плазмиды непалинного типа, чья роль заключается в повышении эффективности переноса T-DNA (John and Amasino, 1988; Sakakibara, 2006). После инфицирования ген *Tmr* интегрируется в геном растения-хозяина, тогда как *Tzs* функционирует в бактериальной клетке. У *A. tumefaciens* также обнаружен альтернативный путь биосинтеза цитокининов, когда источником боковой цепи в реакции с 5'-АМФ может быть соединение 4-гидрокси-3-метил-2-бутенилдифосфат – продукт дезоксиксилулозного немевалонатного пути биосинтеза изопреноидных соединений (Krall et al., 2002), а конечным продуктом реакции является зеатинрибозид-5-монофосфат.

Способность к образованию цитокининов выявлена у многих микроорганизмов (Цавкелова и др., 2006а). Среди водорослей соединения с цитокининовой активностью были идентифицированы у представителей зелёных: *Chlorella*, *Chlamydomona*, *Chlorella*;

бурых (*Ascophyllum*, *Macrocystis*, *Fucus*, *Sargassum*), а также у красных (*Porphyra*) и харовых *Chara* sp. (Stirk et al., 2003; Ördög et al., 2004) водорослей. Считается, что гликозилированные и конъюгированные формы цитокининов не так характерны для водорослей, как для высших растений (Тараховская и др., 2007), а основная масса цитокининов у них образуются в процессе деградации т-РНК.

Цитокинины обнаружены у цианобактерий *Anabaena*, *Chlorogloeopsis* и *Calothrix* (Селях и Семёнова, 2000), а также *Nostoc*, *Scenedesmus*, *Synechocystis*, *Chroococcidiopsis*, *Anabaena*, *Phormidium* и *Oscillatoria*, у которых были обнаружены не только изопентениладенин, но и *транс*- и *цис*-зеатин, зеатин-О-глюкозид, а также зеатинрибозид (Hussain et al., 2010). Некоторые авторы указывают на наличие у цианобактерий *Synechocystis* sp. цитокинин-связывающего белка с высоким сродством к *транс*-зеатину, а также наличие IPT и t-RNA-IPT генов, что предполагает возможность латерального переноса сигнальной системы биосинтеза и восприятия цитокинина у эволюционных предшественников хлоропластов, которые могли привнести её затем в растительную клетку (Schmülling et al., 2003; Шевченко и др., 2014). Наличие изопентенилтрансферазы и её участия в первых шагах биосинтеза цитокининов было показано у представителя *Anabaena/Nostoc* (*Nostoc* sp. PCC 7120; Kakimoto, 2003). Позже в цианобактериях был обнаружен ген, кодирующий цитокининдегидрогеназу (СКХ), которая необратимо инактивирует цитокинины. Этот фермент присутствует в растениях в крайне низких концентрациях; СКХ-подобный белок был также выявлен у *Anabaena variabilis*, *Acaryochloris marina*, *Microcoleus chthonoplastes* и *Nodularia spumigena* (Frébort et al., 2011).

Образование цитокининов обнаружено у ряда гетеротрофных бактерий: *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и некоторых стрептомицетов (Tien et al., 1979; Миклашевич и др., 1989; Upadhyaya et al., 1991; Noel et al., 1996). Образование цитокининов выявлено у метилотрофных и метанотрофных бактерий, например, *Aminobacter*, *Blastobacter*, *Methylobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Methylovorus*, *Methylobacillus*, *Methylosinus*, *Methylopila*, *Methylobacter*, *Methyloarcula*, *Xanthobacter*, *Methylophylus*, *Paracoccus*, *Methylomonas*, (Long et al., 1997; Иванова и др., 2001; Koenig et al., 2002). Из культуральной жидкости фототрофной пурпурной несерной бактерии *Rhodospirillum rubrum* также был выделен 4-гидроксифенетиловый спирт, обладающий цитокининовой активностью (Serdyuk et al., 1995). На примере ризосферных бактерий, принадлежащих к родам *Methylobacterium*, *Bacillus* и *Azotobacter*, а также микоризных грибов *Rhizopogon luteolus* и *Paxillus involutus* показано, что эти

микроорганизмы образуют аналогичный зеатинрибозидный комплекс (Nieto and Frankenberger, 1989; Троценко и др., 2001; Koenig et al., 2002). При исследовании пресноводных планктонных форм бактерий выявлено, что представители родов *Vibrio*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Achromobacter* и семейства *Enterobacteriaceae* образуют изопентениладенин, зеатин и зеатин-рибозид (Donderski and Gluchowska, 2000).

Основными продуцентами цитокининов в их высоких концентрациях являются фитопатогенные бактерии. Известно, что гены, ответственные за синтез цитокининов у *A. tumefaciens*, *P. solanacearum* и *P. syringae* pv. *savastanoi*, *R. fascians* и *E. herbicola* зачастую локализованы именно в Ti-плазмидах и представлены генами *ipt* и *tzs* (Barciszewski et al., 2000; Цавкелова и др., 2006а). У этих бактерий выявлен синтез цитокининов с помощью изопентенилтрансферазы (Gray et al., 1996). На примере *A. tumefaciens* показано, что некоторые структурные гены могут находиться под контролем эукариотического промотера, что позволяет им проявляться исключительно в клетках растения-хозяина. Проникая в клетки растения, плазмиды обеспечивают избыточный синтез фитогормонов, что стимулирует процесс развития заболеваний, вызываемых этими микроорганизмами. В то же время биосинтез цитокининов, например, клубеньковыми бактериями из рода *Rhizobium*, наоборот, стимулирует образование симбиотических клубеньков у бобовых растений.

Соединения с цитокининовой активностью обнаружены у ряда сапротрофных грибов, например, *Dictiostellium discoideum*, микоризных грибов *Rhizopogon*, *Paxillus*, *Suillus* и среди фитопатогенных *Taphrina*, *Ustilago*, *Schizophyllum*, *Uromyces* (Мишке, 1988; Nieto and Frankenberger, 1989; Barker and Tagu, 2000; Цавкелова и др., 2006а; Chanclud and Morel, 2016). При этом лишь недавно гены *ipt* и *log* были обнаружены в составе геномов некоторых грибов (Hinsch et al., 2015; Chanclud and Morel, 2016). Было показано, что цитокинины оказывают своё влияние на физиологические реакции грибов, усиливая, например, ветвление гиф эктомикоризных грибов, влияя на тургор мембран и их проницаемость для ионов К, Са, Р и Na в мицелии базидиомицета *Suillus variegatus* (Barker and Tagu, 2000). Предположительно, при взаимодействии с микоризообразующими грибами цитокинины стимулируют рост как растения-хозяина, так и микобионта (Drüge and Schonbeck, 1993). А у фитопатогенного для растений гриба *Magnaporthe oryzae* собственные эндогенные и экзогенные цитокинины необходимы для защиты микромицета от окислительного стресса и для полного проявления его вирулентности (Chanclud and Morel, 2016).

Известно, что цитокинины стимулируют рост не только растений, но и симбиотических грибов арбускулярной микоризы (Barker and Tagu, 2000). Предполагается, что именно растение синтезирует цитокинины, которые ускоряют рост симбионтов, которые, в свою очередь, за счёт лучшей абсорбции питательных веществ и соединений фосфора оказывает стимулирующий эффект на развитие и фотосинтетический аппарат растения-хозяина.

Однако, именно цитокинины вовлечены в развитие ряда заболеваний растений (Chanclud and Morel, 2016), причём возбудителями могут оказаться как бактерии [(*Pseudomonas savastanoi*, *Agrobacterium* sp., *Rhodococcus fascians* (Barciszewski et al., 2000)] и грибы [*Ustilago* (Mills and Van Staden, 1978) и *Claviceps* (Hinsh et al., 2016)], так и, например, беспозвоночные – простейшие *Plasmodiophora brassicae* (Siemens et al., 2006) или нематоды *Heterodera schachtii* (Siddique et al., 2015). В случаях заражения бактериями и грибами отчётливо прослеживается чрезмерное повышение уровня биосинтеза цитокининов в тканях растения-хозяина, что приводит к деформации и разрастанию тканей и опухолообразованию (Spallek et al., 2018).

Недавние исследования на биотрофном грибе ржи, *Claviceps purpurea*, вызывающим спорынью, показали, что у этого гриба существует два параллельных пути биосинтеза цитокининов, один включает tRNA-IPT, а другой – использование гибридных генов (fusion) IPT-LOG, состоящих из доменов генов *IPT* и *LOG* (Hinsh et al., 2016). Для других биотрофных грибов (например, *Pyrenophora teres*, *Drechslera maydis*), активно образующих цитокинины, предполагается, что именно они вызывают формирование так называемых "зелёных островков", в местах поражения которых повышается фотосинтетическая активность растения-хозяина (Angra-Sharma and Sharma, 1999; Choi et al., 2011). Интересным исследованием является работа (Morrison et al., 2015), в которой показано активное влияние гриба на баланс цитокининов в пшенице: при инфицировании фитопатогеном (*Ustilago maydis*) в растениях происходило резкое снижение гликозилированных (запасных) форм цитокининов, а также *транс*-зеатина (биологически-активного изомера), в том числе, за счёт повышенной активности β-глюкозидазы самого гриба, а также влияния на растительные ферменты (например, цитокинин-оксидазу). Кроме того, резко возросло содержание неактивных *цис*-изомеров зеатина в инфицированных тканях, что может свидетельствовать о том, что грибы могут использовать ферменты, модифицирующие *транс*-зеатин в неактивную *цис*-форму, что вызывает ослабление иммунной системы растения, тем самым делая его беззащитным перед атакой фитопатогена.

Реакция микроорганизмов на экзогенные цитокинины может различаться. Так, кинетин не оказывал какого-либо воздействия на морфологию, скорость роста и нитрогеназную активность бактерий *Azospirillum lipoferum* и *A. brasilense* (Silveira-Schrank and Drozdowicz, 1983) и, наоборот, стимулировал развитие других бактерий, принадлежащих к родам *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Mycobacterium* и *Ervinia* (Мишке, 1988; Powell et al., 1988; Garcia de Salamone et al., 2001). У нитчатой гетероцистобразующей цианобактерии *Anabaena doliolum* кинетин стимулировал рост, пигментообразование и фиксацию атмосферного азота (Kapoor and Sharma, 1981), а у водорослей *Cosmarium botrytis* – сокращал начальную лаг-фазу и ускорял развитие культуры (Berliner, 1981).

Экзогенный кинетин ускорял рост и клеточное деление *Saccharomyces cerevisiae* (Barea et al., 1974), хотя у других представителей дрожжей, *Schizosaccharomyces acidodevoratus*, цитокинины оказывали лишь слабое стимулирующее действие, при этом, однако, усиливая их дыхание, катаболизм, а также потребление сахаров и органических кислот (Мишке, 1988). Кинетин в микромолярных концентрациях увеличивает формирование гаплоидных аскоспор у *S. cerevisiae* (Laten, 1995).

Необходимо отметить, что биосинтез цитокининов в растениях регулируется азотным метаболизмом и зависит от содержания и формы доступного азота. Причём из семи известных *IPT* генов, выявленных в арабидопсисе (*AtIPT1* и от *AtIPT3* до *AtIPT8*) (Kakimoto, 2001; Takei et al., 2001), уже выяснено, что *AtIPT3* и *AtIPT5* регулируются по-разному: *AtIPT3* быстро и специфично реагирует на NO_3^- в условиях лимитированных по азоту, а *AtIPT5* реагирует и на нитратный, и на аммонийный азот (Takei et al., 2004). Примечательно, что оба эти гена являются доминирующими в биосинтезе цитокининов и локализуются в пластидах, что свидетельствует о решающей роли азотного метаболизма при биосинтезе цитокининов (Sakakibara, 2006), также, как и в случае с гиббереллинами, когда именно изменения в доступности и формах азота определяют экспрессию гиббереллинового кластера у *Fusarium fujikuroi* (Bömke and Tudzynski, 2009).

1.4.4. Другие микробные фитогормоны и гормоноподобные соединения

Помимо трёх основных стимуляторов роста растений микроорганизмы, связанные в своей жизнедеятельности с растениями, образуют и другие гормоны и гормоноподобные соединения, например, этилен и абсцизовую кислоту (АБК), а также брассиностероиды, олигосахарины, салициловую и жасмоновую кислоты (Цавкелова и др., 2006б).

1.4.4.1. Абсцизовая кислота (АБК)

АБК (рис. 18) была открыта в 1965 г. Этот гормон также оказывает существенное влияние на рост растений, способствуя закрытию устьиц, регулируя и ускоряя процессы старения и поддержания состояния покоя, ингибируя прорастание семян и раскрытие почек, подавляя синтез ДНК, РНК и некоторых ферментов (Finkelstein and Zeevaart 1994; Цавкелова и др., 2006б; Hartung, 2010). Но особую роль АБК играет в стрессовых условиях, являясь транзиттером экологических сигналов, таких как засуха, холод, повышенная солёность и др., формируя адаптационные ответы растительного организма на воздействие этих факторов (Zeevaart, 1999; Tudzynski and Sharon, 2002; Hartung, 2010). Взаимодействуя с другими фитогормонами, АБК является антагонистом гиббереллинов. Подробнее механизмы биосинтеза и роли АБК в растениях и микроорганизмах описаны в обзорных статьях: Tudzynski and Sharon, 2002; Nambara and Marion-Poll, 2005; Mauch-Mani and Mauch, 2005; Цавкелова и др., 2006б; Hartung, 2010.

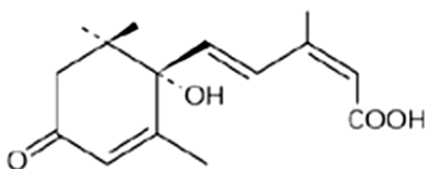


Рисунок 18. Абсцизовая кислота

Отдельное внимание привлекает роль АБК в формировании скорее негативного эффекта – восприимчивости растений к воздействию фитопатогенных микроорганизмов (Audenaert, 2002; Mauch-Mani and Mauch, 2005), причем количественное содержание АБК определяет уровень восприимчивости к фитопатогенам (Audenaert, 2002). Возрастающие концентрации АБК увеличивают восприимчивость растений к таким фитопатогенам, как *Cladosporium cucumerinum* и *Phytophthora infestans* (Henfling et al., 1980), *P. sojae* и *P. megasperma* (Ward et al., 1989), *Botrytis cinerea* (Kettner and Dörffling, 1995; Audenaert, 2002) и *Peronospora tabacina* (Salt et al., 1986). При заражении растений *Lycopersicon esculentum* Mill. фитопатогенным *B. cinerea* происходило значительное повышение в них концентрации абсцизовой кислоты (Kettner and Dörffling, 1995), а экзогенное внесение АБК значительно повышало восприимчивость растений к этим грибам (Shaul et al. 1996).

Известно, что многие болезнетворные для растений микромицеты сами являются продуцентам АБК, например, *Botrytis cinerea*, представители рода *Cercospora* (*C. cruenta*, *C. rosicola* и *C. pini-densiflori*), *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum*, *Schizophyllum commune*, *Agrocybe praecox*, *Ceratocystis coerulescens*, *Monilia* sp. (Assante et al. 1977; Crocoll et al. 1991; Макеева и др., 1999; Yamamoto et al., 2000; Audenaert et al., 2002;

Tudzynski and Sharon, 2002). Но биосинтез АБК обнаружен и у сапротрофных грибов из родов *Polyporus*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Cladosporium* (Janitor, 2002), а также у *Curvularia lunata* (Jadulco et al., 2002), изолированной из морской губки.

Абсцизовая кислота относится к изопреноидным соединениям ряда сесквитерпенов (C15). У высших растений синтез АБК начинается в пластидах и его можно рассматривать как продукт специфической деградации каротиноидов, в особенности виолаксантина, который синтезируется из пирувата и изопентенилпирофосфата в серии реакции с образованием β -каротина и зеаксантина и затем *цис*-виолаксантина и *цис*-неоксантина, для формирования которых требуется участие двух ферментов: неоксантинсинтазы и изомеразы (Milborrow and Lee 1998a). Расщепление виолаксантина приводит к образованию двух фрагментов: C15 (*цис*-ксантоксина) и неустойчивого C25 метаболита (Захарычев, 1999). Ксантоксин превращается с помощью короткоцепочечной алкогольдегидрогеназы в абсцизовый альдегид, окисление которого оксидазой абсцизового альдегида приводит к образованию АБК (Nambara and Marion-Poll, 2005; рис. 19).

В растениях для транспортировки и инактивации этого фитогормона существуют его гликозилированные формы (Полевой и Саламатова, 1991). Катаболизм АБК сводится, прежде всего, к реакциям гидроксилирования и конъюгации (Nambara and Marion-Poll, 2005).

В грибах АБК синтезируется по изепреноидному пути, в котором фарнезилдифосфат (ФДФ) непосредственно конвертируется в несколько сесквитерпеноидных ионилиден-спиртов, которые затем в последующих реакциях окисляются до ионилиден-кислот (Yamamoto and Oritani, 1997; Tudzynski and Sharon, 2002). Образование 1'4'-дигидрокси-8-ионилиден-уксусной кислоты обнаружено у *C. cruenta* и *C. rosicola* (Yamamoto et al., 2000). У *C. rosicola* производные γ -ионилидена конвертируются в АБК через интермедиат 1'-деокси-АБК (Neill et al., 1987), а у *B. cinerea*, биосинтез АБК происходит через 1'4'-транс-диол-АБК (Hirai et al., 2000).

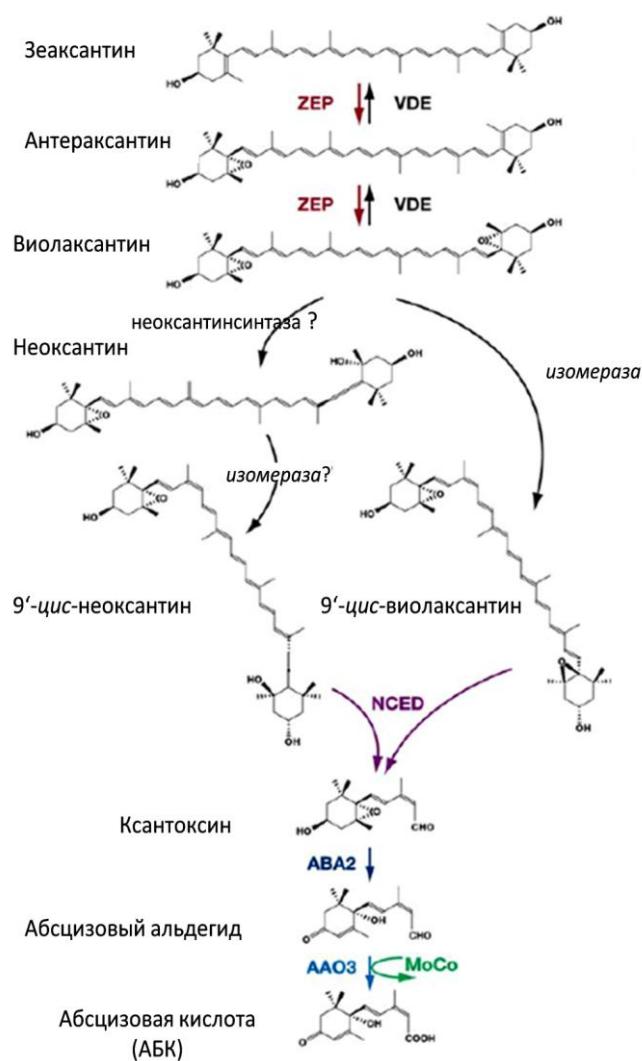


Рисунок 19. Синтез абсцизовой кислоты (АБК) у растений. Синтез виолаксантина катализируется эпоксидазой зеаксантина (ZEP). Обратная реакция происходит в хлоропластах в условиях высокой освещенности, катализируемой виолаксантин-деэпоксидазой (VDE). Для образования *цис*-изомеров виолаксантина и неоксантина могут потребоваться два фермента, неоксантинсинтаза и изомераза. Расщепление *цис*-ксантофиллов катализируется 9-*цис*-эпоксикаротиноид-диоксигеназой (NCED). Затем ксантоксин превращается с помощью короткочепочечной алкогольдегидрогеназы (ABA2) в абсцизовый альдегид, который окисляется в АБК альдегидоксидазой (AAO3). AAO3 белок содержит молибденовый кофактор, который активируется сульфорозой MoCo. С изменениями по источнику: Nambara and Marion-Poll, 2005.

Было показано, что *in vitro* экзогенная АБК в некоторой мере стимулирует рост мицелия как у фитопатогенных, так и у некоторых сапрофитных грибов: *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum*, *Cylindrocarpon destructans*, *Schizophyllum commune*, *Monilia laxa*, *Gloeosporium album*, *Botrytis cinerea* и *Monilia fructigena* (Zielińska and Michniewicz, 2001; Janitor, 2002). В то же время АБК не влияла на ростовые характеристики *C. rosicola* и *C. cruenta* (Hartung, 2010). Способность фитопатогенов синтезировать АБК, которая в свою очередь стимулирует рост этих микроорганизмов, рассматривается некоторыми авторами как фактор, определяющий их патогенность при инфицировании растений (Janitor, 2002). В то же время микоризные грибы также способны выделять АБК, находясь в корнях растения-хозяина (Murakami-Mizukami et al., 1991), однако, влияние АБК незначительно по сравнению с АБК, образуемой фитопатогенами, так как микоризообразующие грибы синтезируют небольшие количества этого фитогормона.

В других исследованиях было показано, что инокуляция клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* корней *Pisum sativum* L. не имела влияния на

концентрацию АБК (Акимова и др., 1999). Тем не менее, известно, что АБК контролирует метаболические процессы, в том числе в клубеньках: так, АБК влияет на сокращение леггемоглобина и снижение скорости азотфиксации в них (Gonzalez et al., 2001). Вместе с тем, АБК значительно увеличивала активность нитрогеназы у *Nostoc muscorum* и *Azotobacter chroococcum* (Marsalek and Simek, 1992).

АБК была обнаружена среди представителей красных (*Porphyra*), зеленых (*Ulva*) и бурых (*Laminaria*, *Fucus*, *Ascophyllum*, *Cystoseira*) водорослей (Marsalek et al., 1992; Marsalek and Simek, 1992). К настоящему моменту подавляющее большинство исследованных представителей водорослей из отделов *Rhodophyta*, *Heterokontophyta*, *Haptophyta*, *Cryptophyta*, *Dinophyta*, *Euglenophyta*, *Chlorophyta* и *Streptophyta* способны к образованию АБК (Hartung, 2010). Солевой стресс стимулировал образование АБК у *Dunaliella* и *Chlorella vulgaris* (Marsalek et al., 1992). Другие водоросли увеличивают синтез АБК при таких абиотических стрессах, как лимитирование по азоту (*Dunaliella*), нагревание (*C. vulgaris*), высушивание (*Stichococcus bacillaris* и *C. vulgaris*), окислительный (*Haematococcus pluvialis*), кислотный или щелочной стрессы (*Dunaliella acidophila*; Hartung, 2010). Ряд культур цианобактерий (*Trichormis variabilis*, *Nostoc muscorum*, *Synechococcus leopoliensis* и *Plectonema* sp.) также образуют АБК в стрессовых условиях (Marsalek and Simek, 1992; Hartung, 2010).

До сих пор способность к биосинтезу АБК у бактерий остаётся малоизученным вопросом. Ранее не удалось выявить биосинтез АБК у ряда почвенных бактерий (Hirsch et al., 1989; Müller et al., 1989). Однако в последнее время появились данные о наличии АБК у эндофитных бактерий растения *Helianthus annuus*: *Achromobacter xiloxidans* и *Alcaligenes* sp., а также *Bacillus pumilus*, которые также оказались способными к повышенному синтезу АБК в стрессовых (засуха) условиях (Forchetti et al., 2007). При бактеризации корней кукурузы (*Zea mays*) эндофитной культурой *Azospirillum brasiliense* также было отмечено не только способность этой бактерии к синтезу АБК, но и увеличение общего содержания АБК в растении, что особенно проявлялось в засушливых условиях за счёт поглощения корнями АБК микробного происхождения (Cohen et al., 2009). Таким образом, влияние АБК остаётся малоизученным, и, как в случае других гормонов, к её биосинтезу способны как фитопатогенные, так и симбиотические микроорганизмы, а реакции, вызываемые этим регулятором роста, имеют ярко выраженную зависимость от концентрации, когда чрезмерный биосинтез АБК характерен преимущественно для болезнетворных грибов, в то время как симбиотические и ассоциативные микроорганизмы обладают умеренным уровнем биосинтеза АБК.

1.4.4.2. Этилен

Этилен представляет собой газообразный олефин и также является ингибитором роста растений, ускоряющим старение и опадание листьев, созревание плодов. Выработка этилена активизируется при стрессовых воздействиях на растения. Также, как и АБК, этилен вовлечён в реакции растения на стрессовые а- и биотические факторы. Этилен, будучи газообразным соединением, может транспортироваться в растении лишь на короткие расстояния путем диффузии, однако, прямой предшественник этилена, аминокислота 1-аминоциклопропанкарбоновая кислота (АЦК), перемещается по всему растению.

Микроорганизмы способны синтезировать этилен (Tudzynski and Sharon, 2002; Цавкелова и др., 2006б): среди грибов наиболее всего изучен *Penicillium digitatum*, в котором этилен был обнаружен еще в 40-х годах прошлого века, а исследования механизмов биосинтеза и роли во взаимодействии этого фитопатогена с растением-хозяином продолжают до настоящего времени (Chou and Yang, 1973; Yang et al., 2017). Известно, что уровень образуемого этилена у грибов значительно варьирует и зависит от условий культивирования и состава среды (Tudzynski and Sharon, 2002). Так, например, грибы-микоризообразователи *Cenococcum geophilum*, *Hebeloma crustuliniforme* и *Laccaria laccata* оказались не только способными к биосинтезу этилена, но и увеличивали его образование на среде, обогащенной метионином (Graham and Linderman, 1980). Среди фитопатогенных грибов образование этилена показано для *Botrytis cinerea* (Cristescu, 2002), *Fusarium oxysporum* (Graham and Linderman, 1980), *Acremonium falciforme* (Arshad and Frankenberger, 1989). В целом, микромицеты образуют этилен в количествах, значительно превышающих его уровень, необходимый для физиологических реакций в растениях. Так, например, *B. cinerea* образовывал в жидкой культуре без добавления метионина $1,1 \text{ мкл л}^{-1} \text{ ч}^{-1}$, тогда как при добавлении метионина к среде содержание этилена достигало $12 \text{ мкл г}^{-1} \text{ ч}^{-1}$ (Qadir et al. 1997). Различные штаммы фитопатогенного для цитрусовых растений *P. digitatum* увеличивали синтез этилена с $5 \text{ нл л}^{-1} \text{ г}^{-1}$ до 20 нл/л/г на необработанных и до $60 \text{ нл л}^{-1} \text{ г}^{-1}$ на предобработанных различными способами шкурках плодов цитрусовых (Chalutz et al., 1983).

Среди бактерий биосинтез этилена был отмечен у *Escherichia coli* (Ince and Knowles, 1986; Mansouri and Bunch, 1989) и фитопатогенных *Pseudomonas syringae* (Nagahama et al., 1991; Weingart and Volksch, 1997; Cristescu, 2002), *Chromobacterium violaceum* (Mansouri and Bunch, 1989) и *Ralstonia solanacearum* (Weingart, 1999). На примере *Pseudomonas syringae* показано, что внутри одного вида есть штаммы, образующие значительные количества этилена и штаммы, неспособные его синтезировать (Weingart and Volksch, 1997).

Растения синтезируют этилен через АЦК-путь (Yang and Hoffman, 1984), в котором этилен образуется в основном из метионина, однако, этионин, β -аланин и линоленовая кислота также могут конвертироваться в этилен. Метионин, взаимодействуя с АТФ, образует S-аденозилметионин, который превращается в 1-аминоциклопропанкарбооксилат (АЦК) под действием АЦК-синтазы (Tudzynski and Sharon, 2002; Цавкелова и др., 2006б). Затем под действием кислорода и фермента АЦК-оксидазы АЦК окисляется с образованием этилена. Стадия образования АЦК является скоростью лимитирующей, поэтому на этом этапе и происходит регулирование уровня образуемого растением этилена. При этом необходимо отметить, что у некоторых растений не выявлено очевидной активности АЦК-оксидазы (Summers et al., 1996).

У микроорганизмов известны два пути биосинтеза этилена без участия АЦК: через 2-кетоглютарат (КМТБ) или через 2-оксоглутарат (ОГ; Cristescu, 2002). У грибов имеется больше данных о функционировании ОГ-, но не КМТБ-пути (Fukuda et al., 1993). Субстратом для КМТБ пути также является метионин.

КМТБ является трансаминированным производным метионина и окисляется в этилен в неферментативной реакции, за счёт действия гидроксил-радикала, образуемого из молекулы кислорода при воздействии НАДН: Fe(III)EDTA оксидоредуктазы (Weingart, 1999; Tudzynski and Sharon, 2002). Например, в отсутствие НАД(Ф)Н образование этилена из КМТБ в бесклеточных экстрактах *E. coli* стимулировалось дополнительным внесением глюкозы (Ince and Knowles, 1986).

Путь с КМТБ в качестве промежуточного соединения представлен у бактерий из родов *Escherichia*, *Ralstonia*, *Chromobacterium*, *Acinetobacter*, *Rhizobium*, *Aeromonas*, *Corynebacterium* (Billington et al., 1979; Ince and Knowles, 1986; Mansouri and Bunch, 1989; Cristescu, 2002). Наличие КМТБ пути биосинтеза этилена предполагается у *Pseudomonas syringae*, дрожжей *Cryptococcus* sp. и *Sacharomyces cerevisiae*, а также фитопатогенных грибов *Penicillium digitatum*, *P. expansum* и *Botrytis cinerea* (Nagahama et al., 1991; Weingart, 1999; Cristescu, 2002; Chagué et al., 2006; Yang et al., 2017). Образование этилена по этому пути также считается возможным у *F. oxysporum*, *Colletotrichum dematium* и *C. musae*, нескольких видов *Verticillium* (Tzeng and DeVay, 1984) и у микоризообразующего гриба *Laccaria laccata* (Rupp et al., 1989). У *B. cinerea* сначала было предположено функционирование метионин-зависимого пути образования этилена (Qadir et al., 1997), а затем (Chague et al., 2002) был подтвержден синтез КМТБ, который может накапливаться в культуре в темноте, а на свету при фотоокислении конвертироваться, окисляясь в этилен.

По второму, ОГ-пути, 2-оксоглутарат конвертируется в этилен с помощью этиленформирующего фермента (ethylene forming enzyme, efe, ЭФФ), который катализирует две реакции одновременно, этилен образуется в первой из них во время окисления ОГ с образованием этилена и углекислого газа (Fukuda et al., 1993). В параллельной реакции в результате окисления L-аргинина и ОГ образуется сукцинат, углекислый газ, гуанидин и L-D-пирролин-5-карбоксилат (Fukuda et al., 1993). На примере функционирования этого пути у *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ПК была показана важность L-аргинина и L-гистидина, которые являются по сути кофакторами реакции, необходимыми для образования этилена (Nagahama et al., 1991).

Известно, что гены, ответственные за образование этиленформирующих ферментов у фитопатогенных псевдомонад, сходны у различных штаммов и локализуются в плазмиде(ах) (Nagahama et al., 1994; Weingart, 1999). Предполагается наличие горизонтального переноса генов *efe* среди различных патогенных штаммов *Pseudomonas syringae* (Weingart, 1999). В то же время, возможно, что эти гены не являются универсальными, так как у другой патогенной бактерии, *Rhizoctonia solanacearum*, ни активности *efe* генов, ни гомологичных ему других генов выявлено не было (Weingart, 1999). Активность *efe*-генов зависит от содержания в среде метионина (Billington et al., 1979; Graham and Linderman, 1980; Cristescu, 2002), источника азота и углерода (Mansouri and Bunch, 1989).

У грибов *Penicillium digitatum* (Chou and Yang, 1973; Fukuda et al., 1993), *P. cyclopium* (Pažout and Pažoutová, 1989) и *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae* (Hottiger and Boller, 1991) было подтверждено образование этилена через 2-оксоглутарат с участием ЭФФ. Причём для *Penicillium digitatum* было показано, что этот микромицет способен к образованию этилена по обоим путям: в обычных условиях культивирования – по КМТБ пути, и используя оба (КМТБ- и ОГ-пути), в стрессовых для гриба условиях (Yang et al., 2017).

Известно, что содержание этилена в растениях увеличивается при их инфицировании болезнетворными микроорганизмами (Cristescu, 2002), что с одной стороны является защитной реакцией растений на атаку фитопатогенов, а с другой, – этилен сам играет существенную роль в развитии заболевания. Кроме того, для фитопатогенных *B. cinerea* (Cristescu, 2002; Chagué et al., 2006) и *P. syringae* (Weingart and Volksch, 1997; 1999) было подтверждено образование ими этилена не только в культуре, но и в тканях инфицированных ими растений. Поэтому очевидно, что эти продуценты этилена способствуют значительному увеличению его концентрации в растениях при заражении (Weingart and Volksch, 1997). Кроме того, в ряде работ есть указание на то, что

экзогенный этилен стимулирует прорастание спор и конидий ряда фитопатогенных грибов: *B. cinerea*, *Penicillium expansum* (Kerczynski and Kerczynska, 1977) и *Colletotrichum gloeosporioides* (Kolattukudy et al., 2000).

Известно, что этилен специфически связывается с рядом белковых "этиленовых рецепторов", что является триггером для MAP-киназного каскада, передающего сигнал и, в конечном счёте, активирующего транскрипцию ряда генов (Kieber, 1997).

Интересно отметить, что у гнотобиотических проростков ели при их инокуляции микоризными грибами *Cenococcum* sp., *Hebeloma* sp. и *Laccaria* sp. обнаружение этилена совпадало с формированием микоризы (Graham and Linderman, 1980). Вместе с тем при инфицировании этих проростков фитопатогеном *Fusarium oxysporum* выделялось значительно больше этилена, чем у проростков с микоризой, что позволило предположить, что этилен играет различную роль в развитии симбиотических и патогенных взаимодействий между грибами и растением (Graham and Linderman, 1980). Ключевым фактором в этом является концентрация этилена, но дополнительное влияние также оказывают свет, температура, аэрация, возраст растения, наличие ряда соединений в питательной среде и т.д. (Tudzynski and Sharon, 2002).

Стимулирующие рост растений PGPB штаммы представителей родов *Rhizobium*, *Pseudomonas* и *Alcaligenes* способны снижать концентрацию этилена за счёт образования АЦК-деаминазы (АЦКД), которая расщепляет предшественник синтеза фитогормона – 1-аминоциклопропан-1-карбоксилую кислоту (Penrose and Glick, 2001; Belimov et al., 2001; Ma et al., 2003). Более того, некоторые ризобии, например *Bradyrhizobium elkanii* (Yuhaschi et al., 2000) синтезируют фитотоксичный антибиотик, ризобитоксин, который ингибируют образование этилена в растениях. Для клубеньковых бактерий это облегчает формирования клубеньков, поскольку этилен ингибирует этот процесс (Ma et al., 2003). Авторы считают, что бактериальный фермент АЦКД, имеющий низкое сродство к АЦК, тем не менее, эффективно конкурирует с растительным ферментом – АЦК-оксидазой, отличающимся высоким сродством к АЦК, что объясняется их соотношением: содержание АЦКД может быть больше в 100-1000 раз, чем растительной АЦК-оксидазы (Ma et al., 2003).

1.4.4.3. Соединения с гормональной активностью

Брассиностероиды

Первый брассиностероид был выделен в 1979 г. из пыльцы рапса (*Brassica napus*) и назван брассинолидом (рис. 20А). В настоящее время известно более 60 таких соединений. В растениях брассиностероиды повышают содержание хлорофилла,

увеличивают синтез белка и активность некоторых ферментов, регулируют процессы клеточной дифференциации, а также ускоряют прорастание семян, что особенно проявляется при их взаимодействии с другими стимуляторами роста растений, например ауксинами и гиббереллинами. Брассиностероиды (БС) также характеризуются широким взаимодействием с другими гормонами растений, включая не только ауксины и гиббереллины, но и жасмоновую и салициловую кислоты, абсцизовую кислоту и этилен, формируя целую сеть физиологических реакций и ответов. Причём подобное взаимодействие приводит к эффектам на молекулярном уровне, изменяя в результате генную экспрессию, запуская каскады реакций, включая активацию MAP (mitogen-activated protein)-киназ и сигнальную систему ROS – reactive oxygen species (Bajguz and Hayat, 2009).

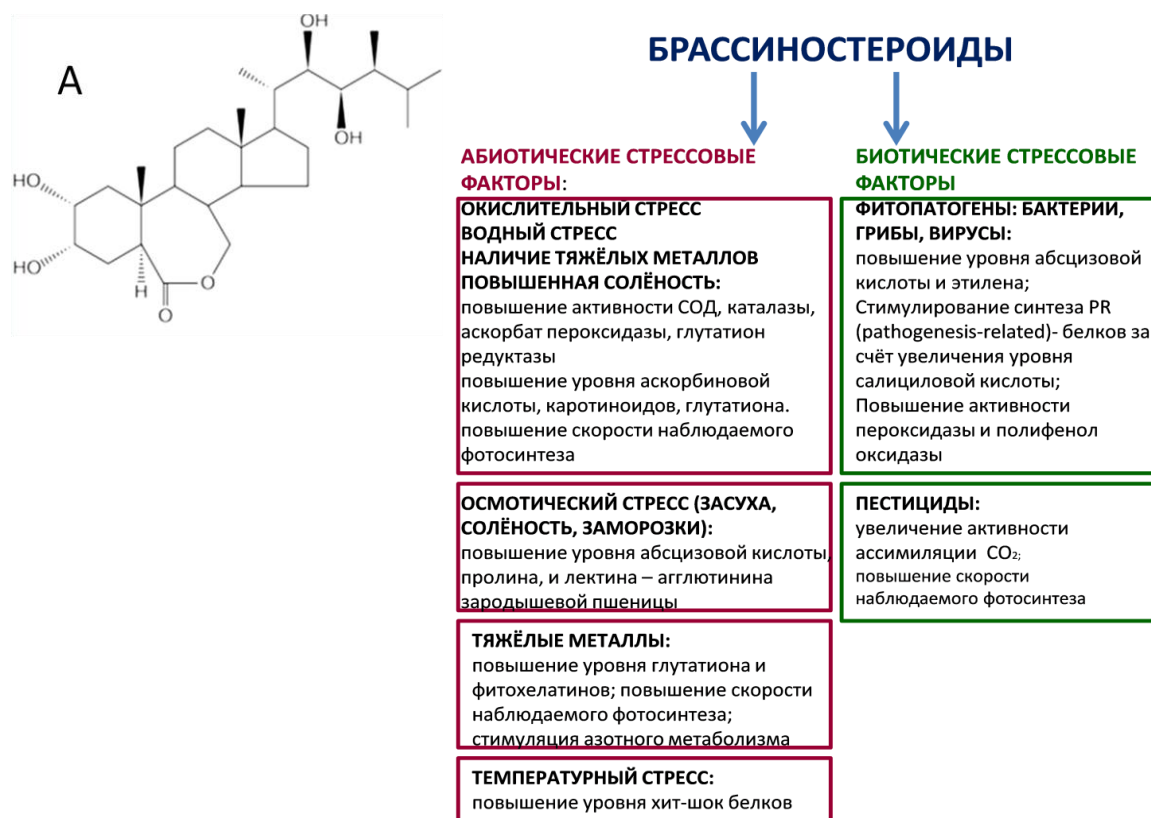


Рисунок 20. А – брассинолид. Б – Некоторые эффекты брассиностероидов, вызываемые ими в растениях в условиях воздействия различных стрессовых факторов (с изменениями по Bajguz and Hayat, 2009).

Известно, что брассиностероиды повышают устойчивость растений к неблагоприятным и стрессовым внешним факторам и заболеваниям, вызванным различными фитопатогенами (рис. 20; Nakashita et al., 2003; Bajguz and Hayat, 2009).

У растений риса и табака при обработке экзогенным БС их резистентность значительно возрастала по отношению к вирусу табачной мозаики, а также к

фитопатогенным бактериям *P. syringae* и грибам *Oidium* sp. и *Magnaporthe grisea* (Nakashita et al., 2003). В то же время в экспериментах с фитопатогенным грибом *Phytophthora infestans* не было продемонстрировано прямого ингибирующего влияния БР на рост мицелия, а активация защитного механизма была связана с активацией PR (pathogenesis-related) белков, участвующих в комплексной защите растения от фитопатогенов, включая ферменты пероксидазу, хитиназу и β -1,3-эндоглюконазу (Roth et al., 2000).

Обработка зелёных микроводорослей (*Chlorella vulgaris*) экзогенным брассинолидом приводила к значительному увеличению активности антиоксидантных ферментов (каталазы, аскорбат пероксидазы и глутатион редуктазы), а также увеличению уровня аскорбиновой кислоты, каротиноидов и глутатиона (Bajguz and Hayat, 2009). При этом *C. vulgaris* сама является продуцентом БС (Bajguz and Asami, 2004). К настоящему времени БС выделены из водорослей *C. vulgaris*, *Cystoseira myrica* и *Hydrodictyon reticulatum* (Ohnishi, 2018). Предполагается, что эндогенные брассиностероиды в том числе необходимы для нормального развития *C. vulgaris* в условиях освещения, поскольку на свету брассинозол, ингибитор биосинтеза БС, подавлял рост этого микроорганизма, а БС, добавляемый в питательную среду, предотвращал подобный ингибиторный эффект (Bajguz and Asami, 2004).

Увеличение выхода образуемых эндогенных БС было показано для целого ряда микроводорослей (*Chlorococcum ellipsoideum*, *Gyoserrhiza humicola*, *Nautococcus tamillatus*, *Acutodesmus acuminatus*, *Protococcus viridis*, *C. vulgaris*), особенно в условиях воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды, например, повышенной солености и температурного стресса (Stirk et al., 2013b). Одним из эффектов, вызываемых БС является изменения в образовании клубеньков у *Phaseolus vulgaris*, а также в эндогенном содержании других фитогормонов, регулирующих этот процесс (АБК, цитокининов и зеатин рибозида), что также имеет наибольшую выраженность в условиях водного стресса, когда добавление БС улучшало образование клубеньков и значительно повышало количественное содержание и активность нитрогеназы, видимо, опосредованное через воздействие цитокининов, что в конечном итоге, повышало урожайность стручков у этого типа фасоли (Upreti and Murti, 2004).

К сожалению, до сих пор отсутствуют исследования о способности грибов и бактерий к биосинтезу брассиностероидов. Несмотря на упоминание о том, что возбудитель церкопороза арахиса, гриб *Cercospora arachidicola*, является продуцентом брассиностероидов (Захарычев, 1999), эти данные не подтверждены.

Салициловая и жасмоновая кислоты (ЖК) являются эндогенными ингибиторами роста растений и прорастания семян. Салициловая кислота (рис. 21А) также продлевает жизнь цветков, ингибирует биосинтез этилена, способствует опылению некоторых растений за счет термогенеза, а ЖК (рис. 21Б) активирует процессы старения, опадения листьев, формирования клубней, созревания плодов, образования пигментов. Оба соединения стимулируют выработку ряда факторов, защищающих растение от действия фитопатогенов, например, вируса табачной мозаики и фитопатогенных грибов *Botrytis* и *Fusarium* (Ferrari et al., 2003, Berrocal-Lobo and Molina, 2004).

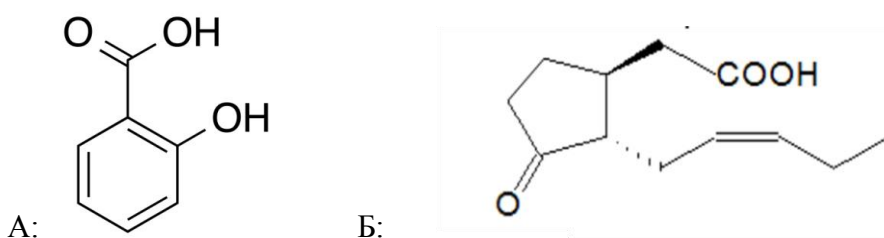


Рисунок 21. Салициловая (А) и жасмоновая кислоты (Б).

Было отмечено положительное влияние жасмоновой кислоты на развитие клубеньковых бактерий: у *Bradyrhizobium japonicum* и *Rhizobium leguminosarum* ЖК активизирует экспрессию *nod*-генов (Rosas et al., 1998). Салициловая кислота, имеющая фенольную природу, напротив, ингибирует экспрессию *nod*-генов у *R. leguminosarum* (Rosas et al., 1998). В опытах с молочнокислыми бактериями при производстве соков ЖК оказывала ингибирующее влияние на рост *Leuconostoc* sp. (Michelena et al., 2010).

Другими исследователями (Forchetti et al., 2007) было показано, что эндофитные бактерии, *Achromobacter xiloxidans* и *Bacillus pumilus*, колонизирующие подсолнечник (*Helianthus annuus* L.), сами оказались способными к синтезу ЖК. Также сообщают о наличии ЖК в культуральной жидкости *E. coli* (Abdala et al., 1999), однако, точных данных о механизме биосинтеза и метаболитах ЖК у бактерий не известно до сих пор.

Биосинтез ЖК или её интермедиата, 12-оксо-фитодиеновой кислоты, грибами представлен более широко среди микромицетов: *Botryodiplodia theobromae* и *Gibberella fujikuroi* (Miersch et al., 1992), *Lasiodiplodia theobromae* (Tsukada et al., 2010), а также представителей родов *Collybia*, *Coprinus*, *Mycena*, *Phellinus* и *Trametes* (Miersch et al., 1993; Tudzynski, 1997). У *Fusarium oxysporum* f sp *matthiole* были идентифицированы более двадцати соединений ЖК и их метаболитов (Miersch et al. 1999). Количества, в которых грибы образуют ЖК, варьируют от 1 до 1000 мг/л (Eng et al., 2018).

Салициловая кислота (СК) рассматривается как медиатор индуцированной системной устойчивости (ИСУ) растений. В исследовании С.М. Press с коллегами (Press et al., 1997) было показано, что штамм *Serratia marcescens* 90-166 является продуцентом СК и определяет повышение резистентности у делеционных мутантов по биосинтезу СК растения-хозяина (огурец посевной) в отношении бактериальных (*Pseudomonas syringae*), и грибных (*Colletotrichum orbiculare*) фитопатогенов. Другая ризосферная бактерия, *Pseudomonas fluorescens* штамм СНА0, способная к биосинтезу СК (Visca et al., 1993) в других опытах (Maurhofer et al. 1994) способствовала развитию ИСУ у растений табака в отношении вируса некроза табака. Также (De Meyer and Höfte, 1997) сообщают о роли образующей СК *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 в индукции устойчивости против фитопатогенного для растений фасоли гриба *Botrytis cinerea*.

Среди других сигнальных соединений, можно выделить **олигосахарины**, – небольшие короткоцепочечные биологически-активные углеводы, которые могут быть представлены фрагментами β -D-глюкана, хитина и хитозана клеточной стенки фитопатогенных грибов, фрагментами полигалактуроновой кислоты и ксилоглюкана клеточной стенки растений, а также липоолигосахаридами, синтезируемыми клубеньковыми бактериями (Усов, 1993; Цавкелова и др., 2006б). Фрагменты клеточных стенок фитопатогенных грибов, называемые элизиторами, вызывают специфический комплексный иммунный ответ и ИСУ в растении, в результате чего происходит лигнификация клеточных стенок и индукция синтеза PR белков. Наиболее активно олигосахарины проявляют себя в дифференцировке растительных тканей при формировании бобово-ризобияльных симбиозов. В данном случае олигосахарины являются факторами нодуляции и синтезируются направленно. Такие Nod-факторы образуются ризобиями в ответ на выделяемые корнями растений флавоны и изофлавоны и представляют собой глюкозамин, несущий на редуцирующем конце дважды ненасыщенную жирную кислоту, а на редуцирующем – сильно полярный заместитель в виде сульфатной группы (рис. 22).

Например, липохитинолигосахарид (ЛХОС), образуемый *Bacillus circulans*, оказался сходным и по строению, и по биологической активности с сигнальной молекулой (Nod-фактором) из *Bradyrhizobium japonicum* (Lian et al., 2001), а ЛХОС, образуемый *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, оказывал влияние на полярный транспорт ауксинов к корням растения-хозяина (*Vicia sativa*), снижая его (Boot et al., 1999).

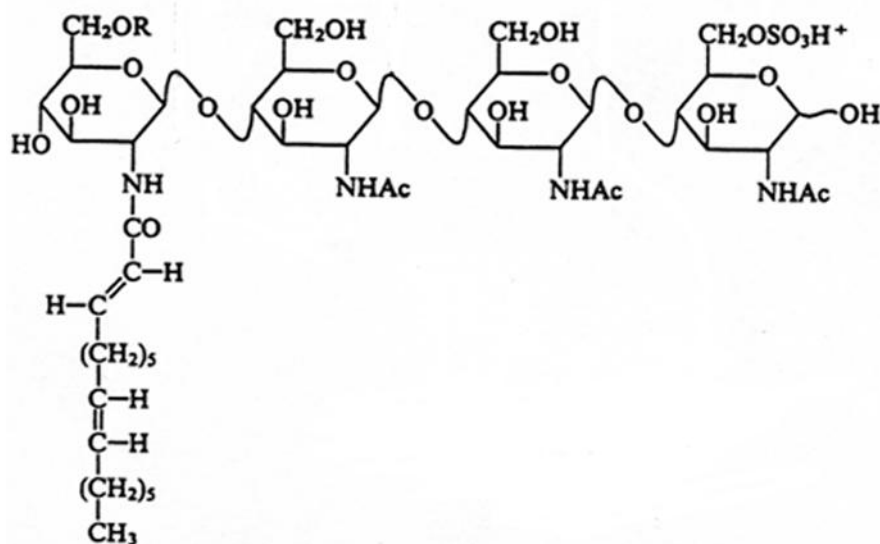


Рисунок 22. Фактор «нодуляции» *Rhizobium meliloti* (R=H). С изменениями по источникам: Усов, 1993; Цавкелова и др., 2006б.

Известно, что микроорганизмы могут синтезировать не только гормоны растений, но и животных. К таким эволюционно-консервативным молекулам относятся, например, ацетилхолин и биогенные амины – норадреналин, серотонин, дофамин, а также их метаболиты (Олескин и др., 2000; Цавкелова и др., 2000; Олескин и др., 2016). Так, серотонин, близкий химический аналог ауксинов, обнаружен у *Enterococcus faecalis* (Страховская и др., 1993), *Rhodospirillum rubrum* (Олескин и др., 1998), *Bacillus cereus* и *Staphylococcus aureus* (Цавкелова и др., 2000); норадреналин и дофамин выявлены у представителей рода *Bacillus*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *E. coli* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Цавкелова и др., 2000; Шишов и др., 2009). Кроме того, к настоящему моменту накоплены многочисленные данные о различных эффектах, которые оказывают гормоны на рост и развитие микроорганизмов, включая стимуляцию и, наоборот, ингибирование роста, изменение физиолого-биохимической активности, подвижности клеток, вирулентности штаммов, способности к адгезии и агрегации клеток (Олескин и др., 2016). Взаимовлияние гормонов на кишечную микробиоту, которая, в свою очередь, оказывает воздействие на организм человека позволило выделить микробную эндокринологию в отдельное направление (Lyte, 2010).

Примечательно, что "гормоны счастья" – серотонин и образующийся из него мелатонин, также как и ауксин (ИУК), имеют индольную природу (рис. 23) и синтезируется из триптофана.

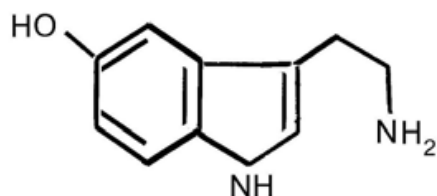


Рисунок 23. Серотонин (5-гидрокситриптамин).

У млекопитающих триптофан сначала превращается путем гидроксирования с помощью триптофан-5-гидроксилазы в 5-окситриптофан и затем декарбоксилируется до 5-гидрокситриптамина – серотонина (Хухо, 1990). Под действием моноаминоксигеназы серотонин превращается в 5-оксииндолилуксусную кислоту (5-ОИУК). У растений триптофан сначала декарбоксилируется до триптамина с помощью фермента триптофандекарбоксилазы или декарбоксилазы ароматических кислот, а затем происходит гидроксирование триптамина с образованием серотонина (Рощина, 1991). Катаболизм серотонина в растениях приводит к образованию 5-гидроксииндолилуксусной кислоты. Однако возможные пути биосинтеза серотонина в бактериях на молекулярном и ферментном уровнях, а также возможная регуляция биосинтеза и катаболизма этого соединения пока не исследованы.

Таким образом, гормоны и гормоноподобные соединения, образуемые живыми организмами, как макро- (растения, животные), так и микро- (грибы, бактерии, водоросли), представляют собой одновременно и своеобразный язык, на котором происходит внутривидовой и межвидовой "разговор" в популяциях, сообществах и консорциумах живых существ, и инструменты, которые запускают различные генетические и физиолого-биохимические изменения в организмах, формируя ответные реакции на воздействие внешних факторов, в том числе, не в последнюю очередь, и при взаимодействии с другими организмами в составе биоценоза. Такие гормоны и сигнальные молекулы опосредуют "грубые" и "тонкие" настройки в физиологических реакциях, хотя при этом каждый из участников консорциума преследует "свои интересы", а различие в оказываемых эффектах иногда определяется лишь разницей в концентрации веществ гормональной природы, так как они могут быть "ключами в руках" как фитопатогенных, так и симбиотических или ассоциативных микроорганизмов (Цавкелова и др., 2006б). В любом случае, микроорганизмы, способные выделять фитогормоны, получают конкурентное преимущество при колонизации ризо- и филлопланы.

Сейчас очевидно, что любое растение заселено разнообразными и многочисленными микробными сообществами, составляющими микробиом растения-хозяина, обеспечивающий его нутриентами и определяющий его иммунный статус,

здоровье, адаптивные возможности и выживаемость. В последнее время этот термин (микробиом растения) получает всё большее распространение (Turner et al., 2013; Schlaeppli and Bulgarelli, 2015); в отдельную "среду обитания" выделяют ризосферу, эндоризосферу и филлосферу (Turner et al., 2013). Современные исследования сочетают традиционные методы микробиологии по выделению и культивированию микроорганизмов с методами молекулярной биологии (проведение ПЦР амплификаций геномной ДНК, секвенирование), а также ультрасовременными технологиями в мета-омике (метагеномика, метатранскриптомика), исследуя микробные сообщества целиком с биоинформатическим анализом больших баз данных и библиотек генов.

Одним из важнейших прикладных значений таких исследований является разработка алгоритмов и биотехнологических подходов для ведения альтернативного сельского хозяйства с использованием полезных RGPB штаммов и симбиотических бактерий, способных заменить разрушительное чрезмерное использование агрохимии, минеральных удобрений и химических пестицидов (Тихонович и Проворов, 2009; Schlaeppli and Bulgarelli, 2015). Основную роль в этом играют RGPB штаммы, стимулирующие рост и развитие растений, чьим преимуществом, в отличие от специализированных симбионтов, является то, что они не требуют компартментализации в растении и являются космополитами, способными заселять и удерживаться в различных микробных сообществах различных почв. Дополнительно, способность к азотфиксации и биосинтезу стимуляторов роста растений, преимущественно ауксинов, а также ярко-выраженные антагонистические свойства в отношении ряда фитопатогенов, служат дополнительным преимуществом.

В растениеводстве возможно использование как бактеризации семян или черенков растений чистыми культурами бактерий, так и создание на основе одной или нескольких культур комплексных препаратов для внесения их в субстрат или опрыскивания ими растений. Микробные препараты ИУК применяют в основном для стимуляции прорастания семян и увеличения образования корней; среди основных продуцентов используют ризобий, бацилл и пенибацилл, псевдомонад, а также представителей родов *Klebsiella*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Streptomyces* (Мишке, 1988; Цавкелова и др., 2006а; Тихонович и Проворов, 2009; Hayat et al., 2010; Saharan and Nehra, 2011; Maheshwari et al., 2015). Использование RGPB стимулирует всхожесть и прорастание семян, рост и урожайность взрослых растений, в том числе при стрессовых условиях воздействия не только *in vitro*, но и *in vivo*, однако, к сожалению, большинство разработок остаются лишь научными публикациями без их реального внедрения.

Учитывая всё вышесказанное, оставалось удивительным, что к моменту работы над выбранной темой исследования ничего не было известно ни о разнообразии, ни о роли микроорганизмов (за исключением грибов-микоризообразователей), которые бы заселяли ризоплану или филлоплану орхидей, в особенности уникальных эпифитных видов, предоставляющим своим микробным партнёрам разнообразные эко ниши даже внутри одного растения. Исключением и вдохновившим меня на многолетние и разносторонние исследования в этой области стала работа австралийских учёных K.G. Wilkinson (1989) с соавторами под руководством профессора Krishapalai Sivasithamparam, в которой авторы выделили несколько изолятов бактерий, заселяющих корни наземной орхидеи *Pterostylis vitata* и исследовали возможность их совместного использования с обязательным присутствием микоризного гриба.

Основным интересом для меня и моих коллег стало, прежде всего, изучение биоразнообразия и роли ассоциативных микроорганизмов эпифитных орхидей, исследование путей общения и механизмов коммуникации между партнёрами, а также выявление факторов, определяющих успешное и взаимовыгодное существование всех участников этого консорциума. Комплексная часть работы, отражающая и фундаментальный, и прикладной аспекты, посвящена изучению механизмов биосинтеза и регуляции образования микробных фитогормонов, в том числе возможности использования новых продуцентов среди грибов из рода *Fusarium*, в том числе, трансгенных штаммов. Отдельные исследования посвящены потенциальному биотехнологическому использованию трофических связей в микробном сообществе, а также экзогидролитической активности микромицетов из рода *Trichoderma* на примере их целлюлазной активности, в том числе, при биоконверсии бумажных отходов для получения биотоплива (биогаз).

Однако главным аспектом практического интереса и биотехнологической разработкой стали поиск эффективных PGPB штаммов и методологии использования бактериальных культур для семенного размножения орхидей с целью увеличения всхожести и численности проросших семян редких и исчезающих видов орхидных в искусственных условиях их воспроизведения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ²

2.1. Растения – объекты исследования

Для изучения биоразнообразия и роли ассоциативных микроорганизмов эпифитных орхидей (сем. Orchidaceae) использовали воздушные и субстратные корни, а также листья и семена растений, культивируемых в Фондовой оранжерее Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН (ГБС РАН, г. Москва), а также дикорастущих, произрастающих в провинции Фукуок (Вьетнам). Все объекты представлены здоровыми растениями с плотными, неразмягченными тканями, без визуально-различимых признаков каких-либо заболеваний. Выделение ассоциативных микроорганизмов проводили с генеративно-зрелых растений от пяти лет и старше.

² В главе изложены методы, опубликованные, в частности, в следующих научных статьях автора:

1. Цавкелова Е.А., Чердынцева Т.А., Лобакова Е.С., Коломейцева Г.Л., Нетрусов А.И. Микробиота поверхности корней орхидных // Микробиология. 2001. Т. 70. № 4. С. 567-573.
2. Цавкелова Е.А., Лобакова Е.С., Коломейцева Г.Л., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Особенности локализации ассоциативных цианобактерий на корнях эпифитных орхидей // Микробиология. 2003а. Т. 72. № 1. С. 99-104.
3. Цавкелова Е.А., Лобакова Е.С., Коломейцева Г.Л., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Ассоциативные цианобактерии, выделенные с корней эпифитных орхидей // Микробиология. 2003б. Т. 72. № 1. С. 105-110.
4. Цавкелова Е.А., Александрова А.В., Чердынцева Т.А., Коломейцева Г.Л., Нетрусов А.И. Грибы, ассоциированные с корнями орхидей в условиях оранжереи // Микология и фитопатология. 2003в. Т. 37. С. 57-63.
5. Цавкелова Е.А., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Образование фитогормонов грибами, ассоциированными с орхидными // Микология и фитопатология. 2003г. Т. 37. С. 75-83.
6. Цавкелова Е.А., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Бактерии, ассоциированные с корнями эпифитных орхидей // Микробиология. 2004. Т. 73. С. 825-831.
7. Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Botina S.G., Netrusov A.I. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin // Microbiological research. 2007a. V. 162. P. 69-76.
8. Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Klimova S. Yu., Shestakov A.I., Botina S.G., Netrusov A.I. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin // Archives of Microbiology. 2007b. V. 188. № 6. P. 655-664.
9. Tsavkelova E.A., Böhmke C., Netrusov A.I., Weiner J., Tudzynski B. Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain // Fungal Genetics and Biology. 2008. V. 45. P. 139-1403.
10. Tsavkelova E., Oeser B., Oren-Young L., Israeli M., Sasson Y., Tudzynski B., Sharon A. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species // Fungal Genetics and Biology. 2012. V. 49. № 1. P. 48-57.
11. Malakhova D.V., Egorova M.A., Prokudina L.I., Netrusov A.I., Tsavkelova E.A. The biotransformation of brewer's spent grain into biogas by anaerobic microbial communities // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2015. V. 31. № 12. P. 2015-2023.
12. Петрова Е.В., Егорова М.А., Пискункова Н.Ф., Кожевин П.А., Нетрусов А.И., Цавкелова Е.А. Анаэробные целлюлозолитические микробные сообщества, разлагающие биомассу *Anabaena variabilis* // Микробиология. – 2017. – Т. 86. – № 6. – С. 729-738
13. Прокудина Л.И., Осмоловский А.А., Егорова М.А., Нетрусов А.И., Цавкелова Е.А. Биоразложение целлюлозосодержащих субстратов микромицетами с последующей биоконверсией в биогаз // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 2. С. 200-209.
14. Pavlova A.S., Leontieva M.R., Smirnova T.A., Kolomeitseva G.L., Netrusov A.I., Tsavkelova E.A. Colonization strategy of the endophytic plant growth promoting strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Klebsiella oxytoca* on the seeds, seedlings and roots of the epiphytic orchid, *Dendrobium nobile* Lindl. // Journal of Applied Microbiology. 2017. V. 123. № 1. P. 217-232.
15. Kolomeitseva G.L., Babosha A.V., Ryabchenko A.S., Tsavkelova E.A. Megasporogenesis, megagametogenesis, and embryogenesis in *Dendrobium nobile* (Orchidaceae) // Protoplasma. 2020. V. 257. № 6. <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01573-2>

Оранжевые орхидеи:

***Dendrobium moschatum* (Buch.– Ham.) Swartz.**

Род *Dendrobium* (подсемейство *Epidendroideae*) включает более 1100 видов эпифитных орхидей, распространённых от Гималаев через Индию, Китай и Юго-Восточную Азию до Японии, Австралии, Новой Зеландии и Тасмании до островов Тихого океана (Kamemoto et al. 1999; Kumar et al. 2011). *Dendrobium moschatum* (Buch.-Ham.) Sw. – симподиальный эпифит, высотой 70-131 см. Вид впервые был описан в 1805 г. шотландским ученым Ф. Бьюкенен-Гамильтоном. Стебли длиной 30-60 см цилиндрические, сгруппированные, толстые, от прямостоячих до маятникообразных, ребристые, соединенные междоузлиями (рис. 24).



Рисунок 24. Эпифитная орхидея *Dendrobium moschatum*. Дочерние побеги с воздушными корнями (слева), генеративно-зрелое цветущее растение (справа).

Молодые псевдобульбы облиственны полностью, листья состоят из влагалищной части и зеленой листовой пластинки. Листья двухрядные, от ланцетовидных до эллипсовидных и продолговато-яйцевидных, имеют длину 8-17 см и ширину 2,0–4,5 см, расположены в верхней части стебля, сидячие, на побегах держатся около двух лет, затем опадают. Цветонос латеральный, возникающий из узлов стебля, многоцветковый, имеет поникающее соцветие с 7-14 цветками абрикосового или желто-оранжевого оттенка 5-7 см в диаметре. Цветение – в июне-июле. Корневая система состоит из корней нескольких последовательных побегов диаметром 2-3 мм. Место обитания в природе – на стволах и вершинах листопадных деревьев в условиях высокой освещенности и сильного движения воздуха от умеренных до больших высот (от 300 до 2000 м над уровнем моря) на территории Индии, Лаоса, Непала, Бутана, Бирмы, Таиланда, Камбоджи, Вьетнама и Южного Китая (Banerji and Pradhan, 1984).

В условиях оранжереи растения культивируют как горшечное растение, используя сосновую кору в качестве субстрата. Содержат в теплых влажных условиях во время

активного роста (конец весны–лето) с постепенным уменьшением температуры и влажности после того, как молодой побег разовьется полностью (начиная с октября) с содержанием в условиях прохладного сухого климата в зимний период. Растение нуждается в интенсивной освещенности: с осени до весны освещенность должна составлять 30000–40000 лк, с затенением от прямых солнечных лучей в летнее время.

***Dendrobium nobile* Lindl.**

Впервые об этом растении стало известно в Европе в начале 19 века, когда оно было описано Дж. Линдли по изображению в одной из китайских книг в библиотеке Королевского садоводческого общества Великобритании. Это эпифитная, литофитная или наземная орхидея с крупными 60-90 см прямостоячими сгруппированными побегами, которые сужаются на кончике (рис. 25) Зеленые мягкие кожистые листья держатся на побегах около двух лет и цветоносы появляются обычно из почек сбросивших листья междоузлий. Короткие цветоносы имеют 2-4 цветка диаметром 6-7,5 см. Цветки различных оттенков – от темно-лилового и насыщенно-розового до чисто белого (Benzing, 1987). Имеет широкий ареал и распространён в Южной Азии, включая Непал, Сикким, Бутан, Северо-Восточную Индию, Бирму, Таиланд, Лаос, Вьетнам, Южный Китай. Встречается в широколиственных вечнозеленых равнинных лесах или в первичных горных лесах, иногда на покрытых мхами скалах на высоте от 600 до 2000 м над уровнем моря.

Вид светолюбивый (35000 – 45000 лк) и теплолюбивый (летом 26-28°C днем и 19-20°C ночью), с прохладным сухим содержанием зимой (25-28°C днем и 9-10°C ночью). Растения в условиях оранжереи содержатся в горшках на хорошо дренированном пористом субстрате (сосновая кора).



Рисунок 25. Эпифитная орхидея *Dendrobium nobile*: цветонос с цветами (слева) и побег с листьями (справа). Фотографии представлены проф. Коломейцевой Г.Л.

***Dendrobium bigibbum* Lindl.**

Синонимы: *D. phalaenopsis* Pfitzg. (1880), *Callista bigibba* (Lindl.) Kuntze (1891); *C. phalaenopsis* (Fitzg.) Kuntze (1891); *C. sumneri* [F. Muell.] Kuntze (1891); *D. phalaenopsis* Fitzg. (1880); *D. sumneri* F. Mueller (1867); *Vappodes bigibba* (Lindl.) M.A.Clem. & D.L.Jones (2002); *V. lithocola* (D.L.Jones & M.A.Clem.) M.A.Clem. & D.L.Jones (2002); *V. phalaenopsis* (Fitzg.) M.A.Clem. & D.L.Jones (2002). Первое растение было описано Дж. Линдли в 1852 г. Таксономическая путаница с подвидами этого растения была упорядочена только в 2015 г.: выделено 3 подвида (*D. bigibbum* var. *compactum*, *D. bigibbum* var. *bigibbum*, *D. bigibbum* var. *superbum*) (Adams, 2015). В оранжерейных условиях ГБС РАН культивируется клон *D. bigibbum* var. *superbum* (рис. 26), который был нами описан в статьях под синонимичным названием *D. phalaenopsis* (Цавкелова и др. 2003а; б). Основное местообитание – северная часть Австралии полуострова Кейп-Йорк, где зимой и весной очень сухо, но температура сохраняется высокой (28-31°C) и не опускается ниже 18°C. Растет как эпифит или литофит в полуаридных зонах в условиях прямого солнечного освещения, предпочитают поселяться на кустарниках и невысоких деревьях, а также на камнях (Adams, 2015).



Рисунок 26. Эпифитная орхидея *Dendrobium bigibbum* var. *superbum*, культивируемая на блоке: цветонос (слева) и побеги с массой воздушных корней (справа), образующих "всклоченную бороду".

D. bigibbum – крупная (40–122 см) орхидея с прямостоячими веретеновидными побегами (туберидими), в нижней части которых развиваются влагалищные чешуевидные листья и зеленые продолговато-эллиптические листья длиной 8–15 см в количестве 3–8 штук на средней и верхней части побега. Цилиндрический стебель слегка раздут в основании. Цветоносы довольно длинные (20–40 см) изогнутые или горизонтальные с 8–20 цветами диаметром 3–5 см от фиолетово-малинового до пурпурно-розового цвета.

В природе *D. bigibbum* встречается также на территории Новой Гвинеи, острове Тимор, Молуккских островах и, прежде всего, в северной части штата Квинсленд Австралии. В оранжерейных условиях это растение теплого содержания [летом (29–30°C

днем и 22°C ночью) и зимой (24–26°C днем и 17–19°C ночью)], с периодом с декабря по март, во время которого растения требуют сухого светлого содержания. Обильный полив возобновляется в мае, после начала роста молодых корней и продолжается до ноября, пока не сформируется молодой побег. Общий уровень освещенности на протяжении всего года должен сохраняться на уровне не менее 30000–45000 лк. Растение культивируют в блочной культуре без субстрата, с открытыми корнями. В условиях регулярного увлажнения и подкормок неорганическими удобрениями корни наращивают большую биомассу, по весу сравнимую с общим весом побегов. Диаметр корней *D. bigibbum*, покрытых многослойным веламеном, – 2–3 мм.

***Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume**

Phalaenopsis amabilis (подсемейство *Epidendroideae*) был описан К. Линнеем в 1753 г. как *Epidendrum amabile* L., а своё современное название получил от К. Блуме в 1825. Родина – прибрежные или низкогорные дождевые тропические леса Малайского архипелага, Новой Гвинеи, Индонезии, Филиппин и Австралии. Произрастает на стволах деревьев, в густой тени и поблизости от воды, на высоте от 0 до 1500 м над уровнем моря. Это средних размеров моноподиальный эпифит или литофит. Имеет 3–5 двурядно расположенных овально-продолговатых, мясистых, кожистых, зеленого цвета листьев, до 50 см длиной и 10–12 см шириной. Псевдобульбы отсутствуют. Стебель короткий (рис. 27). Поникающий цветонос часто ветвится, соцветие кистевидное, многоцветковое, длиной до 50–120 см. Цветки диаметром до 10 см. Толстые придаточные корни развиваются в междоузлиях вдоль всей длины короткого побега, они покрыты многослойным веламеном.



Рисунок 27. Эпифитная орхидея *Phalaenopsis amabilis*: соцветие (справа) и растение в блочной (на плексигласе) культуре (справа), видны мясистые воздушные корни, листья и цветонос.

Растение культивируют в теплых условиях содержания с летней дневной температурой 22–25° С, и ночной – 18–20° С. Зимние ночные температуры также не

должны опускаться ниже 18-20⁰ С. Летом освещенность не превышает 6000–11000 лк, зимой вид нуждается в искусственном освещении. Предпочитает постоянно высокую относительную влажность воздуха и равномерный обильный полив в течение всего года. Растение содержится в блочной культуре на инертном носителе (плексиглазе) в условиях ежедневного увлажнения и высокой относительной влажности воздуха.

***Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatt. & McCann**

Acampe praemorsa (подсемейство Epidendroideae) – синонимы: ***A. papillosa*** Lindl. (1853); *Acampe excavata* Lindl. (1853); *A. wightiana* (Lindl. ex Wight) Lindl. (1853); *Cymbidium praemorsum* (Roxb.) Sw. (1799); *Epidendrum praemorsum* Roxb. (1795); *Gastrochilus carinatus* (Griff.) Schltr. (1913); *G. papillosus* Kuntze (1891); *G. praemorsus* (Roxb.) Kuntze (1891); *Rhynchostylis papillosa* Heynh. (1846); *Saccolabium papillosum* Lindl. (1833); *S. papillosum* Dalzell & Gibson (1861); *S. praemorsum* (Roxb.) Hook.f. (1890); *S. wightianum* (Lindl. ex Wight) Hook.f. (1890); *Sarcanthus praemorsus* (Roxb.) Lindl. ex Spreng. (1826); *Sarcochilus praemorsus* Spreng. (1828); *Vanda fasciata* Gardner ex Lindl. (1853); *V. wightiana* Lindl. ex Wight (1851). Впервые вид был описан в 1795 г. как *Epidendrum praemorsum* Roxb., впоследствии был неоднократно описан повторно и получил множество синонимов и до последнего времени был широко известен в культуре как *Acampe papillosa* Lindl. Под этим названием растение было описано и в наших статьях (Цавкелова и др. 2003а; б; в; Tsavkelova, 2011).

Это моноподиальный эпифит с прямостоячими или ветвящимися и изгибающимися побегами около 60 см и более, часто с удлиненными междоузлиями. Листья неравно-двулопастные, мясистые, кожистые, матовые, продолговато-ланцетные, имеют длину 7-12 см и ширину 1,5–2,0 см (рис. 28). Цветонос боковой, формируется в пазухах листьев и намного их короче (от 2 до 2,5 см длиной) и имеет 4-6 цветков диаметром около 1,0 см. Время цветения – сентябрь-ноябрь. В природе произрастает на стволах деревьев на высоте от 200 до 950 м над уровнем моря, тене- и воздухолюбив (Banerji and Pradhan, 1984). Мощные корни диаметром 4-7 мм развиваются по всей длине побега поочередно, покрыты многослойным веламеном; верхний слой (эпивеламен) не несет корневые волоски. Сухие воздушные корни эпифитных орхидей имеют серебристый цвет, поскольку мертвые клетки веламена отражают свет. При увлажнении корень приобретает зеленоватый цвет, делая видимыми хлоропласты, находящиеся в паренхиме.

В природе растение распространено в Индии, Китае, Юго-Восточной Азии, на островах Индийского океана. В оранжерее выращивают как горшечное растение,

используя в качестве субстрата сосновую кору. Нуждается в теплом или умеренном температурном режиме, относительной влажности воздуха 60–70% и освещенности 24000–36000 лк. Зимняя ночная температура соответствует 18-20°C, в это время растение нуждается в минимальном поливе.



Рисунок 28. Эпифитная орхидея *Acampe praemorsa*: горшечная культура (сверху), побеги с воздушными корнями (указаны стрелками) с серебристым веламеном и зелёными фотосинтезирующими кончиками. Соцветие (внизу).

Безлистные эпифитные орхидеи

Одними из не менее редких являются безлистные эпифитные тропические орхидеи, которые не имеют фотосинтезирующих листьев и длинных стеблей, а вся фотосинтетическая активность происходит в их воздушных корнях. Это небольшие многолетние моноподиальные травянистые растения. Стебель очень короткий, простой, около 4–12 мм в длину, покрытый радиально направленными серебристо-зелеными корнями. Листья представлены редуцированными, чешуевидными образованиями. Эти растения, в том числе и особенности их биологии, являются малоизученными. Род *Chiloschista* Lindl. (подсемейство Epidendroideae) относится к трибе вандовых, к субтрибе *Aeridinae* включает 20 видов, распространенных на Индийском субконтиненте и Гималаях, в Китае до Тайваня, Таиланде до Индонезии, Австралии, новой Гвинеи, Фиджи и Микронезии (Averyanov et al., 2018). Род *Microcoelia* (подсемейство Epidendroideae) также относится к трибе Вандовых, к субтрибе *Aerangidinae* и включает около 26 видов

(Carlsward et al., 2006). В качестве объектов исследования были выбраны *Microcoelia moreauae* L. Jonss., в природе встречающаяся в Африке и на о. Мадагаскар, а также *Chiloschista parishii* Seidenf., заселяющая Юго-Восточную Азию, Индию и Гималаи. В условиях оранжереи ГБС РАН растения выращивают на древесных блоках (рис. 29): зимняя температура составляет днем 20-22°C и ночью 18-20°C, а летняя – днем 24-29°C и ночью 20-22°C, при относительной влажности воздуха 70-80 %.

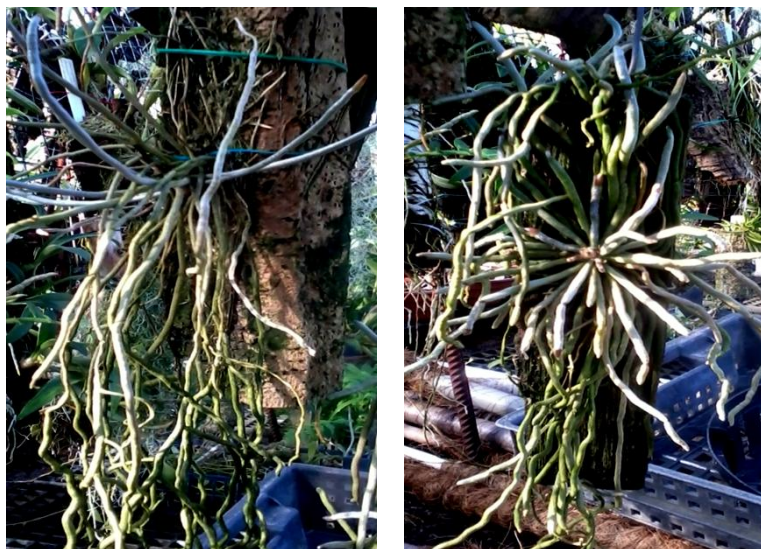


Рисунок 29. *Chiloschista parishii* (слева) и *Microcoelia moreauae* (справа), формирующие многочисленные воздушные корни.

Дикорастущие орхидеи:

***Pholidota articulata* Lindl.**

Это растение также принадлежит к подсемейству Epidendroideae и в природе произрастает в полулистопадных и вечнозеленых низкогорных влажных и горных лесах Непала, Тибета, Индии, Китая, Мьянмы, Таиланда, Лаоса, Камбоджи, Вьетнама, а также в первичных лесах Индонезии на островах Калимантан, Сулавеси и Суматра на высоте от 300 до 2000 м над уровнем моря. Локализация изучаемого растения – провинция Фукуок, Вьетнам. Это эпифитное или литофитное симподиально нарастающее травянистое растение с двулистными псевдобульбами. Листья около 6,5-11 см в длину и 2-3,7 см в ширину, от яйцевидных до линейно-ланцетных, заостренные (рис. 30). Образует тонкие воздушные корни и верхушечные многоцветковые соцветия. Цветки диаметром 1,25 см, белые с желтым пятном на губе и красноватой чашечкой пыльника. Корневая система развита довольно слабо и состоит из субстратных корней и воздушных корней, формирующихся в основании каждого симподиально нарастающего

вертикального побега. Веламен многослойный, эпивеламен может развивать короткие корневые волоски.



Рисунок 30. Эпифитная орхидея *Pholidota articulata* (фотография предоставлена проф. Г.Л. Коломеецовой).

***Paphiopedilum appletonianum* (Gower) Rolfe**

Это наземная орхидея, также произрастающая в провинции Фукуок (Вьетнам), принадлежащая к подсемейству циприпедиевых (Cypripedioideae), была также нами изучена и взята для сравнительного анализа разнообразия ассоциативных микроорганизмов, заселяющих корни дикорастущих орхидных. *Paphiopedilum appletonianum* – представитель подсемейства венериных башмачков (Cypripedieae), встречается в Таиланде, Лаосе, Вьетнаме, Камбодже и на о. Хайнань (Китай). Это некрупное (высотой до 30 см) корневищно-розеточное вечнозеленое, симподиально нарастающее растение с пятнистыми листьями и прямостоячим цветоносом, несущим единственный крупный цветок (рис. 31). Растет в лесной подстилке, укореняясь в гумусе и разложившихся растительных остатках на высоте 600–700 м над уровнем моря. Корни длинные и толстые, формируются в количестве трёх-десяти штук (Banerji and Pradhan, 1984). Эпивеламен имеет корневые волоски, а веламен и коровая паренхима состоят из 10 и 13 слоев клеток соответственно. Корни сохраняют свою функциональность в течение 1-2 лет дольше.



Рисунок 31. Наземная орхидея *Paphiopedilum appletonianum*. Фотография представлена проф. Г.Л. Коломейцевой.

Таким образом, в работе по исследованию ассоциативных микроорганизмов, колонизирующих корни тропических орхидей, использовали субстратные и воздушные корни эпифитных облиственных горшечных орхидей *D. moschatum* и *A. praemorsa*, воздушные корни эпифитных оранжерейных *P. amabilis*, *D. bigibbum* и дикорастущей *Ph. articulata*, а также субстратные корни дикорастущей наземной орхидеи *P. appletonianum*. Кроме того, была проанализирована ризоплана воздушных корней оранжерейных безлистных эпифитов – *Ch. parishii* и *M. moreauae*. В экспериментах по изучению влияния бактерий на прорастание семян орхидей использовали семена, полученные от *D. moschatum* и *D. nobile*, а состав филлобактерий изучали на примере листьев *D. moschatum*. Антимикробную активность исследовали на примере фитоэкстрактов, полученных из *D. moschatum* и другого оранжерейного эпифита, – *Pholidota chinensis* Lindl.

2.1.1. Отбор образцов корней и листьев растений

Возраст корней и листьев, используемых для выделения ассоциативных микроорганизмов, – от года и старше. Образцы частей растений, а также субстрата отбирали с помощью стерильных инструментов и помещали в стерильные флаконы. Образцы получали с 2-4 растений по 3-5 штук с каждого в зависимости от вида. С дикорастущих орхидей – наземной *P. appletonianum* и эпифитной *Ph. articulata* отбирали по 2-3 корня с каждого растения.

Субстратные корни очищали от субстрата. Отдельные навески (1 г) субстратных и воздушных корней отмывали в стерильной водопроводной воде (100 мл) при 100 об/мин в течение десяти мин, затем корни разрезали на фрагменты от пяти до десяти мм и перемешивали их для получения усредненных образцов (Цавкелова и др., 2001; Цавкелова

и др., 2003в; 2004). Листья подвергали аналогичной обработке. Часть образцов высушивали до постоянного веса при температуре 105°C. Опыты по выделению микроорганизмов проводили либо в день отбора проб, либо на следующий день (образцы хранили при 4°C). В зависимости от вида растения и целей эксперимента, усреднённые навески образцов корней делили на несколько частей: *i*) для выделения ассоциативных микроорганизмов традиционным способом на питательных средах с целью получения отдельных колоний культивируемых микроорганизмов, *ii*) для поверхностной стерилизации с последующим выделением эндофитных микроорганизмов, *iii*) для выделения ДНК с целью идентификации микроорганизмов с помощью молекулярно-генетических методов анализа микробных сообществ.

2.2. Микроорганизмы – объекты исследования

С целью изучения ассоциативных микроорганизмов, колонизирующих корни тропических орхидей, были проведены исследования, направленные на изучение биоразнообразия и состава популяций различных групп микроорганизмов (микромикетов, а также хемогетеротрофных и фототрофных бактерий), заселяющих ризоплану и внутренние ткани корней этих растений.

2.2.1. Выделение культивируемых бактерий ризопланы и филлопланы орхидных

Для выделения гетеротрофных бактерий из ризопланы корней, после получения усреднённой навески, их в стерильных условиях разрезали на фрагменты 1-2 мм и растирали в ступке для получения гомогенной суспензии, из которой готовили ряд десятичных разведений из расчёта 1 г на 100 мл стерильной водопроводной воды или фосфатно-солевого буфера, pH=7,3. Посевной материал (0,05-0,1 мл) наносили на агаризованные питательные среды, в которые для предотвращения роста грибов добавляли нистатин в количестве 50 мкг/мл. В качестве питательных сред (состав приведён ниже) использовали органические: МПА и МПА, разведённый в 2 раза, триптон-соевый агар (ТСА, Oxoid, UK), крахмал-аммиачный агар, глицерин-пептонную среду; полу- и синтетические среды: Чапека с глюкозой и модифицированную среду Чапека с дрожжевым экстрактом (ЧДЭ), среду для выделения метилотрофов и среду Эшби для азотфиксаторов; среду R2A (Difco Laboratories, США). Выделение культивируемых бактерий с корней орхидей описано, например, в следующих работах: Цавкелова и др. 2004; Tsavkelova et al., 2007a; Tsavkelova et al., 2016. Состав сред приведён в разделе 2.11.

Инокулят, засеянный на поверхность плотных сред в чашках Петри инкубировали в темноте при 30°C до появления отдельных различимых колоний. Чистые бактериальные культуры получали из отдельных колоний путем их пересева на питательные среды. Чистоту полученных культур проверяли микроскопическим контролем.

Для выделения **эндофитных бактерий** очищенные и разрезанные на фрагменты около 0,5-1,0 см корни выдерживали в течение пяти-семи мин в 20%-ом растворе "Белизна" (действующее вещество – гипохлорит натрия), после чего отмывали последовательно три раза по пять мин в дистиллированной воде. Приготовленные суспензии, полученные гомогенизацией образцов корней в физрастворе или водопроводной воде, высевали (аликвота 0,1 мл) на агаризованные питательные среды из исходной суспензии и её десятичных разведений. Дальнейшую инкубацию образцов проводили, как описано выше.

Для выделения ассоциативных **бактерий филлопланы *D. moschatum*** листья разрезали на фрагменты 1 см и перемешивали для получения усреднённой навески. Затем для приготовления суспензии использовали неотмытые и предварительно отмытые в стерильной водопроводной воде (10 мин при 130-150 об/мин) листья. Потом листья гомогенизировали и готовили исходную суспензию (1г /100 мл) и её десятичные разведения, после чего высевали (0,1 мл) на поверхность агаризованной среды. Для выделения дрожжей, колонизирующих филлоплану, нитстатин к среде ТСА не добавляли. Посевы инкубировали при 30°C до появления отдельных колоний (колониеобразующих единиц, КОЕ), которые затем отсеивали для получения чистых культур.

2.2.1.1. Другие культуры гетеротрофных бактерий, использованные в исследованиях

Дополнительно была использована бактериальная культура, исходно предоставленная д.б.н., вед. науч. сотр. ГБС РАН, д.б.н. Г.Л. Коломейцевой, определенная нами ранее как *Bacillus pumilus* (Коломейцева и др., 2005). Штамм *Pseudomonas fluorescens*-32-gfp был предоставлен д.б.н., вед. науч. сотр. каф. микробиологии А.М. Семёновым. Изначально *P. fluorescens* был выделен из корней пшеницы и трансформирован с введением плазмиды VSP61TIR, несущей маркерный ген gfp (van Bruggen et al., 2008).

Дикий штамм другого микроорганизма, *Klebsiella* sp., предоставленный к.б.н. Е.А. Блинковым, был одним из штаммов, исходно выделенных из ризосферы растений огурца (Емцев, 1994). Нами была проведена идентификация и трансформация (Tsavkelova et al.,

2017) этого штамма плазмидой, несущий репортерный ген GFP (green fluorescent protein). Для получения GFP-меченого штамма *Klebsiella* использовали плазмиду, несущую gfp репортерный ген (pPROBE KT-Kan), которая была любезно предоставлена профессором Steven Lindow, Berkley, USA (Miller et al., 2000). Плазмидную ДНК изолировали из культуры клеток *E. coli*, культивируемых 18 ч в среде LB, содержащей канамицин в соответствии с протоколом производителя "Qiagen miniprep kit". Для последующей трансформации компетентные клетки *Klebsiella*, полученные в соответствии с модифицированным протоколом, описанным ранее (Merrick et al., 1987), оттаивали в руках после замораживания и оставляли на льду, смешивая с 1 мкг плазмиды pPROBE KT-Kan, затем замораживали в жидком азоте в течение 1 мин и повторяли процедуру замораживания-оттаивания трижды, после чего содержимое переносили в 3 мл теплой среды LB не содержащей антибиотик, инкубировали 2 ч при 32°C, переносили на LB-агар с 100 мкг/мл канамицина и инкубировали в течение 18 ч. В контрольном варианте роста колоний не отмечали (клетки, не содержащие GFP плазмиды), в то время как выросшие колонии трансформантов обладали сине-зелёной флуоресценцией при освещении синим светом. Хранение трансформантов проводили с добавлением DMSO в соответствии с описанной ранее методикой (Chung et al., 1989). Меченые GFP штаммы микроорганизмов (*K. oxytoca* и *P. fluorescens*) культивировали на LB агаре с добавлением канамицина (100 мкг/мл для *K. oxytoca* и 60 мкг/мл для *P. fluorescens*) при 30°C.

2.2.1.2. Определение биомассы и количества жизнеспособных бактериальных клеток

Оценку роста бактерий проводили по показателям оптической плотности (ОП, optical density, OD) в динамике роста культур в жидкой среде на спектрофотометре, $\lambda=590$ нм. Контролем служили вода или неинокулированная среда. Для определения биомассы бактерий или мицелия грибов, выращиваемых в жидкой питательной среде, использовали метод доведения биомассы до постоянного значения высушиванием при 105°C и взвешиванием с точностью до $\pm 0,0002$ г (Егоров, 1995). Эту же методику применяли при определении биомассы корней и листьев орхидных, которые предварительно промывали в проточной воде, промокали фильтровальной бумагой и разрезали на фрагменты 3-5 мм.

Для учета бактериальных клеток, способных образовывать колонии на агаризованных питательных средах, применяли чашечный метод Коха (Егоров, 1995). Для учета КОЕ (колониеобразующие единицы) использовали десятичные разведения исходных суспензий субстратных и воздушных корней (на примере эпифитных орхидей

D. moschatum и *A. praemorsa*). Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычисляли по формуле $M = a \cdot 10^n / V$, где M – количество клеток в 1 мл; a – среднее число колоний; V – объем суспензии, взятый для посева, мл; 10^n – коэффициент разведений. Пересчет проводили на 1 г нативной (сырой) и сухой биомассы корней (или листьев).

Для учёта филлобактерий использовали неотмытые (нативные) и предварительно отмытые в стерильной воде (10 минут при 150 об/мин) листья *D. moschatum*, которые после отделения от растения разрезали на фрагменты 1 см². Затем растительный материал растирали в стерильной ступке и готовили исходную суспензию из расчёта 1г листьев (вес влажной биомассы) / 100 мл. Также использовали десятичные разведения исходной суспензии в 10 (10^{-1}) и 100 (10^{-2}) раз. Аликвоту (0,1 мл) наносили на поверхность агаризованных сред ЧДЭ и R2A (Difco Laboratories, США). Подсчёт КОЕ проводили по вышеприведённой формуле. Во всех анализах использовали 3-5 повторностей и вычисляли среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение.

2.2.2. Выделение ассоциативных цианобактерий

Для выделения ассоциативных цианобактерий (с корней *D. bigibbum*, *P. amabilis* и *A. praemorsa*, а также безлистных орхидей *C. parishii* и *M. moreauae*) 10-15 фрагментов предварительно отмытых в стерильной водопроводной воде корней (0,5-1 см длиной) помещали в колбы на 50 мл с 30 мл азотсодержащей и безазотистой среды BG_N-11 (Rippka et al., 1979), инкубировали при комнатной температуре (весенне-летний период) или при $23 \pm 2^\circ\text{C}$ (осенне-зимний период) и освещенности 700 лк с фотопериодом 12 часов в течение двух месяцев (Цавкелова и др., 2001; Цавкелова и др., 2003а; б). Для получения отдельных изолятов цианобактерий накопительные культуры несколько раз пересекали в новые BG-11 или BG₀, как жидкие, так и агаризованные (8 г/л агара) среды, извлекая отдельные колонии или гормогонии для дальнейшего их подращивания.

2.2.3. Выделение ассоциативных микромицетов

Микромицетов, заселяющих ризоплану орхидных, выделяли с воздушных и субстратных корней *A. praemorsa* и *D. moschatum*, с воздушных корней эпифита *P. amabilis* (Цавкелова и др., 2003г), а также с корней дикорастущих вьетнамских орхидей: наземной *P. appletonianum* и эпифитной *Ph. articulata*, используя неповрежденные корни здоровых генеративно зрелых растений. Корни очищали от субстрата, отмывали в стерильной воде при 100 об/мин в течение пятнадцати мин. Затем получали усреднённые образцы навесок для выделения грибов, заселяющих ризоплану, и эндофитов. Для стерилизации корней использовали в 0,1%-ый раствор HgCl₂, в котором корни находились

две мин, после чего их отмывали несколько раз в дистиллированной воде. Затем корни разрезали, получая фрагменты длиной пять-десять мм; их перемешивали для получения усредненного образца и раскладывали стерильно, вдавливая в агаризованную среду, предварительно разлитую в чашки Петри (Smith, 1966; Wilkinson et al., 1989). Культивирование проводили при 25°C до появления визуально различимых колоний, которые затем пересевали для получения чистых культур.

Для выделения микромицетов использовали питательную среду Чапека-Докса (состав приведён в разделе 2.11). Дополнительно в работе были использованы микромицеты из коллекции лаборатории проф. B. Tudzynski (Westfälische Wilhelms-Universität, Münster, Germany): дикий тип штамма *Fusarium fujikuroi* MPC IMI58289 (Commonwealth Mycological Institute, Kew, United Kingdom) и штамм m567 (Fungal Culture Collection, Weimar, Germany), а также штаммы *F. proliferatum* D-02945 и D-00502 (Malonek et al., 2005a,b), исходно предоставленные J. F. Leslie (Kansas State University, USA), фитопатогенные для растений кукурузы *F. verticillioides* 149 (Oren et al., 2003), патоген растений томата *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 42-87 (Di Pietro and Roncero, 1998) из коллекции микромицетов лаборатории проф. A. Sharon (Department of Molecular Biology and Ecology of Plants, Tel Aviv University, Tel Aviv). Культуры грибов поддерживали на минеральной среде Чапека-Докса или на полной среде CM (complete medium, Pontecorvo et al., 1953; состав приведён в разделе 2.11).

2.2.4. Хранение микроорганизмов

Хранение чистых культур гетеротрофных бактерий проводили несколькими способами: при 4°C с периодическими пересевами на различные питательные среды (ЧДЭ, МПА, R2A и др.); на коротко скошенных (под углом 45°C) агаризованных средах под стерильным вазелиновым маслом при комнатной температуре; при 4°C в растворе 25% глицерина; а также при 4°C в виде лиофильно высушенных суспензий микроорганизмов. Для этого к культуре микроорганизмов стерильно добавляли обезжиренное молоко с глюкозой (5%) в качестве криопротектора, после чего замораживали при -70°C или в жидком азоте, и в замороженном виде лиофилизировали на аппарате "Labconco" (США) при глубине вакуума 4.9 Па и температуре конденсатора -25°C в течение 24 ч.

Культуры микромицетов хранили с помощью периодических пересевов, культивируя на среде Чапека-Докса и среде СА (сусло-агар) при 4°C, а также в

стерильном растворе 25% глицерина в виде кусочков мицелия (5 мм), вырезанных с агаризованной питательной среды, также при 4°C.

2.3. Идентификация микроорганизмов

Для установления таксономической принадлежности микроорганизмов использовали ряд методов, направленных на определение цитолого-морфологических, культуральных, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических особенностей и характеристик идентифицируемых культур.

2.3.1. Идентификация бактерий

Идентификацию культивируемых бактерий проводили с учетом морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков по общепринятым стандартам (Добровольская и др., 1990; Нетрусов, 2005; Bergey's Manual 2 ed., 2001-2012): помимо микроскопирования культур для определения морфологии клеток и их подвижности, были проведены тесты по определению Грам-принадлежности, на наличие оксидазы, каталазы, способности к денитрификации, использованию углеводов, к росту при различных pH, окислительно-ферментативный тест на использование глюкозы, тест на наличие фенил-аланин дезаминазы, определение амилалитической и протеолитической активности, а также тест на кислотоустойчивость, на способность к спорообразованию. Для изучения спороношения и мицелиеобразования у актиномицетов была также использована агаризованная (3,0 г/л) среда, содержащая овсяную муку – 20,0 (г/л); pH – 7,0-7,2.

Определение родовой принадлежности выделенных культур цианобактерий проводили, используя следующие определители (Bergey's Manual 2 ed., 2001-2012; Komarek et al., 2014; Neustupa and Škaloud, 2008; Hauer et al., 2014; Watson et al., 2014; Casamatta and Hašler, 2016; Hentschke et al., 2017), учитывая особенности роста цианобактерий на плотной и жидкой питательных средах, морфологические характеристики, присутствие у трихомов чехла, ветвление трихомов (у нитчатых цианобактерий), образование (в том числе, одноклеточными видами) микро- или макроколоний, образование гормогониев и их подвижность, морфологию вегетативных клеток в трихомах и гормогониях, наличие и расположение акинет и гетероцист, способность к азотфиксации и др. Микроскопирование проводили в нативных ("раздавленная капля") препаратах, а также с использованием сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) JSM – 6380LA (Jeol, Japan).

После выделения отдельных колоний гетеротрофных бактерий на питательных средах, их откалывали на плотные питательные среды, с целью дальнейшего культивирования, а также в пробирки эппендорф с жидкими средами ТСБ или ЧДЭ для подраживания и лиофилизации биомассы для последующего выделения НК и секвенирования. Вторым подходом использовали, когда некоторые изоляты (например, *Porphyrobacter* или *Hymenobacter*) при последующих пересевах на плотных средах не наращивали достаточно биомассы. Для учета колоний (КОЕ) и количественного учета бактериальных популяций использовали среды TSA, R2A и ЧДЭ, при высевах на которые из десятичных разведений исходной суспензии на чашках вырастало от 10 до 50 колоний.

Для идентификации гетеротрофных бактерий с помощью 16S рРНК было использовано несколько методик. Для этого геномную ДНК выделяли из биомассы бактериальных клеток после их центрифугирования (6000-8000g, 15-20 мин) и процедуры замораживания (-20°C) – оттаивания. В ряде случаев дополнительно использовали гомогенизатор Mini-Bead Beater-8 (BioSpec Products, USA). ДНК экстракцию проводили стандартным фенол-хлороформным методом (Маниатис и др., 1984) или с помощью готовых наборов, например, Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA), в соответствии с требованиями производителя. ПЦР амплификацию проводили с реагентами фирмы "Fermentas" или "Синтол" (Москва, РФ) на амплификаторе "Master cycler gradient" (Eppendorf, FRG) или "Biometra Tpersonal" (Germany). Все олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе (табл. 1), были синтезированы на основе 16S rRNA *E. coli*. Праймеры 8F и 926R комплементарны позициям 8-27 и 909-926, соответственно; с помощью пары праймеров B63f и B1387r амплифицировали почти полный участок гена 16S рибосомальной РНК.

В работе использовали различные варианты условий для проведения амплификации ДНК. Реакционная смесь для ПЦР содержала: i) 20 мкл реакционной смеси с содержанием 1,5 мМ MgCl₂ или ii) 25 мкл реакционной смеси с 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого праймера, 0,25 мМ dNTPs и 0,06 U мкл Taq полимеразы (Синтол, Россия). Геномную ДНК добавляли в количестве 10 нг. Условия проведения ПЦР реакции: 3-5 мин при 94°C, 30-35 циклов при 90°C 20-30 сек, 30 сек при 55-57°C и 1 мин при 72°C с заключительной инкубацией в течение 4 мин при 72°C. Температура отжига и элонгации отличалась в зависимости от выбранных праймеров. Около 2-10 мкл ПЦР продукта отбирали для анализа электрофоретически в 1%-ом агарозном геле в TBE или TAE буфере при 80-150 V; DNA Gene Ruler 1 Kb DNA ladder (MassRuler DNA Ladder Mix, Thermo scientific, Germany) использовали, как контроль для определения размера полученных ампликонов. Полученные полосы вырезали из геля и очищали с помощью GenElute Minus

EtBr Spin Columns (Sigma) или ПЦР продукт очищали с помощью Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Секвенирование очищенных фрагментов 16S rDNA проводили по методу Сэнгера (Sanger et al., 1977) с использованием "CEQ DTCS kit" на секвенаторе CEQ-8000 (Beckman Coulter, Germany) или ABI 3730 (Applied Biosystems), используя BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Также использовали сервис компании Евроген (Москва).

Таблица 1. Праймеры, использованные для идентификации изолятов бактерий.

Название праймеров	Последовательность (5'-3')	Ссылки
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Dunbar et al., 1999
926R	CCGTCAATTCCTT	Liu et al., 1997
B63f	CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC	Marchesi et al., 1998
B1387r	GGGCGGWT GTA CAA GGC	Marchesi et al., 1998
UNIV 515F	GTGBCAGCMGCCGCGGTAA	Kublanov et al., 2009
БАСТ907R	CCGTCAATTCMTTTGAGTTT	Muyzer et al., 1998
16F27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Yakimov et al., 1998
16R1492	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	Yakimov et al., 1998

Анализ полученных последовательностей проводили с помощью различных программ, включая Vector NTI (Invitrogen): ContigExpress, AlignX program. Для сравнительного анализа и поиска гомологичных последовательностей использовали преимущественно базы NCBI (National Center for biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) и Ribosomal Database Project (RDP, <http://rdp.cme.msu.edu>).

2.3.1.1. Идентификация штамма *Klebsiella* sp.

Дикий тип штамма *Klebsiella* sp. был ранее идентифицирован как *K. planticola*, основываясь на его морфологических и биохимических характеристиках (Блинков и др., 2014). В этой работе была проведена его молекулярно-генетическая ре-идентификация с помощью секвенирования 16S рРНК. Условия проведения анализа, реагенты и протоколы выделения ДНК, проведение ПЦР и секвенирования описаны в статье Tsavkelova et al., 2016, для чего использовали пару праймеров B63f - B1387r (табл. 1). Предварительный анализ полученных последовательностей был сделан по программам Lasergene (DNASTAR) и VectorNTI (Invitrogen). Поиск гомологичных последовательностей и сравнительный анализ проводили по базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information website; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

2.3.2. Профилирование бактериального сообщества *Dendrobium moschatum*

Для идентификации бактерий, заселяющих воздушные и субстратные корни эпифитных орхидей, был изучен состав ассоциативных бактериальных популяций с помощью молекулярно-биологических методов на примере корней и листьев *D. moschatum*. Профилирование микробных сообществ, в том числе на базе платформы Illumina, позволяет провести идентификацию микроорганизмов без необходимости их выделения в чистые культуры, что даёт возможность учёта, например, некультивируемых бактерий.

Кроме анализа ДНК, выделенной из нативного растительного материала (корни, листья), были также исследованы сообщества культивируемых бактерий, ДНК которых были получены после смыва колоний, выросших на питательных средах при высеве аликвоты инокулята (0,5 мл) из исходной суспензии растительного материала и её 10^{-1} разведения. Биомассу микроорганизмов смывали с не менее чем 6 повторностей (отдельные чашки Петри), после чего объединяли в единую пробу. Биомассу осаждали центрифугированием при 12000g (5 мин) и хранили при -20°C до выделения ДНК. Для изучения состава бактериального сообщества проводили выделение тотальной ДНК из корней и листьев *D. moschatum*. Для исследования сообщества филлопланы, использовали неотмытые и предварительно отмытые в стерильной воде в течение 10 минут (150 об/мин) листья. Воздушные и субстратные корни предварительно также отмывали в стерильной водопроводной воде в течение 10 минут. Затем биомассу измельчали, нарезаая стерильным лезвием на фрагменты около 2-5 мм, после чего 400-500 мг биомассы помещали в пробирку с 500 мкл буфера TNE (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 8) и добавляли 200 мг стеклянных шариков (диаметр 0,1 мм), – с их помощью суспензию гомогенизировали на Mini beadbeater-1 ("BioSpec Products", USA). Затем к смеси добавляли 50 мкл 20% SDS, перемешивали на вортексе и оставляли на 40 мин при 50°C, добавляли нагретый до 60°C 4% СТАВ и инкубировали 45 мин при 60°C. Пробы центрифугировали 5 мин при 6 000g, супернатант переносили в стерильную пробирку эппендорф и проводили процедуру выделения ДНК фенол-хлороформным методом, для чего к супернатанту добавляли смесь фенола и хлороформа (1:1), перемешивали и центрифугировали при 4°C десять мин при 10000g. К верхней фракции добавляли в отдельной пробирке равный по объёму смесь хлороформа и изоамилового спирта (24:1), после чего перемешивали и центрифугировали в том же режиме. Верхнюю фракцию отбирали, прибавляли равный объём 5М ацетата калия, добавляли 0,6 V пробы

изопропанола, перемешав, не встряхивая, оставляли на 40 мин. После центрифугирования (10 мин при 10000*g* и 4°C) супернатант сливали, добавляли 500 мкл 70% этанола, перемешивали на вортексе. Пробы центрифугировали повторно в тех же условиях, супернатант сливали и процедуру повторяли. Высушенный осадок растворяли в 50 мкл стерильной MQ воды.

Для создания библиотеки генов амплифицировали область V3-V4 16S рРНК с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina, USA) с настройкой 251 циклов в соответствии с инструкцией производителя Illumina MiSeq System. Для создания библиотеки генов амплификацию проводили с использованием готовой реакционной смеси Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Россия) в присутствии 0,5 мкл интеркалирующего красителя EvaGreen (Biotium, USA) и TaqF полимеразы (Amplisens, Russia). В реакционную смесь вносили 5 нг выделенной ДНК. Использовали следующие праймеры:

16S	Amplicon	PCR	Forward	Primer	(MiSeq341F)	5'-
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'						
и		16S	Amplicon	PCR	Reverse	(MiSeq805R) 5'-
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'						

(Illumina) и готовую реакционную смесь Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Россия) с 0,5 мкл интеркалирующего красителя EvaGreen (Biotium, USA), TaqF полимеразы (Amplisens, Russia) и 5 нг ДНК. Каждый образец амплифицировали в двух повторностях, которые затем объединяли в один и анализировали на 2%-ном агарозном геле. Для выделения ампликонов из геля и их очистки использовали Standard Cleanup Gel Extraction Kit (Evrogen, РФ). Концентрацию ДНК измеряли на Qubit 2.0 Fluorometer с dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit ("Life Technologies", USA). Равные количества ампликонов объединяли для создания единой библиотеки и разводили 10 mM Tris pH 8.5 до количественного содержания 4 нМ в соответствии с инструкцией производителя. Щелочную и температурную денатурацию созданных библиотек с последующим объединением с внутренним контролем (PhiX Control Kit v3, Illumina) и нанесение образцов проводили в соответствии с Illumina Sample Preparation Guide, используя MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles; Illumina). Секвенирование на платформе Illumina MiSeq проводили на базе "ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора" по описанной ранее методике (Speranskaya et al., 2018). Анализ полученных файлов проводили, используя сервер для метагеномного анализа MG-RAST (<http://matagenomics.anl.gov>).

2.3.3. Идентификация цианобактерий

Для идентификации цианобактерий использовали следующие определители: Берджи (Bergey's Manual, 2001-2012) и Комарека (Komarek et al., 2014), а также статьи: Neustupa and Škaloud, 2008; Watson et al., 2014; Hauer et al., 2014; Casamatta and Hašler, 2016; Hentschke et al., 2017, учитывая морфолого-культуральные и физиолого-биохимические признаки выделенных культур, в том числе форму клеток и их строение, размеры отдельных клеток и колоний, наличие или отсутствие гетероцист, бaeоцитов и акинет, присутствие и подвижность гормогониев, расположение трихомов, наличие чехлов, образование микро- или макроколоний. Для исследований с помощью микроскопии использовали световые и сканрующий электронный микроскопы.

Для выявления разнообразия популяций цианобактерий в микробном сообществе безлистных орхидей был использован метод денатурирующего градиентного гелевого электрофореза. Методика описана нами ранее (Tsavkelova et al., 2018) в соответствии с протоколом (Muyzer and Smalla, 1998).

Для проведения ПЦР использовали несколько пар праймеров (Boutte et al., 2006). Первая пара праймеров: CYA359F (5'-GGGGAATTTTCCGCAATGGG-3') и 23S30R (5'-CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT-3'). Для последующей ПЦР для лучшего разделения ампликонов на геле при проведении ДГТЭ (денатурирующий градиентный гелевый электрофорез) анализа к праймеру CYA359F добавляли олигонуклеотидный участок, содержащий Г и Ц основания (так называемый, "Г-Ц кламп"): CYA359FGC (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGGGGAATTTTCCGCAATGGG-3'). В пару к этому праймеру использовали CYA781Ra (5'-GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT-3') для преимущественного выявления нитчатых и гетероцистсодержащих форм цианобактерий или CYA781Rb (5'-GACTACAGGGGTATCTAATCCCATT-3') для преимущественного выявления одноклеточных форм цианобактерий (Nübel et al., 1997; Boutte et al., 2006). В качестве матрицы использовали геномную ДНК, которую выделяли с помощью набора FastDNA Soil Microbe DNA Kit (MP Biomedicals, США), для чего цианобактериальные сообщества, выросшие на средах BG-11 и BG₀, центрифугировали пяти мин при 12000g. Полученную биомассу хранили при -20°C. Затем к ней добавляли 500 мкл буфера TNE и 200 мг бусин (диаметр 0,1 мм) и проводили гомогенизацию на установке "Mini beadbeater-1" (BioSpec Products, США). Экстракцию ДНК проводили в соответствии с инструкцией производителя (MP Biomedicals, США).

Амплификацию проводили на приборе "GeneAmp PCR System 9700" (Applied Biosystem, Германия). Для ПЦР использовали полимеразу на Phusion High Fidelity (Thermo Fisher). ПЦР-смесь (25 мкл) содержала 5,0 мкл 5×Phusion буфера, 2,5 мкМ MgCl₂, 0,5 мкМ каждого dNTP, 0,06 U/мкл Taq полимеразы и 5-10 нг ДНК. Условия проведения первой ПЦР: первичная денатурация 98°C – 30 с, далее 25 циклов при 98°C – 10с, 65°C – 30 с, 72°C – 1 мин, конечная элонгация при 72°C – 7 мин. Условия проведения второй ПЦР: первичная денатурация 98°C – 1 мин, далее 25 циклов при 98°C – 10с, 65°C – 30 с, 72°C – 30 с, конечная элонгация при 72°C – 7 мин.

Разделение ампликонов проводили на устройстве TV400-DGGE ("SCIE-PLAS", UK) в течение 18 ч при 70В и 60°C с использованием 6%-ного акриламид-бисакриламидного геля и денатурирующих агентов [7М мочевины (Helicon) и 40%-ый формамид (Amresco)] для создания 45–65%-го градиента в 0,5×TAE буфере; в раствор, не содержащий денатурирующих агентов, вносили 8% полиакриламида и заливали верхним слоем в камеру. Затем гель помещали в стерильную MilliQ воду и окрашивали с помощью SYBR Green I ("BioDye", Россия). Фореграмму просматривали при 470 нм; полосы вырезали и помещали в 50 мкл стерильной водой (MilliQ), оставляя на ночь при 4°C для элюирования ДНК, наличие которой затем подтверждали в 1,5%-ном агарозном геле. Затем ДНК очищали, используя набор Cleanup Standard ("Евроген", Россия). дальнейшее секвенирование образцов проводили в компании "Евроген" (Россия). ПЦР проводили с праймерами CYA359F и эквимольной смесью CYA781Ra или CYA781Rb. Сравнительный анализ полученных последовательностей проводили с помощью базы данных BLAST (Национальный центр биотехнологии, NCBI веб-сайт <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

2.3.4. Идентификация микромицетов

Идентификацию грибов по их морфофизиологическим характеристикам проводили с использованием определителей (в том числе, Ellis, 1971; Билай, 1977; Domsch et al., 1980; Gerlach and Nirenberg, 1982). Для более детального определения филогенетической принадлежности ассоциативных грибов использовали секвенирование участка гена 18S рРНК. Для идентификации дрожжей, колонизирующих филлоплану *D. moschatum*, использовали универсальные эукариотические праймеры для участка гена 26S rRNA – NL (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G-3') и LS2 (5'-ATTCCCAAACAACCTCGACTC-3') (Cocolin et al., 2000). ПЦР

реакцию проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл: 2,5 мкл 10х буфера, 2,5 ммоль раствора $MgCl_2$, 2,5 ммоль каждого из dNTP, 10 ммоль каждого праймера и 5 ед/мкл Taq-полимеразы (Синтол, Россия) на приборе "Biometra Tpersonal" (ФРГ).

Для выделения ДНК из культур ряда мицелиальных грибов, их выращивали на целлулоидной подложке-мембране (Alba Gewürze, Germany), наложенной на поверхность плотной питательной среды СМ в течение трёх суток при 28°C. После того, как микромицеты сформируют колонии, мицелий соскребали с подложки, замораживали в жидком азоте и лиофилизировали в течение 24 ч для последующего выделения ДНК в соответствии с ранее описанной методикой (Doyle and Doyle, 1990). Плазмидную ДНК получали, используя несколько наборов: Jetstar Plasmid Kit (Genomed, Bad Oeynhausen, Germany), (Qiagen, Germany), или Sigma GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma), в соответствии с протоколом производителей. РНК выделяли также из лиофилизированного мицелия, используя набор "RNAagents total RNA" (Promega, Germany), GenElute Mammalian или Total RNA Miniprep kit (Sigma).

Для амплификации использовали 50 мкл смеси, содержащей 25 нг ДНК, 10 нг каждого праймера, 0,2 mM dNTP и Taq полимеразу (1U; BioTherm™ DNA Polymerase, Germany). Для проведения ПЦР использовали следующую схему: 4 мин при 94 °C, после чего 36 циклов при 94 °C 1 мин, 55–60 °C 1 мин и 70 °C 1–3 мин. Время отжига и элонгации подбирали в зависимости от температуры плавления для каждого праймера и длины амплифицируемого фрагмента.

Для разграничения микромицетов внутри рода *Fusarium* использовали праймеры для участка ITS (internal transcribed spacer), а также CPR (cytochrome P450 reductase; Malonek et al., 2004, 2005a). Для филогенетического анализа принадлежности *F. proliferatum* штамма ET1 использовали праймеры для участка IGS1 (intergenic spacer), TEF (частичная последовательность ДНК фактора элонгации трансляции 1 α 1) и Tub (частичная последовательность ДНК гена β -тубулина). Праймеры приведены в таблице 2. Филогенетический анализ CPR и ITS последовательностей нуклеотидов проводили с пакетом программ "PHYLIP" (Phylogeny Inference Package; Felsenstein, 1989), используя в качестве меры достоверности (максимального правдоподобия) построений бутстреп из 100 повторностей. На основании полученных данных были сформированы консенсусные деревья (Tsavkelova et al., 2008).

Таблица 2. Праймеры, используемые для идентификации грибов (Tsavkelova et al., 2008).

Locus	Primer	Sequence 5'→3'
CPR	P138-5	AAC CCC TAC ATT GCC CCT ATC
	P138-6	TCG GCA ACC AAA GAA CAA GAG TG
ITS	ITS1	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G
	ITS2	CCT CCG CTT ATT GAT ATG CTT AAG
IGS1	NL11	CTG AAC GCC TCT AAG TCA G
	CNS1	GAG ACA AGC ATA TGA CTA C
	iNL11g-IGS	AGG CTT CGG CTT AGY GTC TTA G
	iCNS1-IGS	TTT CGC AGT GAG GTC GGC AG
	GCNS7R	GTT GTT AAG AGG CGC GGT GTC
	GCNS7F	GAC ACC GCG CCT CTT AAC AAC
	GCNS3	CTG CAA AGC TGT ACA GAG GG
	IGS1-Fus	CCT GCG CCT ACC CTG GAC CTA CC
Tub	benat1	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT
	benat2	TAG TGA CCC TTG GCC CAG TTG
	benat22	TCT GGA TGT TGT TGG GAA TCC
	Tub-Fus	CCC TTC GGT CAG CTC TTC C
TEF	TEF1	ATG GGT AAG GGA RGA CAA GAC
	TEF2	GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT
	TEF22-i	AGG AAC CCT TAC CGA GCT C

2.4. Методы микроскопии

Для изучения локализации и распределения микроорганизмов, в том числе эндофитных, на корнях, семенах и проростках орхидных, а также для изучения морфологии при идентификации ряда выделенных микромицетов и бактерий, использовали несколько техник.

2.4.1. Световая микроскопия

С помощью световой микроскопии исследовали нативные препараты микроорганизмов, такие как "раздавленная капля" и "висячая капля" для определения подвижности бактерий, а также фиксированные и окрашенные растворами фуксина или метиленовой сини препараты в соответствии с традиционными методиками их приготовления (Егоров, 1995; Нетрусов и др., 2005).

Для определения локализации микромицетов на поверхности и внутри корней орхидных использовали срезы нативных корней и корней, фиксированных и дифференцированно окрашенных по методу Стоутона (Барыкина и др., 2000). Для наблюдения за прорастающими семенами орхидей также использовали нативные препараты, которые просматривали в световом микроскопе «Лабкомплекс» типа МБС-10.

2.4.2. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) и флуоресцентная микроскопия

КЛСМ микроскопирование нативных препаратов проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Nikon A1 CLSM с объективами x20/0.45 и x40/1.3 и лазером с длиной волны 488 и 532 нм для зелёного и оранжевого каналов, соответственно. Изображения получали с помощью 4-полосного детектора DU4 с 525/50 или 595/50 фильтрами эмиссии; Z-серии получали от 40 до 120 оптических срезов от 1.3 до 7.2 мкм толщиной. Обработку изображений проводили с использованием программы ImageJ.

Также использовали флуоресцентный микроскоп Zeiss Axioskp 2 для регистрации свечения от YFP и dsRED флуоресцентных белков, гены, отвечающие за биосинтез которых вводили в составе плазмиды при трансформации в ранее полученный в лаборатории проф. А. Шарона (Tel Aviv University) штамм-реципиент *Fusarium proliferatum* ET1 (Tsavkelova et al., 2012). Для детекции флуоресценции YFP использовали фильтры Zeiss (№ 46, возбуждение 520 нм, эмиссия 535 нм, жёлто-зелёная флуоресценция), а для dsRED – набор фильтров Zeiss № 20 (возбуждение 546 нм, эмиссия 575-640 нм, красная флуоресценция) и камеру Zeiss Exiocam. Измерение относительной флуоресценции YFP и dsRED проводили на 50 спорах, а для обработки изображения использовали программу ImageJ.

Для изучения эмбрионального развития семян орхидных использовали семена *Dendrobium nobile* Lindl. из коллекции ГБС РАН. Растения выращивали в оранжерее с умеренным температурным режимом (зимняя ночная температура 14-16°C), относительная влажность воздуха 70–80%, естественное освещение. Опыление искусственное. Фрагменты плодов разного возраста помещали в 2%-ный параформальдегид в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,4 при 4°C для фиксации и последующего хранения до момента использования.

Семязачатки окрашивали на предметном стекле в течение 1–2 ч во влажной камере. Также использовали нефиксированные семязачатки для окрашивания раствором флуоресцеин диацетатом (50 мкг/мл в 50%-ом глицерине, Sigma-Aldrich, США). По окончании инкубации препараты несколько раз отмывали дистиллированной водой на предметном стекле, помещали в 50%-ный глицерин, накрывали покровным стеклом и хранили при 4°C до момента использования. Автофлуоресценцию клеточных структур и тканей изучали на фиксированных неокрашенных препаратах, заключённых в 50%-ный

глицерин. Полученные препараты просматривали на конфокальном микроскопе *Olympus FV1000D* при возбуждении лазерами с длиной волны 405 нм, 473 и 560 нм в комбинации или по отдельности в соответствии с поглощением использованного красителя.

2.4.3 Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Для изучения поверхности и срезов корней орхидных в сканирующем электронном микроскопе использовали фиксацию в 2%-ном глутаровом альдегиде на буферном растворе Милонига (Millonig, 1961) в течение 30 мин. Другой фиксирующий раствор использовали для изучения корней, листьев, а также семян и проростков *D. nobile*, обработанных культурами бактерий. Образцы фиксировали 30 мин в 2,5% растворе глутарового альдегида в фосфатном буфере (0,1 М, pH=7.2). После фиксации обезвоживание материала проводили в водных растворах этилового спирта возрастающих концентраций (30%, 50%, 70%, 80% и 96%). Образцы выдерживали в каждом из растворов в течение 1 часа, после чего помещали в абсолютный спирт, в смесь этилового спирта и ацетона в соотношениях 3:1, 1:1 и 1:3 в течение часа для полного обезвоживания. Затем образцы выдерживали ночь в ацетоне, после чего высушивали в критической точке CO₂ на приборе "HCP-2", напыляли золото/палладий на приборе "Eiko IB-3" (Hitachi, Япония) и просматривали в сканирующих микроскопах 1830I (Amray, США) или JSM – 6380LA (Jeol, Japan) на базе межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ.

2.4.4 Трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия

Для выявления локализации эндофитов, колонизирующих проростки орхидных, растения также фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида в фосфатном буфере (0,1 М, pH 7.2), постфиксацию проводили в 1% OsO₄, промывали дистиллированной водой, обезвоживали в растворах этанола 30% и 60% (Pavlova et al., 2017). Образцы затем обрабатывали 2%-ным спиртовым раствором (70%) уранила ацетата в течение 18 часов. После заключительной дегидратации в абсолютном ацетоне их заключали в эпоксидную смолу, используя смесь смолы (Epon 812) и отвердителей – ангидрида додецилсукцината (DDSA) и метил-надик ангидрид (MNA) в соотношении 13:8:7, с добавлением 1 части катализатора (2, 4-динитрофенол). После высушивания при 60°C в течение 18 часов образцы нарезали алмазным ножом на установке LKB Ultratome V, выдерживали в

растворе цитрата свинца по Рейнолдсу и изучали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM – 100B (Jeol, Japan).

2.5. Оценка прямой рост-стимулирующей активности микроорганизмов

В качестве прямого способа воздействия ассоциативных микроорганизмов на рост и развитие растения-хозяина мы исследовали способность грибов и бактерий к биосинтезу основных фитогормонов – стимуляторов роста растений.

2.5.1. Колориметрическое определение содержания индольных веществ (ауксинов) в культуральной жидкости микроорганизмов

Определение содержания ключевого ауксина, индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), образуемого культурами бактерий и грибов, проводили колориметрическим методом с реактивом Сальковского (Gordon and Weber 1951; Gunasekaran and Weber, 1972). Для этого микроорганизмы выращивали в жидких питательных средах с добавлением D,L- или L-триптофана (Трп) в качестве индуктора биосинтеза ИУК. В зависимости от целей эксперимента, экзогенный триптофан вносили в количестве 50, 100, 200 или 400 мкг/мл. Для культивирования бактерий, посевной материал для засева культивировали в течение 2-3 суток и добавляли в количестве 10% от объема среды. Культивирование проводили в течение 7-10 дней при 28-30°C на качалке (180-200 об/мин), измеряя в динамике содержание индолов в культуральной жидкости, для чего аликвоту (1 мл) отбирали из культивационных флаконов (колб) и центрифугировали при 8000g в течение 10 мин. К одной части супернатанта приливали 1 часть свежеприготовленного реактива Сальковского. Пробирки инкубировали при 30-32°C в темноте до развития розово-вишнёвой окраски и затем измеряли при OD₅₃₀ нм на приборе Ultrospec II spectrophotometer (LKB Biochrom, Cambridge, UK). Контролем служила неинокулированная среда с добавлением реактива. Калибровочные кривые строили на основе серийных разведений стокового 100 мМ раствора ИУК (ICN или Sigma-Aldrich). Все эксперименты проводили в 3-5 повторностях. Результаты представлены средним арифметическим ± стандартная ошибка (или стандартное отклонение).

Некоторые штаммы бактерий для определения уровня образуемых ауксинов в зависимости от состава среды и источника азота культивировали на средах, содержащих органический, нитратный или аммонийный источники азота. Для этих целей использовали питательную среду LB и минеральную среду ЧДЭ с нитратным азотом. Кроме того,

использовали базовую среду (K2-N0) состава (г/л): K_2HPO_4 – 0.5; KH_2PO_4 – 0.3; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.1; NaCl – 0.75; $CaCl_2 \times 6H_2O$ – 0.03; сахароза – 6.0; раствор микроэлементов по Фёдорову – 1 мл. К минеральной "аммонийной" модификации этой среды (K_2-NH_4) добавляли дрожжевой экстракт (0,1 г) и $(NH_4)_2SO_4$ (1,5 г), а к "нитратной" модификации (K_2-NO_3) – дрожжевой экстракт (0,1) и $NaNO_3$ (1,5 г). Безазотистую (базовую) среду использовали для культивирования diaзотрофного штамма *Klebsiella*. Определение содержания индольных соединений на этих средах проводили, как описано выше.

При культивировании микромицетов, их в течение 5-7 дней подращивали на агаризованной питательной среде Чапека-Докса или СМ, затем фрагменты (около 3-6 мм) колонии вносили в качестве посевного материала из расчёта 2 см² на 50 мл среды и инкубировали в течение 1-3 недель при 25°C в темноте на шейкере (180-200 об/мин). К средам также добавляли экзогенный триптофан. Анализ содержания ауксинов проводили, как описано выше.

Реактив Сальковского и методику колориметрического определения содержания индольных соединений также использовали при проведении экспериментов по изучению деградации (потребления) экзогенных ИУК или индолил-3-ацетамида (ИАМ, ICN или Sigma-Aldrich). ИУК добавляли в жидкую среду культивирования бактерий (ЧДДЭ) в количестве 0.1, 1.0, 10.0 или 100.0 мкг/мл. Исходный раствор ИУК (1.0 мг/мл) стерилизовали фильтрованием (диаметр пор мембранного фильтра 0,2 мкм). Содержание ауксинов в культуральной жидкости измеряли, как было описано выше.

Для изучения способности к биоконверсии ИАМ микромицетами и некоторыми бактериями с образованием в качестве конечного продукта ИУК, индол-3-ацетамид (Sigma-Aldrich) также добавляли к среде культивирования микроорганизмов и проводили анализ его потребления, как описано выше.

2.5.2. Тонкослойная хроматография микробных фитогормонов

Для определения наличия **ауксинов**, их разнообразия и установления интермедиатов биосинтеза ИУК микроорганизмами проводили тонкослойную хроматографию (ТСХ) в нескольких её модификациях. Для этого в зависимости от целей эксперимента однократно или в динамике (каждые 24 часа) отбирали 1-6 мл культуры бактерий или грибов, выращенных в жидких питательных средах, центрифугировали при 8000g 10 мин, КЖ переносили в новые пробирки и доводили pH среды с помощью 1N HCl

до значения 2,8-3,0. Затем добавляли этилацетат (1:1 или 1:2 по объему) и интенсивно встряхивали в течение пяти минут, после чего оставляли до четкого разделения двух фаз. Отбирали верхнюю фазу, и после удаления этилацетата к сухому веществу добавляли 30 мкл метилового спирта. Аликвоту переносили на силикагелевые пластины Macherey-Nagel KG (Germany) или F₂₅₄ пластины (Merck, Germany), после чего разделяли с использованием смеси хлороформ : этилацетат : формиат (50:40:10) или смеси этилацетат : изопропанол : нашатырный спирт (45:35:20). Хроматограммы просматривали в ультрафиолетовом свете, очерчивали границы пятен, равных или близких по показателю R_f метчикам, в качестве которых использовали спиртовые растворы стандартных индольных соединений (ICN, Германия или Sigma-Aldrich, USA) – ИУК, ИАМ, индолил-3-пировиноградная кислота (ИПвК), индолил-3-лактат (ИЛА). Матричные растворы стандартов ИУК, ИАМ, ИПвК и ИМК готовили в концентрации 87,6 мг, 87,1 мг, 101,6 мг и 102,6 мг, соответственно, и растворяли в 5 мл этанола. Использовали 100-кратные разведения этих растворов. Идентификацию индольных веществ проводили либо в УФ свете, либо, после просмотра пластины окрашивали с помощью реактива Эхмана при термической обработке (нагревание до 90°C горячим воздухом). Реактив Эхмана получали путем смешивания одной части реактива ван Урка и трех частей реактива Сальковского, приготовленного с использованием серной кислоты (Ehmann, 1977). Реактив ванн Урка, г/л: п-диметиламинобензальдегид – 1,0 г; HCl конц – 50 мл; этанол – 50 мл. Реактив Сальковского, г/л: FeCl₃ × 6H₂O – 1.015 г; H₂O дист – 250 мл; H₂SO₄ конц – 150 мл. После окрашивания сравнивали R_f и цвет пятен с метчиками. В некоторых случаях, для более четкого разделения индольных компонентов, проводили хроматографию в другой системе растворителей с последующей рехроматографией. Тонкослойную хроматографию проб проводили сначала в системе н-гексан : этилацетат : изопропанол : ледяная уксусная кислота в соотношении 40:20:5:1 (по объему). Затем пластины просматривали в УФ, в опытных образцах отмечали пятна, соответствующие по R_f метчикам. Соответствующие пятна соскребали в пробирки эппендорф и экстрагировали с помощью 800 мкл метанола. После перемешивания на вортексе в течение 10 мин эппендорфы оставляли на 1 час в темноте, супернатант затем переносили в новые пробирки. После того, как весь растворитель испарился, осадок разводили в 30 мкл метанола и снова наносили на пластины. Рехроматографию проводили в той же фазе или в системе изопропанол:нашатырный спирт (10%) в соотношении 10:2 (по объему) с теми же метчиками, после чего пластины просматривали под УФ и окрашивали с помощью реактива Эхмана, как описано выше.

Для тонкослойной хроматографии **гибберелловых кислот** штаммы микромицетов выращивали в течение 7 суток на качалке (190 об/мин) при 28°C в 100 мл среды "0% ICI" (Geissman et al., 1966) или среды OPM (optimized production medium), содержащей 6% подсолнечного масла, 0,05% (NH₄)₂SO₄, 1,5% кукурузного экстракта (Sigma–Aldrich, FRG) и 0.1% KН₂РO₄. После центрифугирования при 8000*g* 10 мин супернатант переносили в новую пробирку, pH КЖ доводили до 2.8 с помощью 1 н HCl, затем 800 мкл КЖ смешивали с двойным объемом этилацетата, 5 минут перемешивали на вортексе. После разделения фаз и удаления (выпаривания) этилацетатной фракции, сухой осадок растворяли в 20 мкл метанола. Пробы разделяли на силикагелевых пластинах F₂₅₄ plates (Merck, FRG) в системе растворителей этилацетат:хлороформ:ледяная уксусная кислота (60:40:5 по объему). В качестве метчиков использовали ГК₃, ГК₄ и ГК₇ –гибберелловые кислоты (ГК, gibberellic acid GA, Merck, FRG). Пластины просматривали в УФ при 326 нм, отмечали пятна с R_f, соответствующей метчикам.

Для определения присутствия **цитокининов** в КЖ микроорганизмов, pH водной фракции доводили с помощью 1 н NaOH до значения 7,0, затем проводили экстракцию равными объёмами *n*-бутанола (Рубин, 1978; Tien et al., 1979). Смесь интенсивно встряхивали в течение 5 мин. и оставляли до четкого разделения фаз, после чего *n*-бутанол удаляли в потоке воздуха. Сухой остаток растворяли в 50 мкл этилацетата. Аликвоту 20 мкл наносили на силикагелевую пластину (Sorbfill, Россия) с УФ индикатором и хроматографировали в системе *n*-бутанол:ацетат:вода в соотношении 12:3:5 (по объему). Хроматограммы высушивали и проводили детекцию в ультрафиолетовом свете, отмечая полученные полосы и рассчитывая их R_f. В качестве метчиков использовали препараты кинетина и зеатина (ICN, ФРГ).

2.5.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ, high performance liquid chromatography, HPLC) проводили для идентификации ауксинов и гиббереллинов у некоторых из наиболее активных продуцентов. Для идентификации интермедиатов биосинтеза ИУК у бактерий, микроорганизмы культивировали в 100 мл жидкой среды (ЧДЭ) с экзогенным триптофаном (200 мкг/мл), затем центрифугировали при 7000*g* 15 мин. Супернатант концентрировали до 5-10 мл под вакуумом, доводили pH до 2.8 с помощью 1 н HCl, трижды экстрагировали этилацетатом (1:2, по объему), перемешивая в течение десяти мин. Этилацетатную фракцию удаляли, осадок растворяли в 500 мкл

абсолютного метанола центрифугировали при 7000g в течение 10 мин. Аликвоту (10 мкл) наносили на колонку Luna C18 (250 мм, 4.6 мм²) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) с УФ детектором (254 нм). Использовали подвижную фазу вода:ацетонитрил:ледяная уксусная кислота (40:60:1 по объему) с pH 2.5, профильтрованную через фильтр (0,2 мкм), со скоростью 0,5 мл/мин и давлением 7,5 МПа. Время удержания пиков сравнивали с таковым для аутентичных метчиков (ИУК, ИАМ, ИПвК, ИАА, ИМК, ИАН), добавленных к питательной среде и экстрагированных по идентичной схеме. Матричный раствор метчиков содержал 200 мкг/мл каждого компонента. Количественную оценку проводили сравнением высоты и площади пиков, используя программу “Ecochrom” (Elsico, РФ).

Для идентификации ИУК и ИАМ у некоторых представителей из рода *Fusarium*, микромицеты выращивали в 50 мл жидкой среды Чапека-Докса. После проведения пробоподготовки (как описано выше) и экстракции с этилацетатом полученный сухой осадок растворяли в 750 мкл 20% метанола, образцы фильтровали через фильтры с диаметром пор 0.22 мкм. Аликвоту (10 мкл) наносили на колонку Eclipse XDB C18 (150 мм, 4.6 мм²) с УФ детектором (280 нм). В качестве подвижной фазы использовали градиентный раствор 25-100% (по объему) MeOH:вода, содержащий 2% уксусной кислоты, в течение 35 мин со скоростью 1 мл/мин. В этих условиях, скорость удержания составляла для ИАМ и ИУК 6,5–7,2 и 15,8–17,6 мин, соответственно. Все эксперименты включали три повторности и были проведены не менее трёх раз (Tsavkelova et al., 2012).

Для идентификации **гибберелловых кислот (ГК)** использовали HPLC (ВЭЖХ) анализ, а также газовую хроматографию, совмещенную с масс спектрометрией (GC-MS) по методике, описанной ранее (Gaskin and MacMillan, 1992; Urbanova et al., 2013), при которой идентификация и количественный подсчет ГК проводили по их дериватам – летучим метиловым эфирам ГК. Для HPLC анализа ГК экстрагировали из 20 мл КЖ после 7 сут культивирования микромицетов на 10% ICI (6 mM NH₄NO₃). Для экстракции использовали SepPak C18 картриджи (Waters GmbH, FRG), ГК элюировали с помощью 2 мл 20% ацетонитрила (ACN; LGC/Promochem GmbH, FRG). Измерения количеств ГК с помощью HPLC проводили на оборудовании Merck-Hitachi System (Merck KGaA, FRG), состоящей из градиентного насоса (L-7100), автосэмплера (L-7200) и диодного детектора Diode Array Detector (L-245). Использовали колонку Lichrospher 100 RP-18 column (5 mm; 250 mm; 64 mm; Merck KGaA) и следующие растворители: фаза А: 0,05% H₃PO₄ (Merck KGaA), pH 3 и фаза В: ацетонитрил. Градиентный форез включал: 15 мин 15% фазы В; 20 мин 40% фазы В; 2 мин 15% фазы В. Полученные данные анализировали, используя ZChrom Elite Version 3.3.2 SP1 (Scientific Software, Inc.). Количественный анализ

содержания ГК₃ проводили по калибровочной кривой, построенной с учётом различных разведений 1 мг/мл стандарта ГК₃ (DKSH GmbH, FRG), пересчитывая затем содержание ГК₃ на 1 л КЖ.

2.6. Определение природы бактериального матрикса

Определение углеводной природы капсул и межклеточного матрикса бактерий проводили качественно с 2,3,5-трифенилтетразолием (Кочетков, 1967). Для этого в пробирку помещали 1 мл суспензии культуры бактерий, биомасса которых была выращена в течение 2–3 суток на среде МПА с глюкозой. Добавляли 0,5 мл свежеприготовленного 0,3% водного раствора 2,3,5-трифенилтетразолия бромистого и 0,5 мл 2 н раствора NaOH. Нагревали на кипящей водяной бане до появления вишневого окрашивания, и подкисляли для остановки реакции 0,5 мл раствора 2,0 н уксусной кислоты. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при 490 нм.

Определение кислой (полианионной) природы матрикса проводили с цетавлоном (Кочетков, 1967). На предметное стекло помещали каплю теплой культуры микроорганизмов и добавляли каплю подогретого до 40–50°C реактива цетилтриметиламмония бромистого. При наличии в капсуле и матриксе кислых групп отмечали формирование хлопьев и тяжелой образующегося комплекса с цетавлоном. Если количество кислых групп в матриксе было незначительно, образование комплекса наблюдали при микроскопировании препарата с увеличением 30× или 100×.

Для определения содержания белка и углеводов во внеклеточном бактериальном матриксе микроорганизмы культивировали на МПА с 2% глюкозы, смывали стерильным физиологическим раствором с помощью стеклянного шпателя до получения слабвязкого раствора и центрифугировали при 10000 g 15 мин; надосадочную жидкость диализовали в течение 12 часов. В пробе определяли содержание углеводов фенол-серным методом (Dubois et al., 1956) и белка – по методу Лоури (Нетрусов и др., 2005).

Для оценки степени полимерности внеклеточных полисахаридов проводили их осаждение разными объемами 96%-го этилового спирта. К одному объему супернатанта, полученному вышеописанным способом, добавляли два объема 96% этанола при перемешивании (оба компонента охлаждали до 4–5°C). Смесь оставляли на холоду до формирования осадка полисахаридов. При отсутствии осадка проводили доосаждение полимеров еще двумя объемами 96% этанола.

2.7. Молекулярно-генетические методы исследования механизмов биосинтеза фитогормонов микромицетами

Для изучения молекулярно-генетических основ биосинтеза ауксинов и гиббереллинов у представителей рода *Fusarium*, выделенных среди ассоциативных грибов эпифитных орхидей, были использованы различные методы анализа наличия, экспрессии и регуляции активности генов, ответственных за биосинтез фитогормонов. В работе использовали различные подходы и методики после выделения ДНК или РНК из лиофилизированного мицелия исследованных грибов (см. раздел 3.2).

2.7.1. Изучение наличия кластера генов, ответственных за биосинтез гибберелловых кислот

Праймеры, используемые для амплификации генов, входящих в кластер генов, необходимых для биосинтеза ГК, приведены в таблице 3.

Таблица 3. Праймеры, используемые для идентификации генов, ответственных за биосинтез ГК (с изменениями по Tsavkelova et al., 2008).

Primer	Sequence (5'→3')
cps/ks - RT- for	GTGTAGCTGGATCATAGCGACACTCCTG
cps/ks - RT- rev	CCATTGGCCCTGGCTAAGTTTCCC
ggs2-F	TCATGGCTGAACAACAGATCTCCAACC
ggs2-R	CTTCCAAAACCAGCATCTTTTGTGCGC
des-F	ATGCCTCATAAAGATAATCTTCTTGAATCGCC
des-R	CCACTACCAGAATGCAATGAACTTGGTCTC
P450-4-F	ATGAGTAAGTCCAACAGCATGAACAGTACC
P450-4-R	ATCATTCATCTCTCAGTGATCGCTTCC
P450-3-F	ATTGTGGAGCATGAAGACAAGTTTCAGG
P450-3-R	TCATCTCCTTCGCATCTCAAGACCAGC
orf3-Fus2 P450-4-Fus3 P450-4-Fus1 P450-1-Fus3 P450-1-Fus3	GCT ATA GTA GCA GTG ACA CTC TTG GGC GTT TGG GTA TGG GAA ATA CG GGC TGG TAC TGT TCA TGC TGT TGG GGT AAT ATG ACC GGT TTC TCA C GGC GTC ATC CTA CCC AAG AAC A
P450-2-Fus4	TTT TAC CGG TGC CGA ACA GTG A
P450-2-Fus5	GCT TCG GCC ACG GTC AG
Fprol-ggs2-F1	GAC TTC TTC TGC AAA TAT GGG CAA
Fprol-ggs2-R1	GCA GCC ATA GGA TGC ATA TGA AT
cps-ET1-R1	TGA GTC TTG AGG AGA TAG TGG AAG C
ggs2-ET1-R1	GTT GCT CAG CCA TGA TGA TAT TTG GG
ggs2-ET1-R2	ATG GTA TTA TCT TTT CCT TGG C
cps-ET1-R2	TTG CCA CTT GGA TAG GTT AGA ATT TGC

Праймеры для амплификации некоторых генов *F. proliferatum* ET1 и *F. fujikuroi* конструировали на основе опубликованных полногеномных последовательностей *F. verticillioides* и *F. oxysporum* (<http://www.broadinstitute.org>). Для проведения RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction, ПЦР с обратной транскрипцией) использовали Reverse-iT 1st Strand Synthesis Kit (ABgene, UK). Изолированную из мицелия тотальную РНК обрабатывали ДНКазами, одноцепочечную кДНК амплифицировали из 1 мкг РНК. Для полуколичественного анализа, аликвоты кДНК отбирали после 25, 30 и 35 циклов ПЦР и анализировали с помощью электрофореза.

Для **трансформации микромицетов рода *Fusarium*** проводили приготовление протопластов и трансформацию, следуя ранее описанной методике (Tudzynski and Tudzynski, 1996). Аликвоту (50 мкл) 10^7 протопластов трансформировали, используя 10 мкг кольцевого комплементационного вектора pCos1 (Bömke et al., 2008b), несущего полный кластер ГК генов. Регенерацию трансформированных протопластов осуществляли при 28°C на среде CRG (complete regeneration agar), содержащей 0,7 М сахарозы, 0,05% дрожжевого экстракта, 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, с добавленным 120 мкг/мл гигромицина В (Calbiochem, FRG) и/или нурсеотрицина (Werner BioAgents, Germany). Культивирование проводили в течение 7-8 сут. Из гигромицин-устойчивых колоний затем выделяли нуклеиновые кислоты (ДНК и/или РНК), как было описано выше. Для трансгенных штаммов проводили ПЦР с соответствующими диагностическими праймерами.

При изучении биосинтеза гиббереллинов у *F. proliferatum* для конструирования комплементационного вектора pggs2-ET1, фрагмент длиной 2,0 kb гена *ggs2* амплифицировали на основе геномной ДНК, полученной из ассоциированного с орхидеей штамма *F. proliferatum* ET1, используя праймеры Fprol-ggs2-F1 и Fprol-ggs2-R1 (табл. 3). ПЦР фрагмент клонировали в вектор pCR 2.1-TOPO (Invitrogen). Для клонирования при работе с плазмидами использовали штамм *Escherichia coli* Top10F' (Invitrogen). Полученный таким образом вектор, например, pggs2-ET1, использовали при ко-трансформации вместе с вектором pNR1 (Malonek et al., 2004), несущим устойчивость к нурсеотрицину. Также в работе использовали космиду pCos1 (Bömke et al., 2008a; b), содержащую полный кластер ГК генов (на основе штамма *F. fujikuroi* m567), включая некодирующие 5' и 3' регионы (около 40 kb) и экспрессионную кассету устойчивости к гигромицину (P. Linnemannstöns and B. Tudzynski, неопубликованные данные). Эту космиду использовали для трансформации *F. oxysporum*.

Для изучения **экспрессии генов** микромицеты выращивали в течение 3 сут на качалке (190 об/мин) при 28°C в жидкой среде 20% или 10% ICI (Geissman et al., 1966). Затем мицелий собирали фильтрованием, отмывали стерильной водой от среды и

переносили 1,5 г (вес влажной биомассы) в 50 мл безазотной среды ICI (0% NH_4NO_3) или ICI, содержащей 5,0 г/л NH_4NO_3 (100%). После двух часов инкубации в этих условиях мицелий собирали фильтрованием, отмывали стерильной дистиллированной водой, замораживали в жидком азоте и лиофилизировали. Геномную ДНК выделяли, как описано ранее, плазмидную ДНК выделяли, используя набор Qiagen (Qiagen, FRG). РНК изолировали, используя набор "RNA gents total RNA" (Promega, FRG).

При проведении **Саузерн-блот анализа** геномную ДНК обрабатывали рестриктазами, например, HindIII, PstI, и проводили электрофорез; геномную ДНК, обработанную рестрикционными эндонуклеазами, переносили на Hybond N+ фильтры (Amersham-Pharmacia, FRG). Пробы, меченые ^{32}P готовили, используя ранее описанную методику (Sambrook et al., 1989). Фильтры гибридизовали при 65°C в 5х концентрированном растворе Денхарда, содержащего 5% декстран сульфата натрия, и промывали при той же температуре сначала в 2х концентрированном SSPE (1х SSPE – это 0,18 М NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 и 1 mM EDTA [pH 7.7]) с 0,1% SDS, затем 1х концентрированном SSPE с 0,1% SDS.

Для проведения **Нозерн-блоттинга** следовали ранее описанной методике (Church and Gilbert, 1984). После выделения РНК с помощью кита "RNA gents total RNA" (Promega, FRG), и проведения электрофореза в денатурирующем геле (1% агарозы, 16% формальдегид) с использованием MOPS буфера (0,4 М MOPS pH 7, 0,1 М NaAc; 0,01М ЭДТА, pH 8), гель промывали с использованием ДЭПК (диэтилпирокарбонат) обработанной воды и 10 X SSC (1,5 М NaCl, 0,15М цитрата натрия, pH 7). Затем РНК с геля переносили на мембрану (Hybond N+; Amersham) в растворе 10 X SSC в течение 18 ч. Затем её кратко отмывали в 2 X SSC, высушивали на воздухе и нагревали 2 ч при 80°C для фиксации на ней РНК. Зонд рРНК готовили с использованием рестриктазы HindIII, чтобы получить фрагмент 10Kb с последовательностью, гомологичной 18S rRNA, который затем очищали после проведения электрофореза. Зонды (ампликоны) метили радиоактивным ^{32}P ($[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$). Имеющуюся мембрану смачивали в 6 X SSC и гибридизовали в течение 12-16 ч при 65°C в Church буфере (0,5М фосфат натрия буфер, pH 7,2; 7% SDS; mM ЭДТА, pH 8) с зондом. После проведения гибридизации мембрану промывали 20-30 мин в растворе 40 mM фосфатного буфера (pH 7,2) с 5% SDS и 1 mM ЭДТА, а затем при 65°C 30 мин в том же растворе с 1% SDS. Для одной полосы геля использовали 15-20 мкг тотальной РНК для анализа. Для контроля гибридизации использовали пробы рДНК *F. fujikuroi*.

2.7.2. Идентификация генов, ответственных за биосинтез ИУК по индолил-3-ацетамидному пути

Для изучения молекулярно-генетических механизмов функционирования генов, ответственных за биосинтез индолил-3-уксусной кислоты по ИАМ пути, использовали ДНК, выделенную по стандартным протоколам (как описано выше), а также в соответствии с указаниями производителей реактивов и наборов для выделения нуклеиновых кислот. Плазмидную ДНК экстрагировали с помощью Sigma GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma), РНК выделяли GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma) и RNAgents total RNA isolation kit (Promega).

Для изучения активности предполагаемых генов ИАМ пути [триптофан монооксигеназы и гидролазы (амидазы)] были сконструированы векторы экспрессии: для триптофан монооксигеназы (предполагаемого *IaaM*) использовали фрагмент 1.87 kb, содержащий ORF (open reading frame, открытую рамку считывания), который амплифицировали на основе геномной ДНК штамма *F. proliferatum* ET1, используя праймеры F.prol-IaaM-BspHI-for и F.prol-IaaM-BamHI-rev (табл. 4., Tsavkelova et al., 2012).

Полученный ампликон затем клонировали в плазмиду pTZ57R (Fermentas), вырезали с помощью рестриктаз BspHI и BamHI и вводили в вектор Ksh52-1 (Barhoom and Sharon, 2004) по сайтам BamHI и NcoI между промотерной областью *Aspergillus nidulans* GPDA и терминаторной TRPC, получив в результате рОЕ-IaaM вектор. Для проверки экспрессии гена ИАМ гидролазы (предполагаемый *IaaH*), фрагмент 1,95 тпо, содержащий ORF, амплифицировали также на основе геномной ДНК *F. proliferatum* ET1, используя праймеры IaaH-F1-Apa и IaaH-R1-Apa. ПЦР продукт обрабатывали рестриктазой ApaI и клонировали в pUCH2-8-nat вектор, который содержит кассету устойчивости к нурзеотрицину, исходно сконструированного на основе pNR1 плазмиды (Malonek et al., 2004). Промотерная область *F. fujikuroi* GLNA гена (Teichert et al., 2004) была амплифицирована с помощью праймеров glnA-F-HindIII и glnA-R-SalI, затем клонирована в обработанный HindIII/SalI рестриктазами вектор pUCH2-8-nat, несущий *IaaH* ген из *F. proliferatum* ET1 с целью конструирования *IaaH* over-expression вектора рОЕ-IaaH.

Таблица 4. Олигонуклеотидные праймеры, используемые для анализа генов *iaaH* (амидаза) и *iaaM* (монооксигеназа) у видов из рода *Fusarium* (Tsavkelova et al., 2012).

Праймер	Последовательность (5'→3')*
Стандартные праймеры	
Fvert <i>iaaM</i> for	AGT GAC CAG CCT GCT GAT TTC CCT CG
Fvert <i>iaaM</i> rev	AAG ATC GCA GCC ATT GAG TTG TGC
Fox <i>iaaM</i> for	TGT CTG ATA CCG ACC TTC CCC AGG C
Fox <i>iaaM</i> rev	ATT GCA GCC ATA GAG TTA TGC GC
Fox <i>iaaH</i> for	TTA CTG TTC TCT GGA CCC ACA ACC
Fox <i>iaaH</i> rev	ATC AGG TTG AAC AGC ACA AAG TCG C
Fvert <i>iaaH</i> for	ACT TGA TCA CTG AGA CGG CTG AAC C
Fvert <i>iaaH</i> rev	TTC GAA ACC AGC TTG TTG ATA AGG
Fvert IAAH start for	ATG AAT CCG AAG TAC ACT CTT GC
Fvert IAAH stop rev	TCA CTC TTG GAA AGC CTG CTT TC
<i>F. proliferatum</i> -специфичные праймеры	
<i>iaaH</i> for	AAG TTC GCA AAG GCC TGG TAC G
<i>iaaH</i> rev	ACT GGC ATG ACC TCC TCC TGG
Fprol <i>iaaM</i> for	TAT GAC TTT GCT GTT GTT GGC ACC TCG
Fprol <i>iaaM</i> rev	TAG TCA TAG AAC ATG GAA GAG ATC AGC
F.prolif <i>iaaM2</i> for	ACG CCA ACG AGT TCA ACT ACA CC
F.prolif <i>iaaM2</i> rev	ATG GGC TCG TTG GTT GTG TCC G
F.prolif <i>iaaM3</i> rev	AGT GGG AGT TGA AGG CTG GCT TGG
F.prol <i>iaaM</i> BspHI for	CAG <u>GTC</u> ATG <u>ATG</u> CGC TTC TTC AAC TTC AAC AAG
F.prol <i>iaaM</i> BamHI rev	GTT <u>GGA</u> TCC TCA GTA TTG GTA AGG GCT AGC ACC CAG AAG AGC
Fprol <i>iaaH</i> for	AAG ATC AAC TTG ACG CAG ACC ATC G
Fprol <i>iaaH</i> rev	TAG CTA ACT TGG CCA ATG GGA ACG G
Fprol <i>iaaH</i> rev2	AAC AGG ATC GCG TGC AAA GAC G
Fprol <i>iaaH</i> rev3	AAG ACT TTG CTC AAA CGG AGG C

*- Введённые сайты рестрикции подчеркнуты.

Для делеции всего ИАМ локуса (состоящего из двух генов и межгенного участка, содержащего промотерную область) в штамме *F. proliferatum* ET1, использовали замещающий вектор pIAA-GR, сконструированный в лаборатории проф. B.Tudzynski. Векторы с репортерными генами *YFP* и *DsRED* были сконструированы в лаборатории проф. А. Шарона: для оценки транскрипционной активности промотерной межгенной области и направления транскрипции в обоих направлениях – налево (*IaaH*) и направо (*IaaM*). Для этого фрагмент был амплифицирован дважды: один раз с праймерами, включающими сайт рестрикции для *NcoI* и *SacI*, следующими сразу после генов *IaaH* и *IaaM*, соответственно. Следующая амплификация включала те же сайты рестрикции, но на противоположных сторонах фрагмента. Фрагменты были клонированы в вектор pYHN2 (Hoff and Kück, 2005), следом за последовательностью YFP (вместо промотерной области GPD), таким образом, получив две плазмиды: PIAY (+) и PIAY (–). Кодировующую последовательность dsRED амплифицировали с помощью праймеров, вводящих сайты

рестрикции *SacI* и *EcoRI* и клонировали в те же сайты рестрикции, находящиеся на плаزمидах PIAY (+) и PIAY (–), получив в результате PIAYR (+) и PIAYR (–).

Для получения трансформантов пользовались вышеописанным протоколом (раздел 2.7.1). Колонии трансгенных штаммов отбирали на среде с гигромицином (Calbiochem) или нурсеотрицином (Werner BioAgents, Jena, Germany). С выделенной из микромицетов ДНК проводили диагностические ПЦР с использованием соответствующих праймеров. Среди трансформантов были получены over-expression (с избыточной экспрессией) амидазы (*IaaH* гена) трансформанты *F. proliferatum* ET1 (с использованием плазмиды pOE-IaaH), over-expression трансформанты, транскрибирующие оба гена ИАМ пути – *IaaM* и *IaaH* (за счет ко-трансформации и введения плазмид pOE-IaaH и Ksh-IaaM). Делеции обоих генов добивались введением плазмиды pIAA-GR, обозначенной как $\Delta\Delta IaaM/iaaH$.

2.7.2.1. Оценка энзиматической активности

Активность ферментов ИАМ-пути определяли путем анализа конверсии триптофана и индолил-3-ацетамида в соответствии с методикой, описанной ранее (Maor et al., 2004). Для этого грибы культивировали в среде Чапека-Докса в течение 3 дней, мицелий собирали фильтрованием через Miracloth, и биомассу сразу же замораживали и измельчали в жидком азоте. Аликвоту (5 г) суспендировали в 11,8 мл буфера для экстракции белков, состоящего из 10 мл трицинового буфера (pH 8,3), 13,5 mM СТАВ и 200 мл ингибитора протеаз (Sigma-Aldrich). Пробирки инкубировали в течение 10 мин при 28°C на шейкере при 150 об/мин, центрифугировали при 7600g в течение 10 мин и супернатант разделяли на две отдельные пробирки, в которые добавляли L-триптофан (5–10 mM) или ИАМ (2,5 mM), соответственно, и затем инкубировали при 28°C в темноте с перемешиванием при 100 об/мин. Затем проводили экстракцию индольных продуктов и определяли их содержание с помощью ТСХ-анализа, как описано выше.

2.8. Биоразложение целлюлозосодержащих субстратов *Trichoderma viride*

Для изучения целлюлазной активности использовали изолят *Trichoderma viride* из ризопланы воздушных корней *Dendrobium moschatum* (Цавкелова и др., 2003в).

Культивирование осуществляли на среде Чапека-Докса с добавлением целлюлозосодержащих субстратов – фильтровальной бумаги (фильтры МРТУ 6-06-2411-65) и бумажных отходов: газетной и журнальной бумаг, гофрированного картона и офисной бумаги с черно-белой печатью, а также смеси вышеперечисленных бумаг. В работе использовали фрагменты бумаг площадью 0,5 см². В ряде опытных вариантов в качестве ко-субстрата использовали сахарозу (30,0 г/л). Посевной материал вносили в виде поверхностно-выросшей в течение 7 сут культуры на агаризованной среде Чапека–Докса из расчета 2 см² на 100 мл среды, после чего культуры инкубировали при 28-30°C и перемешивании при 150 об/мин в темноте.

Оценку роста и развития микромицета проводили, как описано ранее (Прокудина и др., 2016). Для определения концентрации белка использовали метод Лоури, а оптическую плотность измеряли при 650 нм на спектрофотометре Hitachi 200-20 относительно стандарта – бычьего сывороточного альбумина. Концентрацию растворимых углеводов в культуральной жидкости определяли согласно ранее описанному (Miller, 1959) методу относительно стандарта – глюкозы. К одной части КЖ добавляли три части 3,5-динитросалициловой кислоты (ДНСК) и оставляли на кипящей "водяной бане" в течение пяти мин. Оптическую плотность измеряли при 540 нм на спектрофотометре.

Для определения целлюлозолитической активности аликвоту (5 мл) КЖ пропускали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм («Millipore», США). Для определения активности β-1,4-эндоглюканазы к 0,5 мл КЖ добавляли в равном соотношении (по объёму) 1%-й раствор карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ, «Sigma», США), приготовленный на 0,1 М натрий-ацетатном буфере, pH 5,3 и инкубировали 60 мин при 50°C (Lakshmi and Narasimha, 2012). В качестве контроля использовали КЖ, предварительно прогретую 30 с при 100°C для инактивации фермента. Пробы охлаждали на льду, центрифугировали 2 мин при 4000 g, отбирали 1,0 мл супернатанта и смешивали с 3 мл ДНСК для определения редуцирующих сахаров (Miller, 1959). Оптическую плотность определяли при длине волны 540 нм. За единицу активности (Ед.) β-1,4-эндоглюканазы принимали количество мкМ глюкозы, образовавшейся после гидролиза субстрата (КМЦ) в 1 мл за 1 мин в условиях реакции. Концентрацию глюкозы рассчитывали по калибровочной кривой в интервале 0,1-1,0 мг/мл. Активность пересчитывали на мг белка.

Для определения общей целлюлозолитической активности в качестве субстрата использовали фильтровальную бумагу Whatman №1 («Whatman», США). В 1 мл натрий-ацетатного буфера помещали сложенную «гармошкой» фильтровальную бумагу (0,5 г; 1х6 см), добавляли 0,5 мл КЖ и инкубировали 60 мин при 50°C (Lakshmi and Narasimha,

2012). Затем отбирали 1 мл раствора, в котором определяли образовавшиеся редуцирующие сахара с ДНСК, как описано выше. Единицу активности (Ед.) рассчитывали, как описано выше.

Для предобработки целлюлозосодержащих субстратов с помощью культуры *Trichoderma viride* с целью их дальнейшей конверсии в биогаз, использовали смесь бумаж и жидкофазное культивирование гриба в среде Чапека-Докса. Пробы отбирали в исходной точке, а затем на 3, 5 и 9 сутки, для чего 15 мл культуры центрифугировали при 7000 *g* 15 мин, а полученный осадок переносили в анаэробные флаконы на 100 мл и добавляли 30 мл питательной среды для метаногенных сообществ (Цавкелова и др., 2012а, б; Прокудина и др., 2016; Tsavkelova et al., 2017). В качестве инокулята использовали навоз крупного рогатого скота (КРС), который вносили в количестве 10% (масса к объёму). В герметично закрытых флаконах заменяли газовую фазу на аргон. Термофильные метаногенные сообщества инкубировали при 55°C в термостате «Binder» BD 115, (ФРГ).

Хроматография. Функциональную активность метаногенных сообществ оценивали по биоконверсии субстрата в биогаз (Цавкелова и др., 2012а; б; Malakhova et al., 2015; Tsavkelova et al., 2018). Содержание метана, а также углекислого газа и водорода детектировали на газовом хроматографе "Кристалл 2000М" (Хроматэк, РФ), оснащённом микрокапиллярной колонкой FFIP (15000 × 0,5 мм). В качестве газа-носителя использовали Ar с расходом 15 мл/мин и пламенно-ионизационный детектор (ПИД) с рабочей температурой 200°C и температурным градиентом от 70 до 160°C. Полученные результаты обрабатывали с помощью программы Chromatec Analytic 2.5 (РФ) и рассчитывали согласно ранее описанной методике (Цавкелова и др., 2012а; б). Для оценки активности образования газообразных продуктов измеряли избыточное давление во флаконах. Содержание в смеси индивидуального газа определяли по следующей формуле:

$A = (\sum V_{газа} / \sum V_{смеси}) \times 100$, где $\sum V_{газа}$ – суммарный объём отдельного газа; $\sum V_{смеси}$ – суммарный объём смеси газов. $V_{газа}$ при нормальных условиях: $p = 1$ атм, $t = 273,15$ К (0°C) определяли, используя уравнение состояния идеального газа. При постоянной массе газа уравнение можно записать в виде $p \times V / T = \text{const}$.

$V_{газа} = (p \cdot V_{\phi} \cdot T_{ну} \cdot a) / (p_{ну} \cdot T \cdot 100)$, где a – концентрация газа (%), p – давление (бар), $p_{ну}$ – давление при нормальных условиях, T – температура культивирования, $T_{ну}$ – температура при нормальных условиях, V_{ϕ} – объём газа в опытном флаконе с сообществом. Количество вещества (моль) образованного метана $\nu = V_{газа} / 22,4$.

2.9 Биоразложение биомассы цианобактерий микробным сообществом

В наших исследованиях было показано, что цианобактерии активно заселяют поверхность воздушных корней эпифитных орхидей и продуцируют значительное количество биомассы, которая формирует своеобразный чехол нарастания на их корнях, который вместе с образуемыми экстраклеточными выделениями, метаболитами и экзополисахаридами составляет субстрат, позволяющий развиваться другим микроорганизмам. Чтобы оценить возможность использования и эффективной утилизации биомассы цианобактерий с количественной оценкой образуемых конечных продуктов было изучено модельное микробное сообщество на примере многокомпонентного консорциума метаногенных организмов.

Метаногенные сообщества используют разнообразные органические субстраты, включая простые и сложные углеводы, аминокислоты и белки, органические спирты и кислоты, соединения, содержащие бензольное кольцо (Zinder, 1993; Цавкелова и Нетрусов, 2012). Многоступенчатый процесс биоконверсии мортмассы осуществляется за счет первичных анаэробов (гидролитиков и диссипотрофов), синтрофов, ацетогенов и метаногенов, которые могут включать до 60 различных видов бактерий и архей (Stams, 1994; Заварзин, 1997; Schink, 1997; Sieber et al., 2010). Конечным продуктом активности такого консорциума является образование биогаза, основными компонентами которого являются CH_4 (55-80%) и CO_2 (20-45%), по количеству которых в смеси можно определить эффективность утилизации и биоконверсии исходного субстрата.

В качестве микробных консорциумов были использованы выделенные нами ранее из различных источников целлюлозолитические сообщества (№ 1–24 (табл. 5). Их выделение и селекция описаны ранее (Цавкелова и др., 2012а; б). Для инокуляции анаэробных флаконов на 100 мл посевной материал в объёме 30% вносили к 30 мл питательной среды. Состав питательной среды для анаэробных сообществ приведён в разделе 2.11. Засеянные флаконы после замены воздушной фазы на аргон инкубировали при 55°C в темноте. Хранение культур осуществляли в 25% глицероле в анаэробных условиях при -20°C.

Таблица 5. Описание исходных мест отбора проб для исходного выделения анаэробных целлюлозолитических сообществ (Цавкелова и др., 2012а; 2012б).

№	Источник выделения микробного сообщества
1	Компост # 1 (Московская обл.)
2	Компост # 2 (Московская обл.)
3	Жом винограда красного (Дагестан)
4	Жом винограда белого (Дагестан)
5	Помет кролика (Московская обл.)
6	Навоз крупного рогатого скота (КРС) #1 (Московская обл.)
7	Навоз крупного рогатого скота №2 (Московская обл.)
8-13	Пресноводные водоёмы Камчатки
14	Иловые отложения #1 (Тверская обл.)
15	Донные осадки пруда #1 (Тверская обл.)
16	Иловые отложения #2 (Тверская обл.)
17	Донные осадки пруда #2 (Тверская обл.)
18	Иловые отложения #3 (Тверская обл.)
19	Навоз зебры (Зоопарк, Москва)
20	Навоз пони (Зоопарк, Москва)
21	Навоз антилопы гну (Зоопарк, Москва)
22	Навоз черной антилопы (Зоопарк, Москва)
23	Навоз слона (Зоопарк, Москва)
24	Копролиты дождевых червей (Ботанический сад, Москва)

Для получения субстрата для биоконверсии использовали биомассу диазотрофной цианобактерии *Anabaena variabilis*, которую культивировали при комнатной температуре в безазотистой среде BGo-11 при дневном освещении. Биомассу получали центрифугированием культуры при 10000 *g* в течение десяти мин, – затем замораживали при -20°C. После оттаивания 15 г/л полученной мортмассы (сырой вес) вносили в 30 мл питательной среды для анаэробных сообществ, куда после создания анаэробных условий путём замены газовой фазы на аргон добавляли 30% (по объёму) инокулята (целлюлозолитических микробных сообществ) и инкубировали при 55°C в термостате (Binder BD 115, ФРГ). Функциональную активность микробных консорциумов по биоконверсии биомассы *A. variabilis* в биогаз определяли по содержанию метана в составе биогаза, как описано выше.

2.10. Биотесты с растениями

Для изучения биологической активности стимуляторов роста растений, образуемых ассоциированными с орхидеями бактериями и грибами, а также для оценки фитостимулирующих или фитопатогенных свойств микроорганизмов были использованы несколько биотестов с растениями.

2.10.1. Влияние ауксина на удлинение coleoptилей пшеницы

Биотест проводили в соответствии с методикой, описанной ранее (Рубин, 1978; Thakur and Vyas, 1983). Механизм быстрого действия ауксина основан на его активации роста (удлинения) клеток растяжением за счет стимуляции активности ряда белков, локализованных в цитоплазматической мембране и ответственных за ионный транспорт (H^+ -АТФазы, а также калиевых и кальциевых каналов). Для этого биотеста семена пшеницы сорта "Инна" проращивали в течение 3 суток во влажной камере. Проростки срезали, отступая от верхушки 4 мм, отрезали их верхнюю часть, оставляя фрагмент длиной 5 мм, из которого капилляром удаляли первичный лист. Полученные coleoptили одного размера помещали в чашку Петри с дистиллированной водой со следами ($10^{-6}M$) сульфата магния на 1 час. Затем отрезки coleoptилей помещали в стерильные чашки Петри, содержащие 2 мл КЖ выращенных в жидкой питательной среде для бактерий или микромицетов. В качестве контроля использовали неинокулированную среду, а также раствор ИУК (50 мкг/мл). Инкубацию проводили в течение 24-30 часов при температуре 25°C в темноте. Затем измеряли длину каждого отрезка coleoptиля. Для одной пробы использовали 6 отрезков. Опыт проводили в 3-х повторностях.

2.10.2. Влияние ауксина на корнеобразование черенков фасоли

Для того, чтобы оценить биологическую активность микробных ауксинов (ИУК) использовали биотест с черенками фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) (Цавкелова, 2003; Tsavkelova, 2011; Pavlova et al., 2017). Биотест проводили по ранее описанной методике (Kefeli and Kutacek, 1977). Этот модельный эксперимент демонстрирует механизм действия ауксинов, направленный на индукцию ризогенеза у растений. Формирование корней на черенках фасоли коррелирует с концентрацией экзогенной ИУК, что позволяет визуально оценить влияние ауксинов по количеству образованных корней вдоль стебля черенков и высоте их закладки. Для проведения эксперимента от проросших растений со сформированными первыми двумя настоящими листьями отрезали базальную часть на расстоянии 0,5-1,0 см выше корневой шейки. Черенки помещали в растворы ИУК (50-100 мкг/мл ИУК), а также в КЖ (или фильтраты) бактерий и грибов на 6 часов. В качестве одного из контрольных вариантов использовали воду и стерильную среду. После обработки черенки промывали водой и помещали во флаконы с водопроводной водой, оставляя при естественном освещении и комнатной температуре (весенне-летний период). Высоту формирования корней и их количество анализировали в динамике в течение 8-10

дней. Для каждой пробы отбирали 5-6 черенков, эксперимент повторяли в 3-5-ти повторностях.

2.10.3. Влияние гибберелловых кислот на рост гипокотилей салата

Биотест по определению активности гиббереллинов проводили в соответствии с методикой (Frankland and Wareing, 1960) на гипокотильях салата сорта “берлинский желтый” (Цавкелова, 2003). Для этого семена выдерживали в камере на стекле, обернутом влажной фильтровальной бумагой при 25°C в темноте в течение двух дней. Затем отбирали проростки с одинаковыми по длине корнями (6-8 мм) и помещали на фильтровальную бумагу, смоченную 1 мл исследуемого раствора гибберелловой кислоты (ГК₃) в концентрации 25 мг/л, а также КЖ (или фильтратов) бактерий и грибов. В качестве контроля использовали неинокулированную среду. Для каждой пробы отбирали по 5 проростков. Инкубацию проводили при комнатной температуре в весенне-летний период и при постоянном освещении лампой дневного света (700 лк), что увеличивало ингибирование светом собственного роста гипокотилей салата. Измерение длины гипокотилей проводили через трое суток.

2.10.4. Влияние цитокининов на задержку пожелтения фрагментов листьев пшеницы

Для этого биотеста (Цавкелова, 2003) из листьев первого яруса пшеницы, вырезали отрезки длиной 2 см, отступив на 2 см от нижнего края листа (Кулаева, 1973). Полученные фрагменты раскладывали на фильтровальную бумагу, смоченную 1 мл КЖ бактерий или фильтратом грибов. Дополнительно использовали пластины для тонкослойной хроматографии, на которых проводили анализ содержания цитокининов в экстрактах из КЖ микроорганизмов, для чего соскребали полосы, соответствующие по показателю R_f метчикам кинетина и/или зеатина, которые затем растворяли в 0,5 мл дистиллированной воды, добавляя по каплям 0,1н NaOH, нагревали на водяной бане и доводили общий объем до 1 мл (Кулаева, 1973). Для каждой пробы использовали 5 фрагментов, которые инкубировали под стеклом с освещением (700 лк) при температуре 20-25° С. В качестве контроля использовали стерильные питательные среды, а также растворы стандартных соединений кинетина и зеатина (10 мг/л). Сохранение зелёной окраски листьев оценивали визуально, сравнивая с контрольными образцами через 7-10 суток после обработки.

2.10.5. Определение влияния микромицетов рода *Fusarium* на развитие *Dendrobium moschatum* и *Dendrobium nobile*

Для изучения влияния ассоциативного штамма *Fusarium proliferatum* ET1 на развитие эпифитных орхидей были использованы растения, принадлежащие к роду *Dendrobium*: *D. moschatum* и *D. nobile*, визуально здоровые, без каких-либо симптомов заболеваний (гниль, пятнистость, хлороз). Дочерние побеги (старше 3 лет и не менее 15 см в длину) с хорошо развитыми воздушными корнями отделяли от материнских растений, культивируемых в условиях ГБС РАН. В качестве культур грибов были также проанализированы фитопатогенные штаммы *F. fujikuroi* IMI58289 и *F. proliferatum* 62905 (предоставленные проф. Bettina Tudzynski, University of Münster, Germany), которые культивировали на жидкой среде СМ в течение 3-4 суток. Для обработки растения помещали во флаконы с 50 мл культуры микромицетов на 40 минут, контрольные образцы замачивали в воде. Эксперимент проводили в 2-3-х повторностях для каждого варианта. Растения затем высаживали в стерильный сфагнум при $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ с фотопериодом 12 часов и поливом раз в 3-4 дня. Для оценки вирулентности также использовали листовой тест, при котором 7 мкл суспензии конидий (10^8 мл^{-1}) наносили на поверхность листовой пластины, предварительно проколотую с помощью иглы. Анализ состояния обработанных растений проводили в динамике в течение 2-х месяцев.

2.10.6. Определение антимикробной активности фитоэкстрактов *D. moschatum*

Для исследования антибактериальной активности соединений, содержащихся в экстрактах корней, стеблей и листьев *D. moschatum*, эти части растений, выборочно срезанные с 3-х отдельных растений, отмывали в проточной воде, взвешивали (нативный, вес сырой биомассы) и растирали в ступке. Экстракцию проводили в соответствии с методикой, описанной ранее (Buyun et al., 2017). Биомассу помещали в пробирки с притёртой пробкой и добавляли 70%-ный этиловый спирт (1:5, масса к объёму), оставляя на 18 часов при комнатной температуре в темноте. Затем растворы хранили в темноте в холодильнике при 4°C .

Подобным образом проводили экстракцию соединений из листьев другой эпифитной орхидеи – *Pholidota articulata*, использованной в качестве положительного контроля, так как антимикробные свойства этого растения были описаны ранее (Marasini and Joshi, 2012). Кроме того, для этих же целей использовали экстракты фармацевтических

препаратов лекарственных растений: корней солодки – *Glycyrrhizae radices*, травы тысячелистника (*Millefolii herba*) и листьев мяты перечной (*Menthae piperitae folia*).

В качестве тест-культур использовали грамположительную споровую культуру *Bacillus cereus*, грамположительную бесспорную культуру *Staphylococcus aureus* и грамотрицательную культуру *Escherichia coli* из коллекции кафедры микробиологии МГУ. Посев тест-микроорганизмов проводили глубинным (в расплавленную и остуженную среду МПА) и поверхностным (аликвоту 0,1 мл посевного материала наносили на поверхность агаризованной среды МПА). Затем на поверхность помещали стерильные бумажные фильтры, пропитанные фитоэкстрактами. Фитоэкстракты предварительно высушивали на воздухе, (из расчёта 500-1000 мкл исходного экстракта на один фильтр), а затем разводили в 50 мкл 70%-го этилового спирта. В качестве контроля использовали фильтры, пропитанные 50 мкл 70%-го этанола. Засеянные культуры инкубировали в течение 24-48 часов при температуре 30°C, после чего проводили измерение диаметра зоны подавления роста тест-культур. Ту же схему эксперимента применяли к нескольким выделенным изолятами ассоциативных бактерий филлопланы *D. moschatum*, используя для роста микроорганизмов среду R2A. В качестве тест-бактерий использовали ассоциативные бактерии филлопланы, а не ризопланы, так как именно листья, а не корни многих орхидей обладают большей антимикробной активностью (Bulpitt et al., 2007; Singh and Duggal, 2009; Marasini and Joshi, 2012; Teixeira da Silva et al., 2015a).

2.11. Биотехнологический подход к семенному проращиванию орхидей *in vitro* в ко-культуре с бактериями, стимулирующими рост орхидей.

2.11.1. Бактеризация семян и влияние ризобактерий на их прорастание

Для исследования возможности совместного культивирования орхидей и PGPB штаммов бактерий были отобраны семена двух эпифитных орхидей *D. nobile* и *D. moschatum*. Среди культур бактерий были изучены штаммы, исходно колонизирующие ризоплану орхидей, так и ризобактерии, например, *Pseudomonas fluorescens* и *Klebsiella oxytoca*, изначально выделенные из ризосферы злаков и овощных сельскохозяйственных культур, соответственно. Критерием отбора ризобактерий была их способность к биосинтезу ИУК и стимуляции ризогенеза в биотестах с растениями.

Плоды с семенами (рис. 32) срезали с материнского растения, обрабатывали раствором 70%-го этанола и разрезали в асептических условиях. Семена извлекали и стерилизовали в 10-15%-ном растворе стерилизанта "Белизна", содержащем NaOCl, в течение 15-20 мин, после чего трижды промывали в дистиллированной воде по 5-10 минут. Затем семена распределяли по поверхности агаризованных сред (из расчета 800-1000 семян), которыми в объеме 35-40 мл заполняли флаконы для культивирования. В качестве питательных сред использовали среду Мурасиге-Скуга (MS/2 – состав с уменьшенным в два раза минеральным фоном, обычно используемый при проращивании орхидей), а также модифицированную среду Кнудсон-С (Knudson-C, г/л): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ — 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,5; KH_2PO_4 — 0,25; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,25; $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,025; $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,0075; сахароза – 20,0; агар-агар – 8,0; pH 6,5.

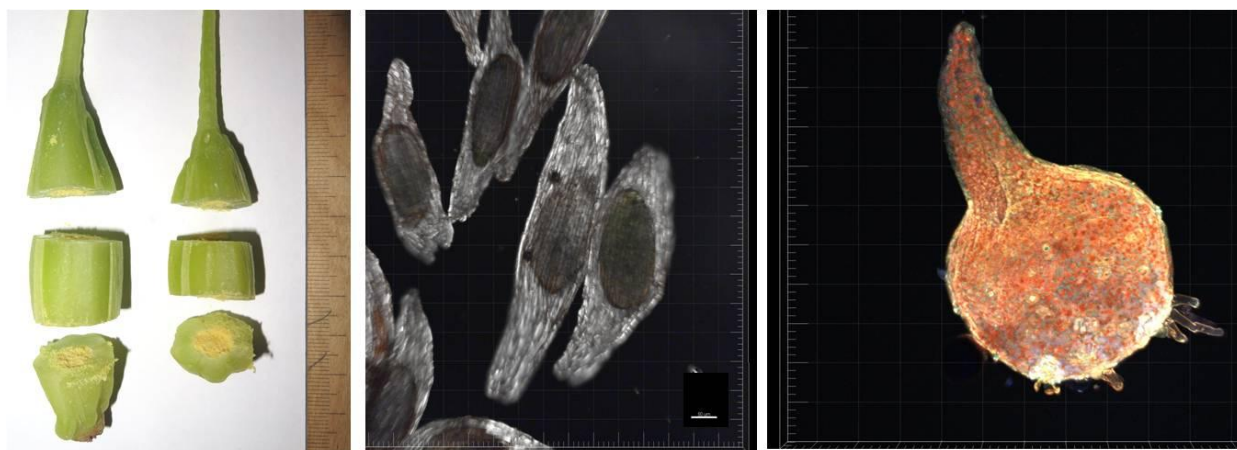


Рисунок 32. Плоды *Dendrobium nobile* с семенами (слева), покоящиеся семена *D. nobile* в первой стадии прорастания (шкала = 70 мкм) (в центре); протокорм *D. nobile* в стадии прорастания с образованными ризоидами и первым листом – окрашивание с помощью трифенилтетразолий хлорида (фотографии предоставлены проф. Г.Л.Коломейцевой).

Для посевного материала бактериальные культуры выращивали в течение 2-4 дней на средах МПБ/МПА, ТСБ/ТСА, или ЧДЭ, затем готовили в стерильной воде суспензии клеток (при необходимости, осаждая центрифугированием и последующим ресуспендированием), содержащие 10^6 - 10^8 кл/мл, которые затем в количестве 0,5 мл вносили во флаконы поверх семян и растирали с помощью шпателя по поверхности. Контрольные образцы не содержали культур бактерий. Культивационные флаконы с семенами эпифитных орхидей *D. nobile* и *D. moschatum* инкубировали при $23 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 1,5-2 недель в темноте, после чего переносили на свет с фотопериодом 12-16 ч светового дня. Оценку развития семян проводили в соответствии с методикой Дж. Ардитти (Arditti, 1967) путем подсчета проросших семян и анализа времени прорастания и стадии развития проростков.

Для этого использовали следующую шкалу стадий развития семян: 0 – семенная оболочка интактная, семена остаются в покоем состоянии; 1 – семена набухшие, фотосинтезирующие; 2 – образование протокормов с развитыми ризоидами; 3 – появление листовидного органа; 4 – появление последующих листьев и формирование корней. Семена подсчитывали в 3-5 рандомизированных площадях, содержащих 60-100 семян/проростков (в 4-6 повторах для каждого варианта).

2.11.2. Изучение колонизирующей способности PGPR-штаммов *Pseudomonas fluorescens* и *Klebsiella oxytoca* на примере *Dendrobium nobile*

Для изучения стратегии, которую ассоциативные бактерии выбирают для заселения семян, проростков и корней взрослых генеративно-зрелых растений орхидей, были использованы штаммы, несущие GFP репортерный ген – *Pseudomonas fluorescens*-32-gfp и полученный в этом исследовании трансформант *Klebsiella oxytoca* TSKhA-gfp, которые использовали для бактеризации эпифитной орхидеи *Dendrobium nobile* (Pavlova et al., 2017).

Для изучения микробно-растительных взаимодействий со взрослым растением, воздушные и субстратные корни *D. nobile* погружали на 30 мин в суспензию микроорганизмов, предварительно выращенных на среде LB с канамицином в течение 48 часов. После обработки делали поперечные и продольные срезы корней в динамике: через 30 мин, 24 и 48 часов, а также через 7, 14 и 30 суток после обработки. Срезы помещали в 50% раствор водного глицерина и затем просматривали с использованием КЛСМ (см раздел 2.4.4).

Для изучения взаимодействия бактериальных культур с семенами орхидей вначале определяли процент жизнеспособных семян *D. nobile*. Для этого проводили тетразолиевый тест (Lakon, 1942), а также прямой подсчёт проросших семян. Преимущество первого метода заключается в том, что он даёт возможность оценить всхожесть у семян с длительным периодом прорастания. Для этого 75 мг 2,3,5- трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) растворяли в 15 мл 0,05 М К-фосфатного буфера (pH = 7,5) и в этом растворе семена инкубировали в течение 18-24 ч при 24° С. Жизнеспособные семена имеют насыщенный красный цвет (рис. 32) благодаря образованию окрашенного соединения трифенилформазана, в то время как нежизнеспособные семена остаются бесцветными. Также использовали другое аналогичное соединение – 2,3,5-трифенилтетразолий бромид

(ТТБ). Подсчёт семян проводили в нативном препарате с использованием светового бинокулярного микроскопа «Лабкомплекс» МБС-10 при увеличении 4^x .

Для ряда экспериментальных вариантов в среду также добавляли 200 мкг/мл L-триптофана для индукции биосинтеза ауксина бактериями. Штаммы *P. fluorescens* и *K. oxytoca* культивировали в среде LB с канамицином 48 ч, затем центрифугировали при 4000 об/мин 10 минут; осадок разводили до 10^6 кл/мл; аликвоту (0,2 мл) наносили на поверхность среды. Засеянные флаконы инкубировали 2 недели в темноте при 24°C и затем при комнатной температуре с 12-часовым фотопериодом. В качестве контроля семена инкубировали в тех же условиях без внесения инокулята бактерий. Для оценки роста семян и подсчета проросших семян анализировали время прорастания, длину проростков и этапы развития растений, такие как: (i) покоящееся семя, семенная кожура интактная (рис. 32, 33) (ii) семена набухшие с активным фотосинтезом (зеленый цвет); (iii) массивное набухание протокорма, развитие ризоидов; (iv) появление листовидного органа и развитие последующих листьев и корней (рис. 33).

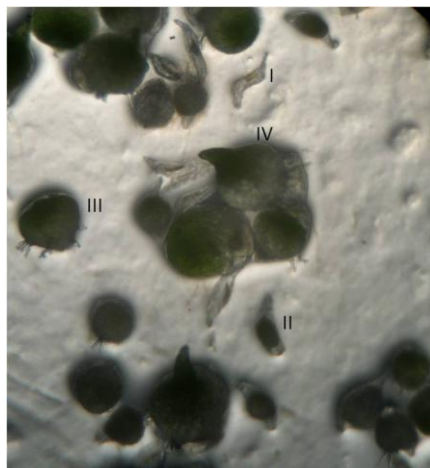


Рисунок 33. Прорастающие семена *Dendrobium nobile* в разных стадиях роста: покоящееся семя, семенная кожура интактная (I); набухшие семена с активным фотосинтезом (зеленый цвет эмбриона, II); массивное набухание протокорма, развитие ризоидов (III); появление листовидного органа (IV). Световая микроскопия, $\times 40$.

Окончательный подсчет непроросших семян проводили после двух месяцев культивирования. Процент семян на каждом этапе рассчитывали в четырех повторностях, подсчитывая по три рандомизированные области, содержащие 40-60 семян/эмбрионов/проростков в поле зрения. Длину проростков *D. nobile* подсчитывали в трёх повторностях, измерения 20 растений в трёх рандомизированных областях в каждой повторности. Для оценки влияния микробной ИУК на прорастающие семена, полученные значения разделяли с помощью t-критерия Стьюдента. Результаты представлены средним арифметическим с учетом стандартной ошибки. Значения считали значимыми при $P \leq 0,05$.

2.12. Состав питательных сред для культивирования микроорганизмов

Состав питательных сред для выделения гетеротрофных бактерий:

Среда **МПА** (основной состав разводили в 2-3 раза водопроводной водой). Среда **ТСБ** - триптон-соевый бульон (основной состав разводили в 2-3 раза водопроводной водой) или **ТСА** (триптон-соевый агар с добавлением 1,5% агара). Среда **R2A** (Difco Laboratories, США) (г/л): дрожжевой экстракт - 0,5; пептон - 0,5; казеиновые кислоты - 0,5; декстроза - 0,5; растворимый крахмал - 0,5; пируват натрия - 0,3; K_2HPO_4 - 0,3; $MgSO_4$ - 0,05; агар - 15,0; дистиллированная вода - 1,0 л.

Крахмал-аммиачный агар (г/л): растворимый крахмал — 10,0; $(NH_4)_2SO_4$ — 2,0; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 1,0; NaCl — 1,0; $CaCO_3$ — 3,0; агар-агар — 15,0; вода водопроводная — 1000 мл; pH 7,0-7,2.

Глицерин-пептонная среда (г/л): пептон — 2,0; дрожжевой экстракт с гидролизатом казеина (1:1) — 2,0; глицерин — 10,0; солодовый экстракт — 1,0; глюкоза — 1,0; $CaCO_3$ — 5,0; агар-агар — 15,0; вода водопроводная — 1000 мл.

Среда Чапека (г/л): глюкоза — 20,0; K_2HPO_4 — 1,0; $NaNO_3$ — 2,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,5; KCl — 0,5; $FeSO_4 \times 7H_2O$ — 0,01; вода водопроводная — 1000 мл; pH 7,0-7,2. В модифицированную среду Чапека (ЧДЭ) добавляли дрожжевой экстракт (0,5 г/л).

Среда для азотфиксаторов (г/л): сахароза — 20,0; K_2HPO_4 — 0,2; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,2; NaCl — 0,2; K_2SO_4 — 0,1; $CaCO_3$ — 5,0; $FeCl_3$ — 0,1; раствор микроэлементов по Федорову — 1 мл/л; агар-агар (Oxoid) — 15 г/л, вода — дистиллированная. Состав микроэлементов по Фёдорову, г/л: H_3BO_3 — 5,0; $(NH_4)_2MoO_4 \times 2H_2O$ — 5,0; $ZnSO_4 \times 7H_2O$ — 0,2; KI — 0,5; NaBr — 0,5; $Al_2(SO_4)_3 \times 18H_2O$ — 0,3; вода дистиллированная.

Во всех средах pH довели до значений 7,0-7,2 с помощью растворов 0,1M и 1M HCl и NaOH.

Для выделения и культивирования цианобактерий использовали жидкие и агаризованные среды: полную азотсодержащую среду BG-11 (Rippka et al., 1979), а также её безазотистый аналог BG₀. **BG-11** (г/л): $NaNO_3$ — 1,5; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 0,04; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,075; $CaCl_2$ — 0,036; лимонная кислота — 0,006; цитрат Fe — 0,006; ЭДТА — 0,001; Na_2CO_3 — 0,02, раствор микроэлементов — 1мл/л; вода дистиллированная — 1 л. pH 7,4.

Раствор микроэлементов (г): H_3BO_3 — 2,86; $MnCl_2 \times 4H_2O$ - 1,81; $ZnSO_4 \times 7H_2O$ — 0,222; $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ - 0,39; $CuSO_4 \times 5H_2O$ — 0,079; $Co(NO_3)_2 \times 6H_2O$ — 0,049. Безазотистый аналог **BGo-11** не содержит $NaNO_3$.

Для выделения и культивирования грибов использовали среду Чапека-Докса (г/л): сахароза — 30,0; KNO_3 — 3,0; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,5; KCl — 0,5; $FeSO_4 \times$

7H₂O – 0,01; вода дистиллированная – 1000 мл; pH – 6,0-6,2, а также среду состава (г/л): KН₂РO₄ – 0,2; Са(NO₃)₂ × 4H₂O – 0,5; MgSO₄ × 7H₂O – 0,1; KCl – 0,1; сахароза – 5,0; дрожжевой экстракт – 0,1; агар – 10,0 (Clements et al., 1986). Для предотвращения роста бактерий к среде вносили левомецетин (50 мг/л). Культуры поддерживали на средах того же состава и сусло-агаре (СА). Также использовали среду СМ (г/д): дрожжевой экстракт – 1,0; пептон – 2,0; казаминовые кислоты – 1,0; глюкоза – 10,0; р-р макроэлементов – 50,0 мл; р-р микроэлементов – 1,0 мл; раствор витаминов – 1,0 мл; агар-агар – 15,0; дистиллированная вода. Р-р макроэлементов (г/л): KCl – 10,4; MgSO₄ × 7 H₂O – 10,4; KН₂РO₄ – 30,4. Р-р микроэлементов (г/л): FeSO₄ × 7 H₂O – 10,0; MgSO₄ × 7 H₂O – 50,0. Р-р витаминов: биотин – 500,0 мг/л; никотиновая кислота – 50,0 г/л; п-аминобензойная кислота – 16,0 г/л; пиридоксин гидрохлорид – 20,0 г/л.

Культивирование анаэробных микробных сообществ проводили на среде (г/л): NH₄Cl – 2,5; KН₂РO₄ – 1,0; K₂HPO₄ – 1,0; СаCl₂ × 6H₂O – 0,1; MgSO₄ × 7H₂O – 0,5; NaCl – 0,1; СаСО₃ – 1,0; NaHCO₃ – 5,0; пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 2,0; р-р микроэлементов – 1 мл; резазурин – 0,5 мг/л; вода дистиллированная – 1 л; pH = 7.0-7.5. Раствор микроэлементов содержал (мг/л): ZnCl₂ – 70,0; MnCl₂ × 4H₂O – 100,0; СоCl₂ × 6H₂O – 190,0; Н₃ВO₃ – 6,0; Na₂МоO₄ × 2H₂O – 36,0; CuCl₂ × 2H₂O – 2,0; NiCl₂ × 6H₂O – 24,0; Na₂WO₄ × 2H₂O – 15,0; FeSO₄ × 7H₂O – 1,0 г/л в, предварительно растворённый в десяти мл 25%-ой соляной кислоты; вода дист. – довести до 1л. Микробные сообщества поддерживали на среде с офисной бумагой, которую предварительно нарезали на фрагменты 0,5 см² и вносили в количестве 15 г/л.

2.13. Математическая обработка результатов

Все эксперименты проводили не менее, чем в 3-5 аналитических и 2-х биологических повторностях. Количественные характеристики выражали в среднем арифметическом значении; вычисляли стандартное отклонение (или ошибку среднего). Для оценки достоверности различий и значимости средних величин (прежде всего, в сравнении опытных и контрольных образцов) для ряда исследований использовали t-критерий Стьюдента, а также F-критерий Фишера. Различия признавали значимыми при p < 0,05. Для обработки и анализа полученных результатов использовали программы Microcal Origin program (OriginLab), one-way ANOVA и Microsoft Excel.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ³

3.1 Локализация ассоциативных микроорганизмов в ризоплане и филлоплане эпифитных орхидных

Исследование воздушных и субстратных корней эпифитных орхидей с помощью световой и сканирующей электронной микроскопии позволило обнаружить разнообразие микроорганизмов, заселяющих корневую поверхность, и установить различия в составе и интенсивности колонизации ими ризопланы и филлопланы некоторых эпифитных видов тропических орхидей. Ранее (Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003а,) среди

³ Основные результаты, изложенные в данной главе, помимо статей, указанных в сносках 1 и 2, опубликованы в следующих научных статьях и работах автора:

1. Коломейцева Г.Л., Цавкелова Е.А., Гусев Е.М., Малина Н.Е. О симбиозе некоторых орхидных и активного штамма бактерии *Bacillus pumilus* в культуре *in vitro* // Бюллетень ГБС. 2002. Вып. 183. С. 117-126.
2. Цавкелова Е.А., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Образование ауксинов бактериями, ассоциированными с корнями орхидей // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 55-62.
3. Цавкелова Е.А., Александрова А.В., Чердынцева Т.А., Коломейцева Г.Л., Нетрусов А.И. Ассоциативные микромицеты тропических вьетнамских орхидей // Микология и фитопатология. 2005. Т. 39. С. 46-52.
4. Коломейцева Г.Л., Цавкелова Е.А., Гусев Е.М., Редько Н.Е., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Штамм бактерии *Bacillus pumilus* КМ МГУ 467, стимулирующий прорастание семян орхидей, и способ его использования // Патент на изобретение РФ. 2005. № 2272409
5. Tsavkelova E.A., Bömke C., Netrusov A.I., Weiner J., Tudzynski B. Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain // Fungal Genetics and Biology. 2008. V. 45. P. 139-1403.
6. Tsavkelova E.A. Bacteria associated with orchid roots // Bacteria in Agrobiolgy: Plant growth responses / D.K. Maheshwari (ed.). – Heidelberg: Springer, 2011. – P. 221-259.
7. Цавкелова Е.А., Нетрусов А.И. Получение биогаза из целлюлозосодержащих субстратов // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 5. С. 469-483.
8. Цавкелова Е.А., Егорова М.А., Петрова Е.В., Нетрусов А.И. Термофильные анаэробные микробные сообщества, разлагающие целлюлозу с образованием метана (биогаза) // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология. – 2012б. № 2. С. 36-42.
9. Коломейцева Г.Л., Цавкелова Е.А., Колобов Е.С. Оранжевые биоценозы в экспозициях тропических и субтропических растений // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология. 2013а. № 31. С. 133-142.
10. Коломейцева Г.Л., Цавкелова Е.А., Колобов Е.С. Динамические сообщества оранжевых биоценозов в экспозициях тропических и субтропических растений // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2013б. № 3. С. 716-727.
11. Блинков Е.А., Цавкелова Е.А., Селицкая О.В. Образование ауксина штаммом *Klebsiella planticola* ТСХА-91 и его влияние на развитие семян огурца посевного (*Cucumis sativus* L.) // Микробиология. – 2014. Т. 83. № 5. С. 543-551.
12. Tsavkelova E. The biosynthesis of gibberellic acids by the transformants of orchid-associated *Fusarium oxysporum* // Mycological Progress. 2016. V. 15. № 2. P. 1-8.
13. Tsavkelova E.A., Egorova M.A., Leontieva M.R., Malakho S.G., Kolomeitseva G.L., Netrusov A.I. *Dendrobium nobile* Lindl. seed germination in co-cultures with diverse associated bacteria // Plant Growth Regulation. 2016. V. 80. № 1. P. 79-91.
14. Niehaus EM, Münsterkötter M., Proctor RH, Brown DW, Sharon A., Idan Y., Oren-Young L., Sieber CM, Novák O., Pěňčík A., Tarkowská D., Hromadová K., Freeman S., Maymon M., Elazar M., Youssef SA, El-Shabrawy ES, Shalaby AB, Houterman P., Brock N., Burkhardt I., Tsavkelova EA, Dickschat JS, Galuszka P., Güldener U., Tudzynski B. Comparative "omics" of the *Fusarium fujikuroi* species complex highlights differences in genetic potential and metabolite synthesis // Genome biology and evolution. 2016. V. 8. P. 3574-3599.
15. Tsavkelova E., Prokudina L., Egorova M., Leontieva M., Malakhova D., Netrusov A. The structure of the anaerobic thermophilic microbial community for the bioconversion of the cellulose-containing substrates into biogas // Process Biochemistry. 2018. V. 66. P. 183-196.

оранжерейных облиственных орхидей наиболее многочисленным и разнообразным оказался состав ассоциативных цианобактерий на воздушных корнях *Phalaenopsis amabilis* и *Dendrobium bigibbum* (рис. 34).



Рисунок 34. Воздушные корни эпифитных *Dendrobium bigibbum* (слева) и *Phalaenopsis amabilis* (справа), покрытые цианобактериальным микробным сообществом в виде биоплёнки – чехла-оболочки из фототрофных цианобактерий.

Эти растения содержат при высокой относительной влажности воздуха в теплых оранжереях, где ночные и зимние температуры не опускаются ниже 20-22⁰С и в таких условиях содержания на воздушных корнях этих растений образуется своеобразный чехол-оболочка, сформированный за счет нарастания биомассы фототрофных цианобактерий и других микроорганизмов, заякоренных в их внеклеточном матриксе. Цианобактерии, особенно их нитчатые формы, формируют подобие каркаса, структурирующего микробное сообщество ризопланы воздушных корней. Толщина такого покрова может достигать 1-3 мм и у изученных видов он может полностью покрывать корни, тогда как у других эпифитов он представлен лишь в виде зеленоватых вкраплений – прожилок, как например, у *D. moschatum*, или как у более крупных корней *Acampe praemorsa* – в виде волокнистого зеленоватого налёта. При изучении корней *D. bigibbum* и *Ph. amabilis* с использованием СЭМ были обнаружены преимущественно нитчатые цианобактерии различных морфотипов, в том числе состоящих из эллипсовидных, дисковидных и уплощенных клеток (Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003а; 2003б).

Дальнейшие исследования подтвердили, что в слизистых чехлах цианобактерий и в матриксе, сформированном на основе экзополисахаридов, содержится большое количество клеток других бактерий, формирующих таким образом микробное сообщество воздушных корней этих эпифитов (рис. 35).

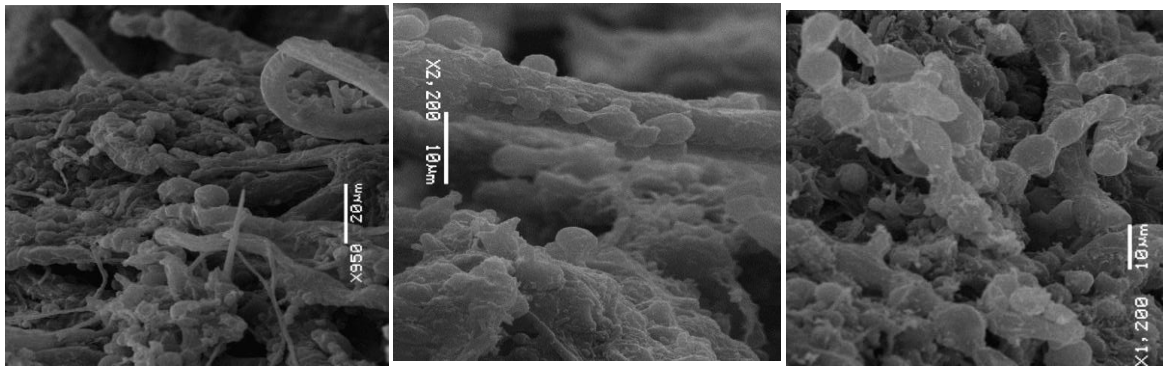


Рисунок 35. Поверхность воздушных корней *Phalaenopsis amabilis* (слева и в центре) и *Dendrobium bigibbum* (справа) с обильным нарастанием микробного сообщества, формирующего биоплёнку – чехол-оболочку. Видны нитчатые цианобактерии, состоящие из округлых и продолговатых клеток, а также клетки одноклеточных фототрофных микроорганизмов и гетеротрофных бактерий, также активно заселяющих слизистые чехлы трихомов цианобактерий. Иглистые образования – рафиды оксалата кальция. СЭМ.

Особенности морфологии и структуры воздушных корней эпифитных орхидей, в том числе наличие перфорированного многослойного веламена (рис. 36), защищают от целого ряда внешних воздействий и, в то же время, позволяют этой губчатой структуре получать достаточную аэрацию, удерживать влагу и питательные вещества, что способствует созданию уникальной экониши для колонизации ассоциативными микроорганизмами, отсутствующей у остальных растений, и отличающейся как от ризосферы или ризопланы субстратных (почвенных) корней, так и от остальной филлопланы растения.

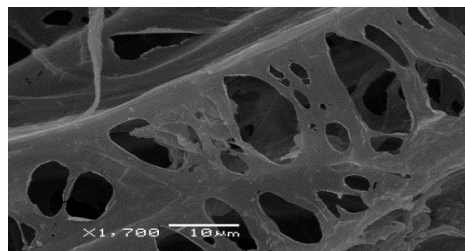


Рисунок 36. Фрагмент веламена воздушного корня *Dendrobium bigibbum*. Перфорации и губчатая структура этой гигроскопической ткани, в первую очередь, помогает накапливать и удерживать влагу и защищать корни от механических повреждений и УФ-излучения. СЭМ.

В отличие от *Ph. amabilis* и *D. bigibbum*, у других облиственных орхидей, выращиваемых как горшечная культура в менее влажных условиях, и имеющих помимо воздушных также и субстратные корни, не было обнаружено столь активного разрастания нитчатых цианобактерий в ризоплане их воздушных корней и формирования массивных биоплёнок. Поверхность их корней также активно заселена ассоциативными микроорганизмами, которые представлены, в основном, гетеротрофными бактериями. На поверхности воздушных корней *D. moschatum* и *A. praemorsa* встречаются не только

одинокими клетками гетеротрофных бактерий, но и их субпопуляции и кластеры, объединенные межклеточным матриксом, с помощью которого клетки закориваются на поверхности и формируют более крупные плёнкоподобные образования (рис. 37, 38).

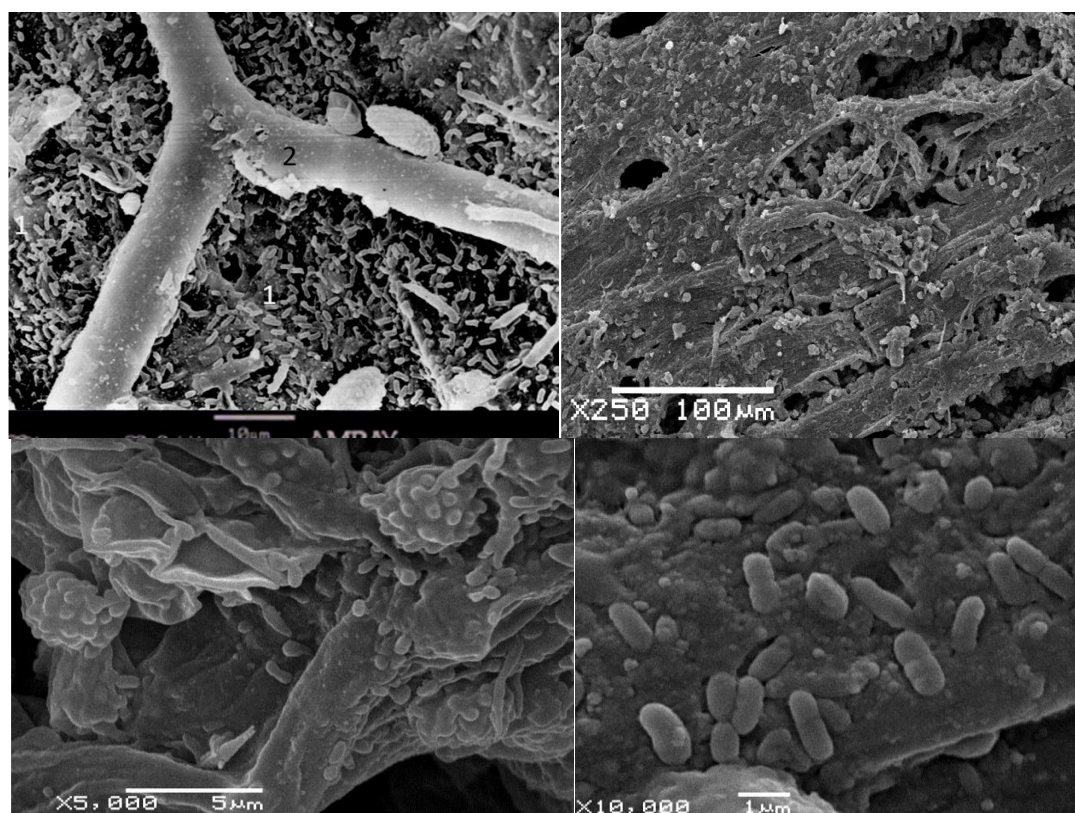


Рисунок 37. Поверхность воздушных корней *Acaempe praemorsa*. Фрагменты корневой поверхности при разном увеличении, на которых отчётливо видно микробное сообщество, формирующееся на поверхности корня и имеющее объёмную структуру, в котором отдельные клетки микроорганизмов объединяются в микроколонии и агрегаты, покрытые общим матриксом (слизью). Также клетки гетеротрофных бактерий адгезируются к более крупным клеткам других микроорганизмов (нитчатые цианобактерии). 1 – бактерии, 2 – грибные гифы. СЭМ (вверху слева - источник: Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003а).

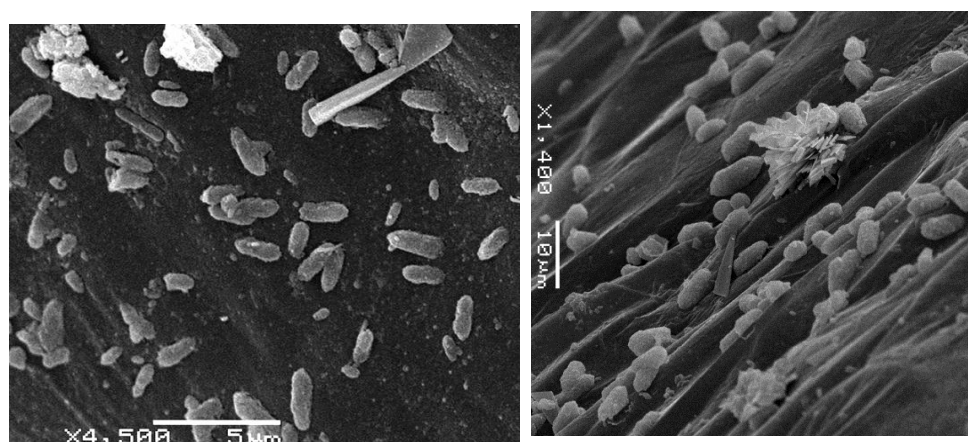


Рисунок 38. Поверхность воздушных корней *Dendrobium moschatum* с клетками бактерий, располагающихся в "морщинистых" углублениях поверхности, кристаллические образования – рафиды. СЭМ.

На воздушных корнях орхидей часто обнаруживаются кристаллы: рафиды (игольчатые кристаллы) и друзы (шаровидные образования) оксалатов кальция (рис. 38, 40), с помощью которых растения избавляются от продуктов обмена, таких как, например, щавелевая кислота.

Условия выращивания изученных растений отличаются не только по климатическим составляющим, но и по типу их культивирования. Так, в отличие от *Phalaenopsis amabilis* и *Dendrobium bigibbum*, которые произрастают на инертных носителях и формируют исключительно воздушные корни, горшечное выращивание других эпифитов, *A. praemorsa* и *D. moschatum*, позволяет им формировать оба типа корней: воздушные и погруженные, подземные – субстратные корни. Ранее при изучении субстратных корней этих растений с помощью СЭМ нами было отмечено, что визуальную их поверхность в меньшей степени заселена бактериями, чем ризоплана воздушных корней, но гифы грибов присутствовали на поверхности и воздушных, и субстратных корней всех исследованных эпифитных орхидей (Цавкелова и др., 2001; 2003а, б; Цавкелова, 2003). Также при изучении срезов субстратных корней ранее нами было достоверно показано присутствие микоризообразующих грибов, проникающих в коровую паренхиму, а также образующих пелотоны (полупереваренная ферментами растения-хозяина грибная масса, формирующая скрученные плотные клубки), которые характерны для эндомикоризы орхидных и являются для растения источником питательных веществ (рис. 39).

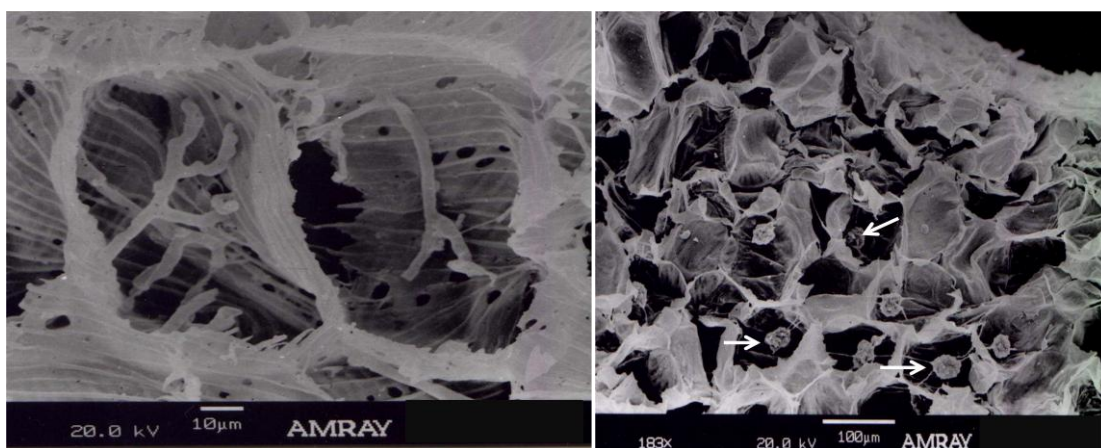


Рисунок 39. Грибные гифы в субстратных корнях *Dendrobium moschatum* (слева) и пелотоны (отмечены стрелками) в коровой паренхиме *Acampe praemorsa* (справа). СЭМ (Источник: Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003в).

Таким образом, облиственные орхидеи *A. praemorsa* и *D. moschatum*, несмотря на то что они являются генеративно-зрелыми и фотосинтетически активными, продолжают сохранять тесные взаимоотношения с микоризообразующими грибами в условиях искусственного культивирования. При этом, в последующих исследованиях в срезах воздушных корней этих двух растений эндофитного присутствия микоризообразующих грибов обнаружено не было, что подтверждает тот факт, что воздушные корни эпифитов, не соприкасающиеся с субстратом, не имеют микоризы, и она полностью отсутствует в фотосинтезирующих частях их корней (Katiyar et al., 1986; Залукаева, 1990; Goh et al., 1992). Ряд авторов указывает на то, что эпифитные орхидеи вообще имеют меньшую связь с микоризными грибами, чем наземные виды (Hadley and Williamson, 1972). Однако, одним из тривиальных объяснений этому может быть нехватка достаточного количества питательных веществ для собственного развития гриба, в подтверждение чего также служат полученные ранее (Цавкелова, 2003) данные об эндофитном присутствии гриба – его целых и полупереваренных гиф в коровой паренхиме воздушных корней эпифитного *Phalaenopsis amabilis* (рис. 40).

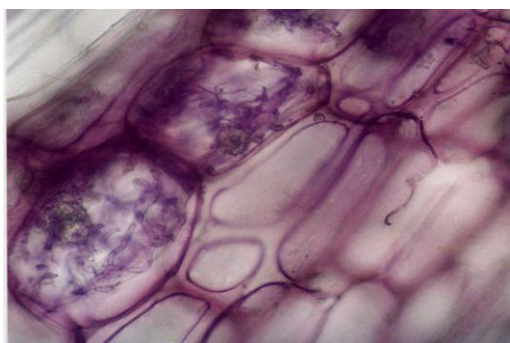


Рисунок 40. Гифы гриба-микоризообразователя в коровой паренхиме воздушных корней *Phalaenopsis amabilis*. Световая микроскопия, х 600 (источник: Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003а).

В природе сформированные воздушные корни эпифитных орхидей проникают в трещины в коре деревьев или в субстрат, который скапливается, например, в расщелинах ветвей. В искусственных же условиях культивирования на инертном носителе воздушные корни растения остаются в воздухе, не имея доступа к какому-либо субстрату. Однако, на примере изученных эпифитов *Ph. amabilis* и *D. bigibbum*, которые произрастают в оранжерейных условиях, близких к влажному тропическому климату, было показано, что микробный консорциум, состоящий из доминирующих фототрофных, преимущественно нитчатых цианобактерий, в слизи которых обитают другие ассоциативные бактерии, может выступать в качестве субстрата, необходимого и достаточного по своей питательной ценности для развития гриба-микобионта. Многие цианобактерии являются diazотрофами и именно в этом (наряду с автотрофией) заключается их роль во многих симбиозах с другими организмами. Потенциальная азотфиксирующая активность (АФА) биоплёнок,

формирующих чехол-оболочку на воздушных корнях *Ph. amabilis*, определённая нами ранее (Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003а), также оказалась высокой и составила 798,95 нмоль этилена ч⁻¹г⁻¹.

Цианобактерии, в том числе виды, вступающие в тесные взаимоотношения с партнёрами в синцианозах, проявляют широкую пластичность метаболизма, приспосабливаясь к изменяющимся условиям среды и расширяя тем самым экологическую амплитуду всего консорциума микроорганизмов в целом (Панкратова, 1987). У почвенных цианобактерий, например, отмечены (Панкратова, 2001) переходы между фотическими и ризосферными слоями, что может сопровождаться переключением на гетеротрофный тип питания. Известно, что diaзотрофные цианобактерии полностью покрывают потребности своих партнёров в азоте (Андреюк и др., 1990; Rai et al., 2000), выделяя значительное количество фиксированного азота в форме аминокислот, пептидов или амидов (Stewart, 1963; Панкратова, 1987). Количество азота, выделяемое цианобактериями, может составить 5-70% от всего фиксированного атмосферного азота (Stewart, 1983; Russow et al., 2005). Симбиотические цианобактерии передают растению-хозяину от 50% всего азота (в симбиозах с папоротником *Azolla*) до 80-90% (в симбиозе с высшим растением гуннерой). В печоночниках, мхах и папортниках азот передается в форме аммония (Bergman et al., 2007), в *Gunnera* – в виде аммония и некоторого количества аспарагина, а у цикадовых растений – через глутамин или цитруллин (Adams and Duggan, 2012).

Особенную роль этот процесс приобретает в тропических лесах, где высокие температура, осадки и относительная влажность усиливают выветривание пород, вымывание питательных веществ, а также их рециркуляцию растительностью: короткий период круговорота и низкий pH сильно выветрившихся почв еще больше снижают доступность питательных (минеральных) веществ в тропических почвах по сравнению с другими экосистемами (Jordan, 1985). В субтропических и тропических лесах питательные вещества постоянно находятся в круговороте экосистем, и большинство доступных питательных веществ (более 75%) содержатся не в почве, а в органическом веществе (Elevitch et al., 1998). Значительное обеднение тропических почв соединениями фосфора и азота подтверждается исследованиями состава почв амазонских джунглей (Davidson et al., 2004). По некоторым данным, вклад биологической фиксации азота может различаться в зависимости от почв и составлять от 0.02 до 100 кг га⁻¹ год⁻¹ (West and Skujins, 1977; Jeffries et al., 1992). На примере инзельбергов ("островная гора" – отдельный, часто куполообразный выход кристаллических пород, высотой 100 - 2000 м), расположенных в тропическом регионе, было показано, что они приобретают тёмный и даже чёрный цвет за

счёт плотного покрытия цианобактериальным сообществом (Büdel et al., 1999). Например, в сухой саванне соотношение скал, покрытых лишайниками, и скал, покрытых свободноживущими цианобактериями, составляет приблизительно 5:3, тогда как во влажных саваннах это соотношение составляет 1:26, а в тропических лесах цианобактерии практически полностью вымещают лишайники, характерные для других экосистем (Büdel et al., 1999). В других исследованиях (Dojani et al., 2007) с помощью радиоизотопного анализа было показано, что основной приток азота в почвы, располагающиеся непосредственно и рядом с инзельбергами в тропическом регионе Земли (Французская Гвиана) происходит именно за счёт активности азотфиксирующих цианобактерий и дальнейшего процесса выщелачивания.

Все эти данные свидетельствуют о том, что азот, который в большей степени является лимитирующим фактором (по сравнению с углеродом, который активно-фотосинтезирующие растения легко получают сами) для развития тропических эпифитных орхидей становится более доступным элементом, когда растение вступает в ассоциативные отношения с diaзотрофными бактериями. Поэтому растения "заинтересованы" в формировании ассоциаций с азотфиксирующими микроорганизмами, а diaзотрофные цианобактерии представляют оптимальную возможность для этого, заселяя поверхности корней и создавая микробные консорциумы.

3.1.1. Локализация микроорганизмов на корнях безлистных орхидей

Кроме облиственных эпифитных орхидей особый интерес представляют крайне малоизученные и редкие безлистные виды этих растений, у которых не формируются листовые пластинки, и тем интереснее было исследовать ассоциативные отношения этих растений с микроорганизмами, в том числе, с цианобактериями. Были впервые изучены безлистные орхидеи, исходно произрастающие в различных регионах Земли: в Юго-Восточной Азии и на о. Мадагаскар (*Chiloschista parishii* и *Microcoelia moreauae* соответственно). Их культивируют в той же оранжерее, что и облиственные горшечные орхидеи *D. moschatum* и *A. praemorsa*. Исследованные безлистные орхидеи, выращиваемые на блоках, формируют воздушные корни и не имеют типичных субстратных корней.

Корни этих растений оказались заселёнными разнообразными микроорганизмами, которые на воздушных корнях *Ch. parishii* образуют плотную биомассу, покрывающую в отдельных местах корни полностью, формируя нарастания – биоплёнки, сходные с чехлом-оболочкой облиственного эпифита *Phalaenopsis amabilis* (рис. 41).

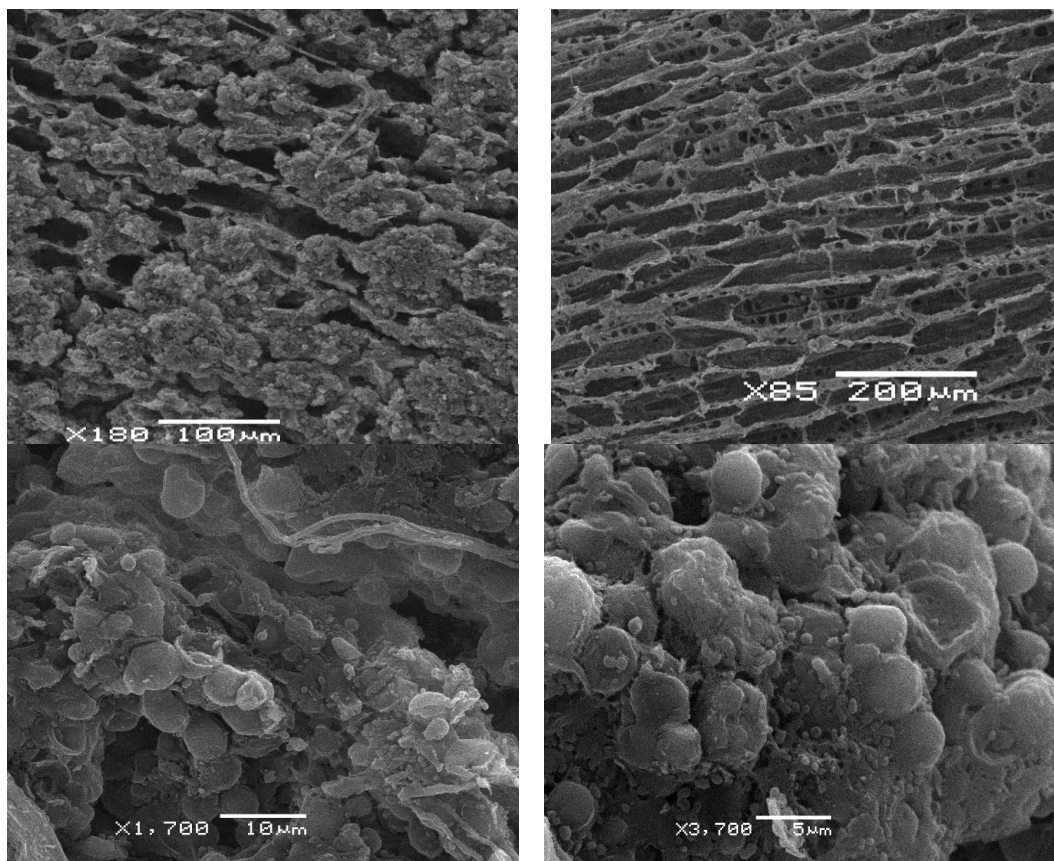


Рисунок 41. Поверхность воздушных корней *Chiloschista parishii*. Ассоциативные микроорганизмы, формирующие микробные сообщества - биоплёнки, наподобие чехла-оболочки *Ph. amabilis*. Видны гифы грибов (вверху, слева); продольный срез через веламен с щелевидными перфорациями (вверху, справа); внизу – разнообразие микроорганизмов, составляющих сообщество; отчётливо видно обилие гетеротрофных бактерий, заякоренных в слизи, в том числе образуемой другими, более крупными микроорганизмами. СЭМ.

Наличие пористого веламена и его многослойность, очевидно, также способствуют формированию ассоциативного микробного сообщества на корнях безлистных орхидей. На корнях *M. moreauae* также отмечено разнообразие ассоциативных микроорганизмов, которые образуют микропопуляции, колонизирующие углубления, бороздки и складки на поверхности корня, а также формируют более плотные нарастания, хотя и не такие массивные, как у *Ch. parishii* (рис. 42). По мере взросления корня, его обрастание микробным сообществом усиливается.

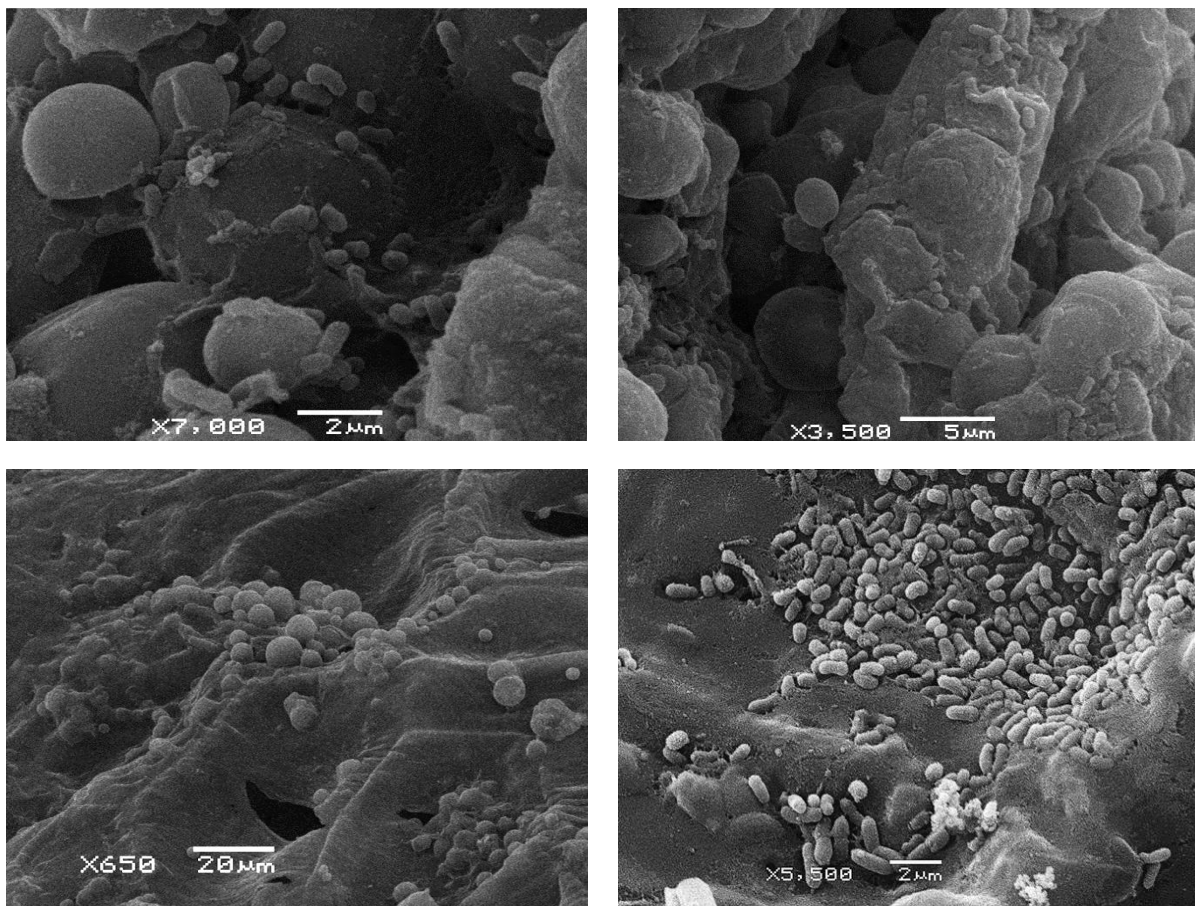


Рисунок 42. Поверхность воздушных корней *Microcoelia moreauae* с ассоциативными микроорганизмами, формирующими микробные сообщества, состоящие из гетеротрофных и фототрофных микроорганизмов на более старых корнях растения (вверху). Микроколонии микроорганизмов, располагающиеся в выемках и углублениях поверхности (внизу) на молодых корнях растения. СЭМ.

Как и у облиственных орхидей, микроорганизмы заселяют не только поверхность корней безлистных орхидей, но и проникают в веламен (рис. 43).

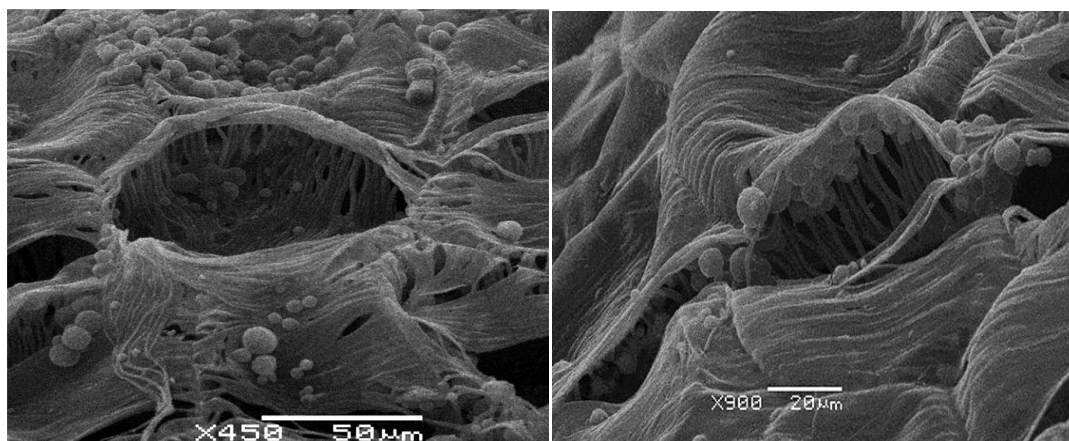


Рисунок 43. Микроорганизмы, колонизирующие веламен *Microcoelia moreauae* (внутренняя сторона внешнего слоя веламена; щелевидные перфорации веламена). СЭМ.

После того, как фрагменты корней обеих безлистных орхидей были помещены в питательную среду BG_N, то микробное цианобактериальное сообщество в оптимальных для роста накопительной культуры разрослось, формируя массивные чехлоподобные покровы (рис. 44-47), в которых отчётливо различимы нитчатые и одноклеточные формы цианобактерий, множественные клетки гетеротрофных бактерий, колонизирующих чехлы и внеклеточный матрикс цианобактерий, а также микроводоросли.

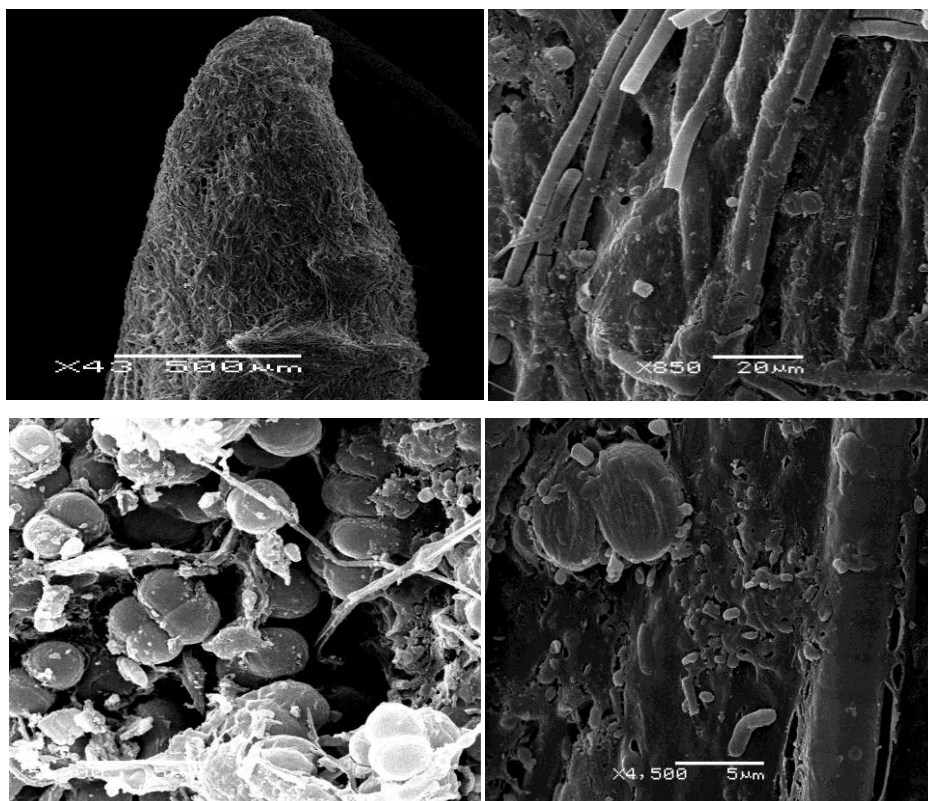


Рисунок 44. Корни *Microcoelia moreauae* в накопительной культуре на среде BG_N. Вверху слева: воздушный корень с покрывающим его цианобактериальным сообществом; вверху справа: нитчатые безгетероцистные трихомы цианобактерий, объединённые слизистым матриксом с заякоренными в нём клетками других микроорганизмов. Внизу: фрагмент поверхности с клетками, соответствующими *Synechococcus* (слева) и микроводорослям, морфологически соответствующим *Coelastrella* (справа). СЭМ.

На корнях *Ch. parishii* помимо более крупных трихомов нитчатых цианобактерий, обнаружены трихомы, по размерам и морфологии клеток напоминающие представителей, принадлежащих к *Oscillatoriales*, в частности *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium* (рис. 45). Отдельный интерес вызывает обнаружение нитчатых форм, представленных определённой пластичностью трихомов, в которых вегетативные клетки – округлые или субсферические, однако, при делении имеют более квадратичную форму (указано стрелкой на рис. 45), при этом деление происходило перпендикулярно или продольно относительно главной оси филамента, а сами трихомы легко распадаются на отдельные клетки.

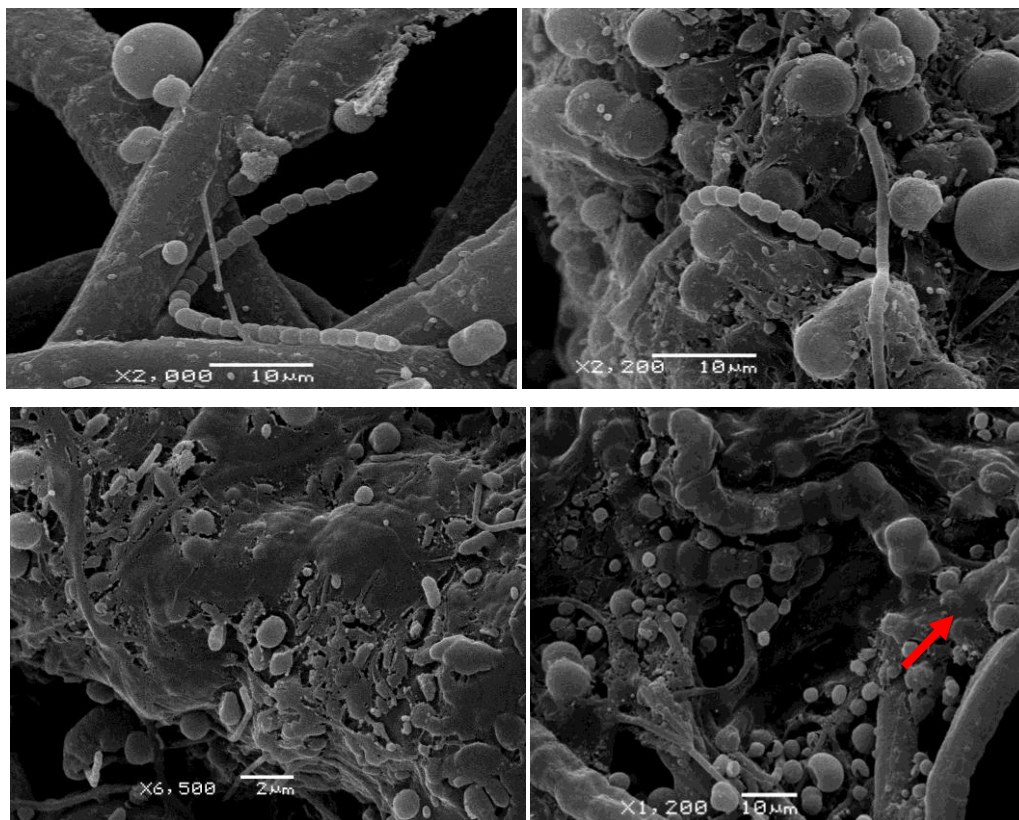


Рисунок 45. Фрагменты корней *Chiloschista parishii* в накопительной культуре на среде BG_N. Вверху – фрагменты корневой поверхности с различными представителями нитчатых цианобактерий с трихомами различного размера и формы вегетативных клеток, а также одноклеточными фототрофными организмами (цианобактерии, микроводоросли). Внизу - обилие ассоциативных гетеротрофных бактерий в составе цианобактериального микробного сообщества. Внизу справа - цианобактерии, трихомы которых представлены сферическими или субсферическими клетками, более квадратичными при делении, которое может проходить в продольном или перпендикулярном направлении (стрелка).

При инкубировании фрагментов корней на безазотистой среде BG₀, лимитированной по азоту, на корнях *M. moreauae* преимущественно развивались цианобактерии, указанные на рис. 46 – нитчатые, состоящие из округлых клеток, объединённые чехлом, но легко распадающиеся на отдельные фрагменты или клетки, кроме них в микробном сообществе встречались нитчатые филламенты осцилаторие-подобных форм (без очевидного наличия гетероцист). Тем не менее, несмотря на то что разнообразие цианобактерий и микроводорослей заметно снизилось, сопутствующие ассоциативные бактерии также активно развиваются в слизистых чехлах и выделениях диазотрофных цианобактерий.

На корнях *Ch. parishii*, как и на корнях *M. moreauae*, в безазотных условиях было отмечено обильное разрастание нитчатых осцилаторие-подобных форм, имеющих сходство по следующим признакам [ширина трихомов (2) 4–14 (18) мкм, один трихом во влагалище (присутствует облигатно или факультативно), длина клеток равна, несколько

больше или меньше ширины, нити разнообразно искривлены, могут быть переплетены между собой, отсутствие ложного ветвления, влагалища встречаются факультативно или облигатно, трихомы цилиндрические, преимущественно длинные (Виноградова и Коваленко, 2012)]. Это указывает на присутствие представителей подсемейства *Leptolyngbyoideae* (LPP группы осцилаториевых цианобактерий (Rippka et al., 1979) – ранее объединявшей представителей *Plectonema*, *Phormidium*, *Lingiba*). В то же время, прямые трихомы еще меньшего размера (0,5-3,5 мкм), состоящие из дисковидных или изодиаметрических клеток, покрытые жестким чехлом, характерны для представителей *Leptolyngibyaceae* – гетерогенного широкого семейства с тонкими и малого размера трихомами (Casamatta et al., 2005; Komárek et al., 2014).

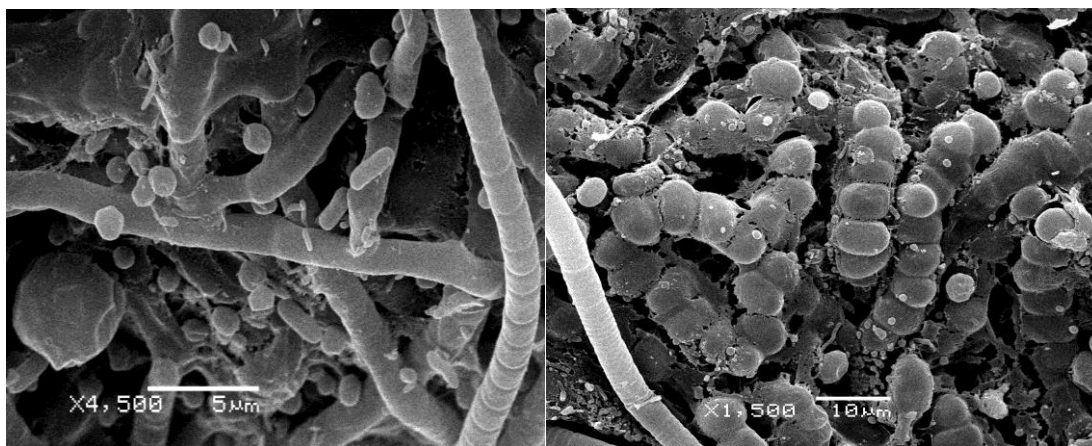


Рисунок 46. Поверхность корней *Microcoelia moreauae* в накопительной культуре на среде BG₀.

Таким образом, на корнях безлистных орхидей отмечено развитие микробных сообществ, состоящих из цианобактерий и гетеротрофных бактерий, а также микроводрослей. Для лучшей адгезии, механической защиты, а также создания более оптимальных условий локальной микросреды и защиты от воздействия внешних факторов (влажность, УФ-излучение и др.) клетки микроорганизмов заселяют прежде всего углубления и неровности на поверхности корней, прикрепляясь и формируя микроколонии, разрастающиеся затем и формирующие многослойные нарастания в виде биоплёнок или оболочек. Особенную роль цианобактерии приобретают в условиях лимитированных по азоту, когда фиксирующие атмосферный азот виды получают конкурентное преимущество. Кроме того, за счёт образуемых ими биоплёнок, выделений и слизистых чехлов они поддерживают рост и развитие микробных сообществ ризопланы безлистных орхидей, а также благоприятствуют развитию растений, создавая локальные области с органическим веществом, которое может быть использовано в качестве субстрата.

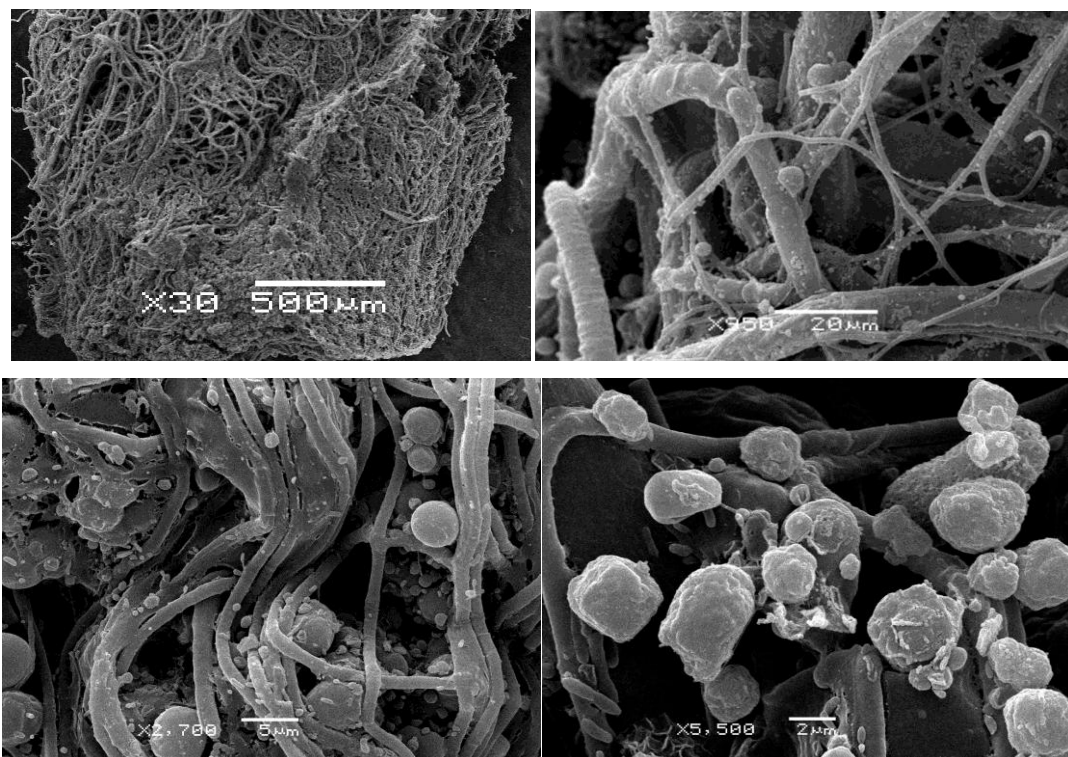


Рисунок 47. Фрагменты корней *Chiloschista parishii* в накопительной культуре на среде BG₀. Вверху - кончик корня, покрытый разросшимся цианобактериальным микробным сообществом. Нитчатые одиночные и объединённые в трихомы цианобактерии, напоминающие по своим морфологическим характеристикам и размерам представителей осцилаториевых цианобактерий из условной LPP группы. Внизу, справа, – сферические образования в условиях лимитированных по азоту по форме и размерам, сходны с акинетами, характерными для гетероцистсодержащих нитчатых цианобактерий семейства *Nostocaceae*, и находящихся на разных этапах развития.

Цианобактерии, преимущественно азотфиксирующие виды семейства *Nostocaceae*, часто являются колонизаторами бедных сред. В стрессовых условиях воздействия абиотических факторов, они структурируют и защищают почву, особенно в засушливых и полувзасушливых районах, наполняя окружающую их среду возобновляемыми источниками углерода и азота, и при этом обеспечивая устойчивый рост и развитие всего микрокосма почвенных сообществ (Домрачева, 2005; Peng and Bruns, 2019). Экзополисахариды (ЭПС), образуемые цианобактериями в виде внеклеточного полимерного матрикса, играют в этом существенную роль, структурируя и защищая природные ценозы, и создавая оптимальную среду, способствуя образованию микробных ассоциаций с различными уровнями сложности, в том числе биопленки (Rossi and Philippis, 2015). Экзополисахариды обеспечивают адгезию цианобактерий к поверхностям и их гидратацию (например, колонии *Nostoc* увеличиваются в диаметре с 50–100 мкм до 150–250 мкм после увлажнения, Belnap, 2001; Malam Issa et al., 2009), способствуют

защите от высыхания, низких температур и воздействия УФ лучей, причём как самих клеток цианобактерий, так и ассоциированных с ними других микроорганизмов. В качестве источника углерода ЭПС цианобактерий является незаменимыми в олиготрофных условиях, когда цианобактерии функционируют как основные продуценты, а сбалансированное взаимодействие с консументами позволяет микробному сообществу эффективно развиваться (Домрачева, 2005; Rossi and Philippis, 2015). Такие данные о передаче углеродсодержащих веществ подтверждаются на примере цианобактериальных сообществ, развивающихся в пустынных условиях после дождей (Thomas et al., 2008). Все эти данные свидетельствуют в поддержку полученных нами результатов о том, что на корнях эпифитных орхидей в условиях благоприятного воздействия абиотических факторов (температура и влажность) цианобактерии (большинство из которых принадлежат к азотфиксирующим видам, известным своим присутствием в синцианозах) формируют тесные ассоциативные отношения и способствуют образованию цианобактериальных сообществ, которые локально или по всей поверхности корня образуют биоплёнки, нарастающие в том числе в виде оболочки, целиком покрывающей воздушные корни.

В случае облиственных орхидей *D. moschatum* и *A. praemorsa*, культивируемых как горшечные растения, и имеющих два типа корней: воздушные и субстратные, – их корни заселены преимущественно гетеротрофными бактериями, а субстратные корни – также и грибами. Причём обсемененность ассоциативными бактериями их воздушных корней всегда значительно превышает таковую на субстратных корнях. На корнях других облиственных орхидей (*Phalaenopsis amabilis* и *Dendrobium bigibbum*), которые выращиваются на инертных подложках в условиях тёплой оранжереи и постоянно высокой влажности, формируется массивное микробное сообщество в виде чехла-оболочки корней. Нитчатые гетероцистобразующие цианобактерии семейства *Nostacaceae* играют в нём структурообразующую роль (Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003а, б), а в их слизи заякорено значительное количество гетеротрофных бактерий. Полимерный экзополисахаридный матрикс служит источником углерода и энергии для других микроорганизмов, составляющих цианобактериальный консорциум.

Для орхидей, которые не имеют листьев и у которых весь их фотосинтез осуществляется в воздушных корнях, показано, что формирование массивных нарастаний микробных сообществ происходит на их воздушных корнях. Однако такие микробные консорциумы преимущественно разрастаются на более старых участках корня (рис. 48), тогда как молодые корни активно фотосинтезируют и на них можно увидеть в основном лишь микроколонии гетеротрофных бактерий.



Рисунок 48. *Microcoelia moreauae*, формирующая розетку корней при культивировании на блоке из сосновой коры в оранжерейных условиях (справа). *Dendrobium moschatum* (справа) - воздушные корни на дочерних побегах. Корни имеют серебристый цвет; различные обрастания цианобактериальным сообществом в виде налёта или плёнок отсутствуют.

Примечательным является тот факт, что безлистные орхидеи выращивают в той же оранжерее (с тем же режимом температуры и влажности), что и облиственные горшечные виды (*D. moschatum* и *A. praemorsa*), однако, воздушные корни безлистных орхидей покрыты значительно более массивными обрастаниями цианобактериального сообщества, чем воздушные корни горшечных эпифитов. Полученные нами данные позволяют сказать, что особенности биологии растения-хозяина и условия его произрастания (культивирования) являются определяющими для характера колонизации корней эпифитных орхидей ассоциативными цианобактериями. Однако даже в идентичных условиях по воздействию абиотических факторов мы наблюдали разительные отличия между фенотипическими характеристиками ассоциативных микробных сообществ (прежде всего, фототрофных микроорганизмов), что указывает на необходимость для растения, особенно безлистных видов, партнёрских взаимоотношений с ассоциативными, в том числе diazотрофными цианобактериями.

3.1.2. Локализация микроорганизмов в филлоплане орхидей

Для изучения особенностей локализации ассоциативных бактерий (АБ) в филлоплане облиственных орхидей, был исследован оранжерейный эпифит *Dendrobium moschatum*. Среди микроорганизмов наибольшее распространение на листовых пластинках при визуальной оценке имели клетки гетеротрофных бактерий, а также дрожжей, заселяющих как верхнюю, так и нижнюю поверхности листа. Клетки дрожжей, помимо отдельных клеток, также формировали типичные для представителей

филлодрожей псевдогифы из небольших цепочек удлиненных клеток (рис. 49). Истинные гифы микромицетов встречались реже. При этом цианобактерии или другие фототрофные микроорганизмы обнаружены на листовых пластинках не были.

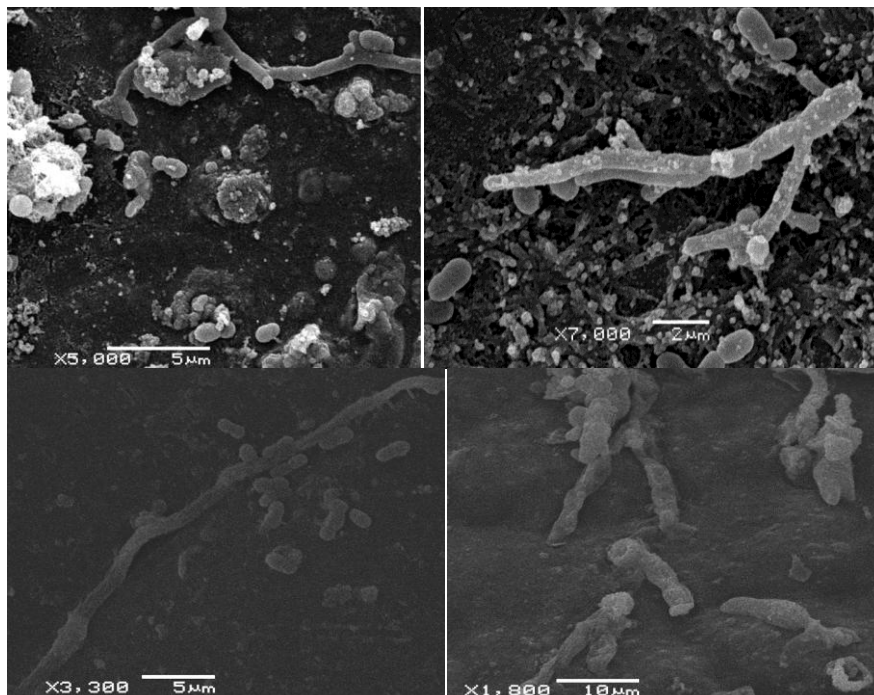


Рисунок 49. Поверхность листьев *Dendrobium moschatum*: видны клетки гетеротрофных бактерий, дрожжей и гифы микромицетов (слева внизу); микрофотографии в верхнем ряду и слева внизу – фрагменты верхней стороны листа, микрофотография снизу справа – фрагмент нижней стороны листа. СЭМ.

Имеются данные (Beattie and Lindow, 1999) о том, что нижняя сторона листа активнее колонизируется бактериями, чем верхняя за счёт наличия большего количества устьиц и более тонкого кутикулярного слоя. В наших исследованиях микроорганизмы были обнаружены в одинаковой плотности на обеих сторонах листовой пластинки и значительных визуальных различий обнаружено не было. Также ряд авторов указывает на то, что филлобактерии, заселяющие лист, не заполняют поверхность равномерно, предпочитая колонизировать основания трихомов (выросты эпидермы) и устьиц, или же встречаясь в основании соединения эпидермальных клеток листа или в желобках вдоль жилок листа (Beattie and Lindow, 1999). В филлоплане *D. moschatum*, действительно, были обнаружены бактериальные клетки, адгезированные непосредственно вокруг устьичных щелей (рис. 50), однако, не было отмечено какого-либо значимого увеличения их численности вблизи устьиц.

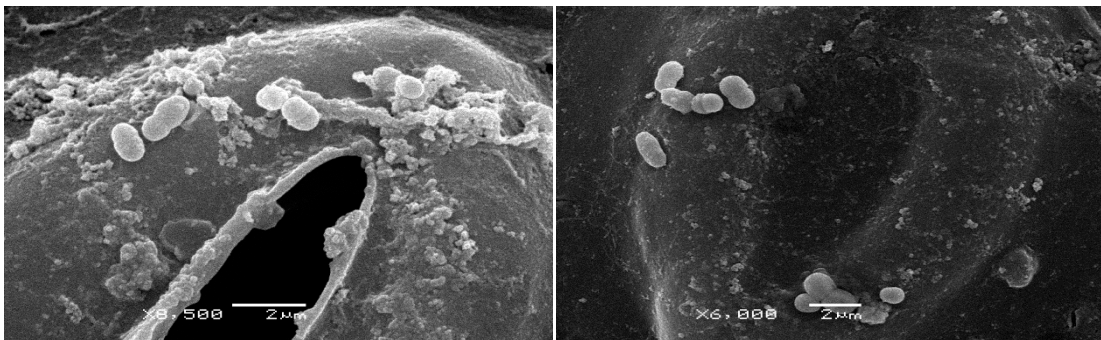


Рисунок 50. Филлоплана *Dendrobium moschatum*: клетки бактерий, адгезированные вокруг устьиц. СЭМ.

Как и в ризоплане, в филлоплане ассоциативные бактерии стараются прикрепиться на листовой пластинке и сформировать субпопуляции, предпочтительно в углублениях и лунках, "прячась" в бороздках и выступах (рис. 51). Такая механическая защита позволяет уменьшить отрицательное влияние факторов окружающей среды и успешнее сформировать колонию на поверхности листа.

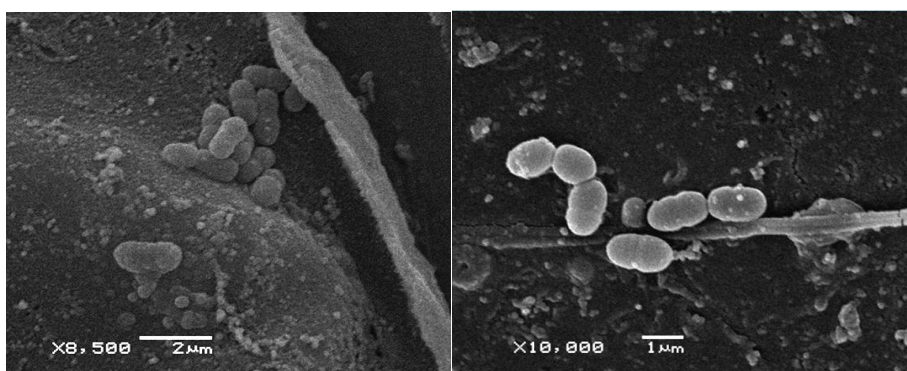


Рисунок 51. Филлоплана *Dendrobium moschatum*. Филлобактерии, локализующиеся в углублении на нижней (слева) и вокруг жилки листа на верхней стороне (справа). СЭМ.

В филлоплане *D. moschatum* не было обнаружено формирования крупных нарастаний микробных сообществ. Тем не менее, бактериальные клетки объединяются в агрегаты с помощью внеклеточного матрикса, позволяющего не только структурировать микроколонию, но и создавать и поддерживать локальную среду (Олескин и др., 2000). Вокруг отдельных клеток, заселяющих филлоплану, отчетливо видны окружающие их зоны гидролиза кутикулярных восков листовой поверхности, особенно в верхней части листовой пластинки (рис. 52).

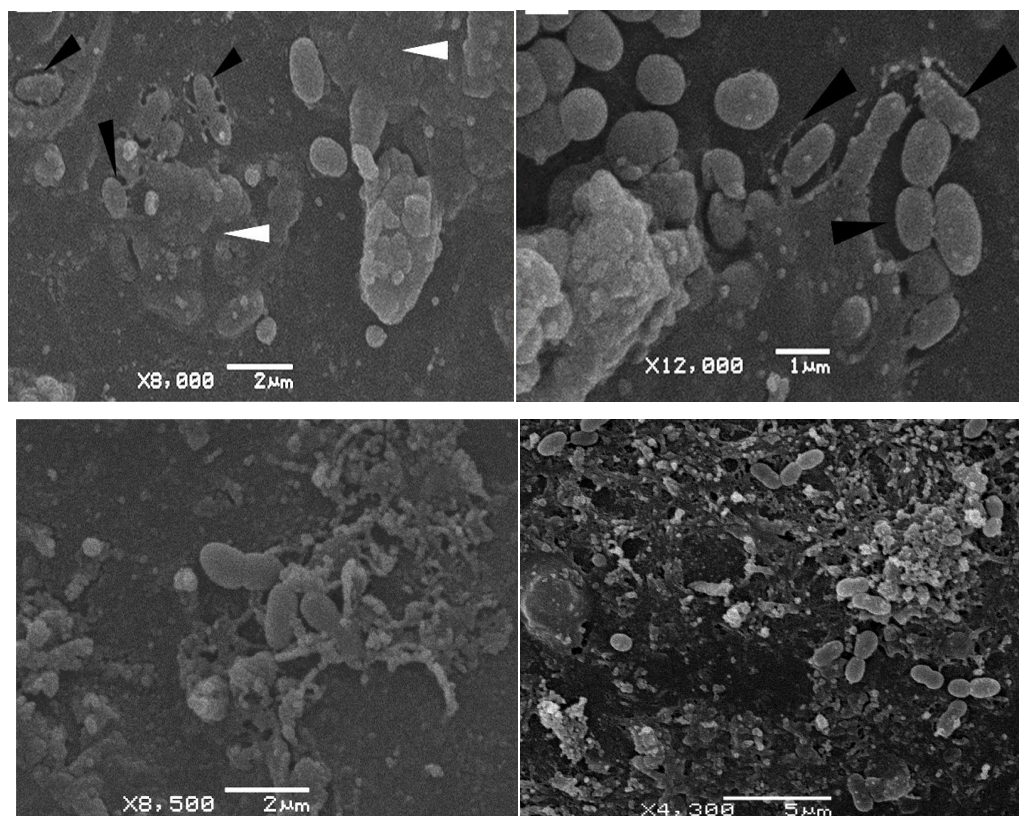


Рисунок 52. Филлоплана *Dendrobium moschatum*. Ассоциативные бактерии, покрытые внеклеточным матриксом (белые стрелки) и зона гидролиза кутикулярного слоя вокруг некоторых клеток филлобактерий (чёрные стрелки); верхняя поверхность листа (микрофотографии верхнего ряда и справа внизу). СЭМ.

При анализе локализации филлобактерий и других микроорганизмов в филлоплане дикорастущих эпифитов на примере представителя *Cymbidium* sp. были обнаружены те же характерные особенности, а именно присутствие и адгезия отдельных клеток и микроколоний бактерий, но без формирования крупных слизистых агломераций и нарастаний, а также заселение обеих сторон листовой пластинки и преимущественное присутствие гетеротрофных бактерий, а также дрожжей и гиф грибов и отсутствие цианобактерий или микроводорослей. Филлобактерии также выбирают стратегию расположения в углублениях листовой пластины, и колонизируют участки вокруг устьиц (рис. 53). Зоны гидролиза и эмульгации восков, входящих в кутикулу листа, также были отмечены на листовой пластинке дикорастущего цимбидиума.

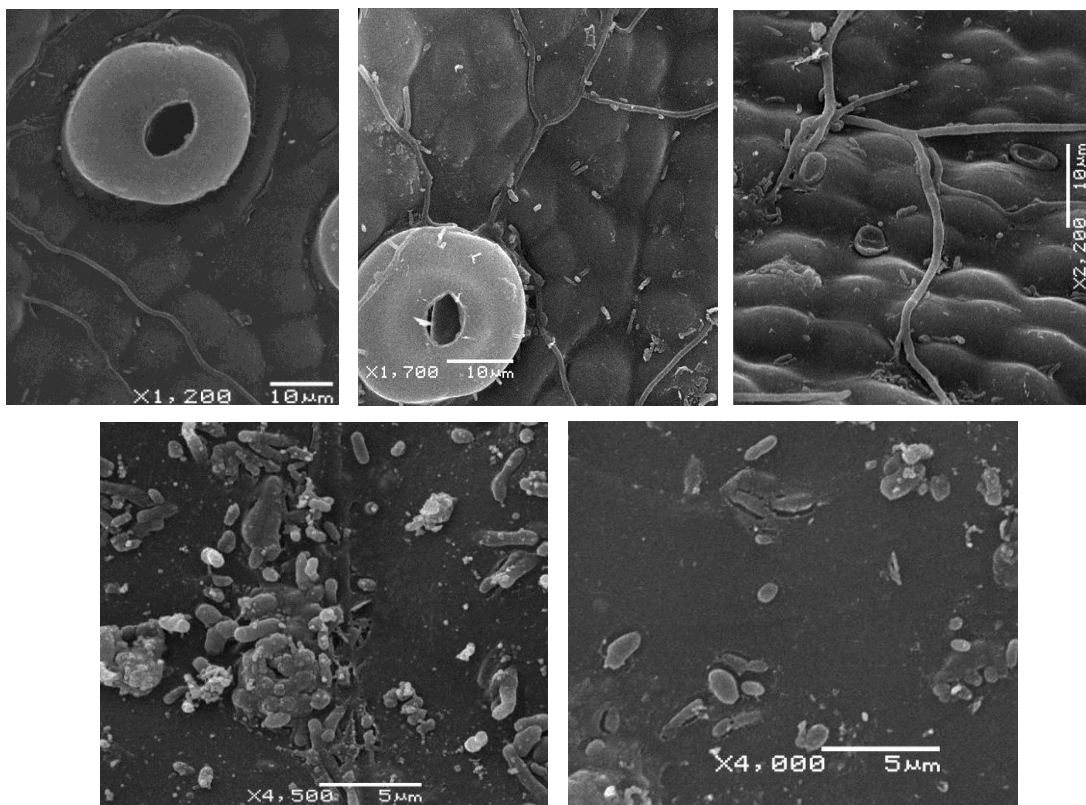


Рисунок 53. Филлоплана *Cymbidium* sp. Нижняя эпидермальная сторона листа с устьицами (верхний ряд микрофотографий), вокруг которых, а также в углублениях листовой поверхности видны клетки бактерий, а также гифы грибов, распространяющиеся по поверхности листа. Одиночные и в скоплениях клетки филлобактерий, в том числе обнаруживающих зоны гидролиза кутикулярного слоя листа. СЭМ

По некоторым данным считается, что филлоплана растений умеренного климата заселена $6,4 \times 10^8 \text{ км}^2$ бактериями. Микробные сообщества тропических филлобактерий еще более многочисленны и могут составлять 10^{26} клеток (Morris and Kinkel, 2002). Поэтому влияние филлобактерий, как на растение, на котором они обитают, так и на глобальные циклы и процессы может быть значительно более недооценённым. Преимущественно, филлоплана заселена бактериями и в некоторой степени дрожжами, а наличие мицелиальных грибов считается транзиторным (Andrews and Harris, 2000). Их присутствие увеличивается при отмирании листьев, выполняя функцию редуцентов и осуществляя активную деструкцию органического вещества.

При этом бактериальные сообщества могут значительно различаться по своему составу и количественному присутствию не только между разными растениями, но и даже внутри одного вида растений в зависимости от различных факторов: сезонности или локализации в зависимости от дистального или проксимального расположения на листовой пластинке (Dickinson et al., 1975; Hirano and Upper, 1989; Thompson et al., 1993). Условия филлосферы являются стрессовыми для большинства микроорганизмов за счёт

бедного содержания питательных веществ, недостатка гидратированности, высушивания и прямого воздействия солнечной радиации. Это вынуждает ассоциативных филлобактерий приспосабливаться, получая преимущество в конкурентных взаимоотношениях с другими микроорганизмами, тем самым создавая особое микробное сообщество филлосферы (Lindow and Brandl, 2003).

Известно, что содержание и доступность углерода (сахаров) на листовой поверхности определяет и, собственно, ограничивает размер популяций эпифитных филлобактерий (Mercier and Lindow, 2000). При этом, авторы показали, что даже в условиях полной обсемененности эпифитными бактериями на листовой поверхности остаётся некоторое количество неиспользованных сахаров, что говорит о лимитировании по влагодоступности и/или диффузии питательных веществ по всей поверхности листа, делая их малодоступными для всей популяции микроорганизмов. Наши данные также подтверждают, что ассоциативные филлобактерии, одиночные и формирующие агрегаты и микроколонии, вынуждены использовать локально доступные источники углерода, в том числе, используя гидрофобные соединения кутикулярного слоя. На примере растений фасоли было показано, что, скорее всего, листовая поверхность представляет собой гетерогенную среду с преимущественно олиготрофными условиями в отношении питательных веществ, где, однако, встречаются "оазисы" с более доступными соединениями (Leveau and Lindow, 2001). Тем не менее, на поверхности филлопланы изученных нами орхидей, можно отметить, что филлобактерии активно колонизируют кутикульные участки листа, предположительно, используя эти соединения за счёт внеклеточной активности ферментов. Среди представителей порядка актиномицетов, широко представленных в филлосфере, известны многие бактерии, способные к расщеплению и деградации сложных углерод-содержащих веществ, в том числе длинноцепочечных углеводов нефти (Banat et al., 2010). При этом, очевидно, что эти филлобактерии не наносят вреда растению и не оказывают какого-либо болезнетворного влияния или нарушения целостности листовой пластинки, подтверждая свою ассоциативную природу эпифитных колонизаторов. Это также косвенно подтверждается и другими данными о том, что фитопатогенные бактерии, колонизируя филлосферу, предпочитают не оставаться на поверхности листа, где испытывают негативное воздействие олиготрофных условий и стрессового воздействия внешних факторов, и, избегая их, сразу же вторгаются внутрь листа, в том числе проникая в подустыичные щели и другие внутренние полости (Wilson et al., 1999; Mercier and Lindow, 2000).

Таким образом, нами были выявлены и определены особенности и закономерности локализации и распределения различных ассоциативных микроорганизмов (АБ) в ризо- и

филлоплане различных видов эпифитных орхидей. Несмотря на большую подверженность воздействию абиотических факторов внешней среды, испытывая колебания по влажности, температуре и воздействию УФ-излучения, ризоплана и филлоплана орхидных представляют собой особенные и уникальные экониши для заселения микроорганизмами и формирования микробных сообществ. Консортивные связи ассоциативных микроорганизмов с растением варьируют в зависимости от особенностей биологии растения и условий их произрастания (культивирования), однако, в каждом случае направлены на структурирование и оптимизацию формирования стабильного и функционально-активного сообщества для более эффективного сосуществования всего консорциума (растение-ассоциативные микроорганизмы) в целом.

3.2. Выделение и идентификация ассоциативных микроорганизмов эпифитных орхидей

Для изучения состава сообществ ассоциативных микроорганизмов, заселяющих ризоплану, а также филлоплану эпифитных орхидей, было проведено выделение, культивирование и идентификация отдельных чистых культур бактерий и грибов, а также профилирование (на примере *D. moschatum*) микробных сообществ ризо- и филлобактерий.

3.2.1. Ассоциативные цианобактерии облиственных и безлистных орхидей

Результаты выделения и идентификации изолятов цианобактерий, заселяющих корни **облиственных эпифитных орхидей**, представлены в таблице 6. Они не только подтвердили данные микроскопии о наличии на корнях исследованных растений различных представителей цианобактерий, но и выявили доминирующие присутствие нитчатых diaзотрофных видов, принадлежащих, преимущественно, к родам *Nostoc* и *Anabaena*, а также *Calothrix* и *Scytonema* (рис. 54).

При использовании безазотистой среды, в которой культивировали фрагменты корней облиственных горшечных эпифитов *D. moschatum* и *A. praemorsa*, преимущество в развитии получали исключительно представители рода *Nostoc*, которые активно разрастались в накопительной культуре. В то же время с фрагментов корней двух других эпифитов, *Phalaenopsis amabilis* и *Dendrobium bigibbum*, формирующих исключительно воздушные корни, на которых цианобактериальное микробное сообщество образует

плёнки и чехол-оболочку, в обоих типах сред (и на полной, и на её безазотистом аналоге) цианобактерии были представлены более разнообразно и более широким спектром видов, как нитчатых, гетероцистсодержащих (*Nostoc*, *Scytonema*, *Calothrix*) и безгетероцистных (*Spirulina*, *Oscillatoria*, LPP), так и одноклеточных (Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003а, б; Tsavkelova, 2011).

Таблица 6. Доминирующие представители ассоциативных цианобактерий эпифитных облиственных орхидей (с изменениями по Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003а, б; Tsavkelova, 2011).

Орхидеи	Питательная среда	
	Безазотистая среда BGo-11	Полная среда BG-11
Субстратные корни		
<i>D. moschatum</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc</i> , LPP-группа, <i>Fischerella</i>
<i>A. praemorsa</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc</i> , <i>Oscillatoria</i> , LPP
Воздушные корни		
<i>D. moschatum</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc</i>
<i>A. praemorsa</i>	<i>Nostoc</i> , <i>Anabaena</i>	<i>Nostoc</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Calothrix</i>
<i>D. bigibbum</i> *	<i>Nostoc</i> , LPP, <i>Scytonema</i>	<i>Nostoc</i> , LPP, <i>Scytonema</i>
<i>Ph. amabilis</i> *	<i>Nostoc</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Calothrix</i> , LPP, одноклеточные цианобактерии	<i>Nostoc</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Calothrix</i> , LPP, <i>Spirulina</i> , <i>Oscillatoria</i> , одноклеточные цианобактерии

Примечания: LPP – нитчатые цианобактерии, не образующие гетероцист, относящиеся к LPP типу (*Lyngbia*, *Phormidium*, *Plectonema*).

Ранее (Цавкелова, 2003) было установлено, что изолят *Nostoc* sp., выделенный с корней горшечной облиственной *A. praemorsa* при росте в жидких средах формировал шаровидные кластеры-колонии разных размеров (рис. 54). Такие же микроколонии на среде BG_N-11 образовывал один из изолятов *Nostoc* sp., выделенный с воздушных корней *Ph. amabilis*. Известно, что на образование таких микроколоний из трихомов у представителей рода *Nostoc* влияют различные факторы, в том числе количество и состав полисахаридов, доступность света и температуры (при их низких показателях шарообразные колонии формируются активнее), а также содержание фосфора в среде (Huang et al. 1998; Deng et al., 2008; Chen et al., 2012). Известно, что в синцианозах, при компартментализации цианобактериальных партнёров внутри тканей или клеток высших растений происходят морфофизиологические изменения цианобионтов (Корженевская и др., 1999), а цианобактерии могут существовать в виде микроколоний (Горелова и Баулина, 2009).

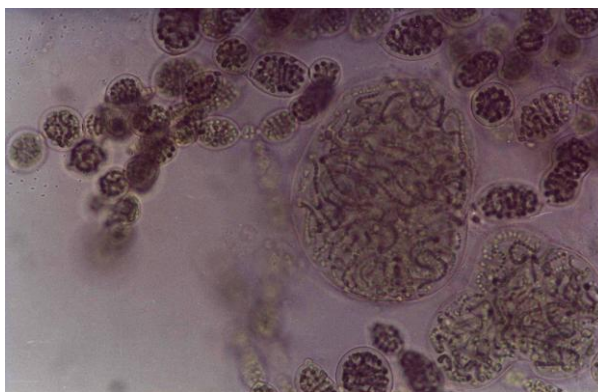


Рисунок 54. Кластеры и микроколонии *Nostoc* sp., выделенного с фрагментов воздушных корней *Asampe praemorsa*. Световая микроскопия, × 400 (Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003б).

При изучении воздушных корней эпифитных облиственных горшечных орхидей, для *D. moschatum*, культивируемого в тех же условиях, что и *A. praemorsa*, представители рода *Nostoc* были единственными выделенными с корней цианобактериями. С более крупных корней *A. praemorsa*, помимо ностока, также была изолирована культура *Anabaena* sp. Наибольшее разнообразие ассоциативных цианобактерий было отмечено у облиственных эпифитных орхидей, культивируемых в более влажных условиях в виде "блок-культуры": кроме азотфиксирующих гетероцистсодержащих нитчатых представителей в состав цианобактериального сообщества *Ph. amabilis* входят не образующие гетероцист представители *Spirulina*, *Oscillatoria*, а также одноклеточные цианобактерии и представители LPP группы (Цавкелова, 2003). Известно, что в напочвенных разрастаниях, вместе с азотфиксирующими цианобактериями, встречаются и не фиксирующие азот цианобактерии, которые усваивают внеклеточные азотсодержащие выделения diaзотрофных цианобактерий (Панкратова, 1987). При образовании на корнях биоплёнок в виде чехла-оболочки также создаются локальные микроаэробные условия, в которых азотфиксация становится возможной и для видов, не имеющих гетероцисты.

При исследовании **безлистных видов орхидей**, *Chiloschista parishii* и *Microcoelia moreauae*, также выращиваемых в блок-культуре, но в условиях оранжереи, в которой культивируют горшечные виды *D. moschatum* и *A. praemorsa*, было отмечено, что разнообразие цианобактерий, входящих в их микробное сообщество, значительно отличалось от такового у облиственных орхидей (табл. 7). Особый интерес вызвал тот факт, что представители *Nostoc* практически не обнаруживались на корнях этих безлистных орхидей, тогда как доминирующими во всех образцах корней и типах сред были представители азотфиксирующего рода *Komarekiella*.

Таблица 7. Представители ассоциативных цианобактерий эпифитных безлистных орхидей.

Безазотистая среда BGo-11	Полная среда BG-11
<i>Chiloschista parishii</i>	
Нитчатые: <i>Nostoc</i> , <i>Tolypothrix</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Komarekiella</i> , <i>Leptolyngbia</i> , <i>Pseudophormidium</i> / <i>Phormidium</i> , Одноклеточные: <i>Synechococcus</i> .	Нитчатые: <i>Tolypothrix</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Komarekiella</i> , <i>Leptolyngbia</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Pseudophormidium</i> / <i>Phormidium</i> , Одноклеточные: <i>Synechococcus</i> , <i>Microcoleus</i> .
<i>Microcoelia moreauae</i>	
<i>Komarekiella</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Pseudophormidium</i> / <i>Phormidium</i>	Нитчатые: <i>Nostoc</i> , <i>Tolypothrix</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Komarekiella</i> , <i>Leptolyngbia</i> , <i>Pseudophormidium</i> / <i>Phormidium</i> Одноклеточные: <i>Synechococcus</i> , <i>Microcoleus</i>

При получении накопительных культур цианобактерий на полной и безазотистой средах были выделены изоляты, принадлежащие к представителям нитчатых гетероцистсодержащих и безгетероцистных цианобактерий (рис. 55). Некоторое сходство по присутствию представителей *Nostoc*, *Scytonema*, LPP, *Oscillatoria*, а также наличию одноклеточных цианобактерий, биоразнообразие ассоциативных цианобактерий безлистных орхидей сходно с таковым у *Ph. amabilis*, у которого формируется наиболее мощный чехол-оболочка из цианобактериального микробного сообщества. Таким образом, тот факт, что эпифиты, выращиваемые в блок-культурах, не имеют типичного субстрата и функционально-активных субстратных корней, видимо, определяет необходимость формирования тесных ассоциативных отношений как облиственных (*Ph. amabilis*, *D. biggibum*), так и безлистных (*Ch. parishii* и *M. moreauae*) эпифитов с широким кругом diaзотрофных цианобактерий, которые отчасти заменяют субстрат, создавая массивные обрастания и биоплёнки на воздушных корнях.



Рисунок 55. Некоторые изоляты ассоциативных цианобактерий безлистных орхидей: слева направо: 1 - *Nostoc* sp., 2,3 - *Tolypothrix* sp., 4 - представители LPP группы, 5 - *Synechococcus* sp. Световая микроскопия, увеличение 1-4 – $\times 1000$, 5 – 600

Однако примечательно, что доминирующими азотфиксаторами у безлистных орхидей, в отличие от *Ph. amabilis* и *D. biggibum*, становятся не *Nostoc* и *Anabaena*, а представители рода *Komarekiella* (рис. 56), отличающегося интересным жизненным

циклом, в котором отдельные стадии сочетают равно- и неравномерное деление, образование вегетативных клеток и гетероцист и формирование микроколоний. *Komarekiella atlantica* были выделены из дождевого леса в Бразилии и лишь недавно (Hentschke et al., 2017) этих цианобактерий, принадлежащих к семейству *Nostocaceae*, выделили в отдельный таксон.

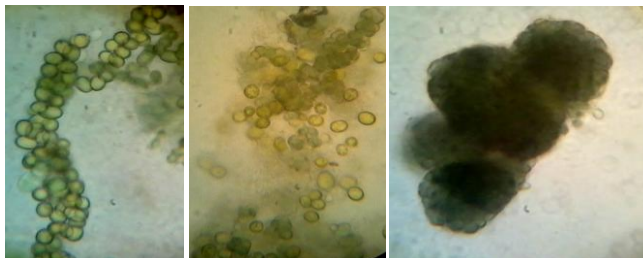


Рисунок 56. *Komarekiella* sp. - ассоциативные цианобактерии безлистных орхидей. Слева направо: 1 - *Ch. parishii*, среда BG_N-11; 2 - *M. moreauae*, среда BG_N-11; 3 - *M. moreauae*, среда без азота. Световая микроскопия, × 1000.

При том, что на полной среде разнообразие выделенных цианобактерий было сходным между растениями, в условиях, лимитированных по источнику азота, в накопительной культуре, полученной на корнях *Ch. parishii*, это разнообразие оставалось почти таким же, как и на безазотистой среде, – тогда как в безазотистой среде с корней другой орхидеи, *M. moreauae*, удалось выделить только *Komarekiella* и *Nostoc*. Как и в случае с ранее изученными облиственными орхидеями, в стрессовых условиях нехватки азота основную роль играют diaзотрофные представители семейства *Nostocaceae*.

При проведении ДГГЭ (денатурирующий градиентный гель-электрофорез; рис. 57) с помощью двух пар специфичных праймеров: CYA359F и CYA781Ra (5'-GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT-3') и CYA359F и CYA781Rb (5'-GACTACAGGGGTATCTAATCCCATT-3', Nübel et al., 1997), которые преимущественно выявляют нитчатые и одноклеточные цианобактерии, соответственно (Boutte et al., 2006) и при последующем секвенировании ДНК, элюированной из геля, результаты также подтвердили данные морфологического исследования выделенных культур (таблица 8). Именно *Komarekiella* (100% идентичности с *Komarekiella atlantica*) оказалась доминирующим видом азотфиксирующих цианобактерий, выделенным с корней обеих изученных безлистных орхидей (полосы №10, 11, 13 и 18). Помимо неё, также были получены полосы (№12, 16, 17), которые имели максимальную идентичность с представителями *Nostoc*.

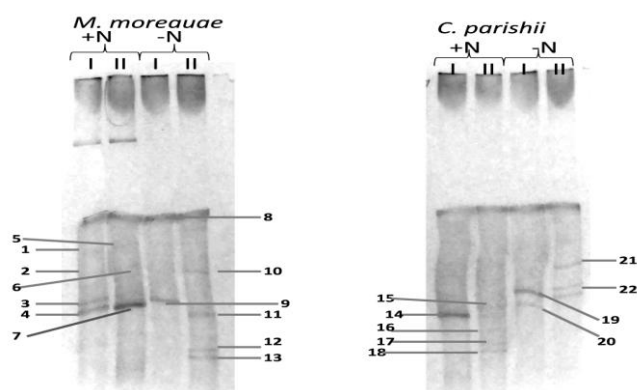


Рисунок 57. Фореграмма ДГГЭ (DGGE) анализа доминирующих популяций цианобактериальных сообществ, колонизирующих корни безлистных орхидей *Microcoelia moreauae* и *Chiloschista parishii*, культивируемых на полноценной среде с азотом BG-11 (+N) и её безазотистом аналоге BG₀ (-N). Для амплификации использовали две пары праймеров: I (CYA359F и CYA781Rb) и II (CYA359F и CYA781Ra). Указаны номера и положения полос, из которых была элюирована ДНК и получены результаты секвенирования.

Таблица 8. Результаты BLAST анализа сиквенсов, полученных после проведения ДГГЭ.

№ полос	Микроорганизм с максимальной степенью сходства по базе данных NCBI		Аффилиация идентифицируемого штамма
	Номер (ID)	Видовая принадлежность и сходство (%) по BLAST	
8, 9, 19	MF527202.1	Uncultured <i>Leptolyngbya</i> sp. clone OTU_69 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (99,8%)	<i>Leptolyngbya</i> sp.
1-4	MK487644.1	<i>Microcoleus vaginatus</i> HS092 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%)	<i>Microcoleus</i> sp.
5-7	MK771147/	<i>Oscillatoria prolifera</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%)	<i>Oscillatoria</i> sp.
14, 15	KY873318.1	<i>Pantanalinema rosanae</i> CMAA1559 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%)	<i>Pantanalinema</i> sp.
12, 16, 17	FR798938.1	<i>Nostoc</i> sp. 9E-03 partial 16S rRNA gene, strain 9E-03 (99,72%)	<i>Nostoc</i> sp.
10, 11, 13, 18, 21, 22	KX646832.1	<i>Komarekiella atlantica</i> HA4396-MV6, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%)	<i>Komarekiella</i> sp.
20	KC311916.1	<i>Pseudophormidium</i> sp. ATA5-5-1-DP06 16S ribosomal RNA gene, complete sequence (99,68%)	<i>Pseudophormidium</i> sp.

Известно, что в большинстве симбиозов с растениями участвуют представители *Nostoc*, а с грибами, формируя лишайники, и другие азотфиксирующие нитчатые виды – *Nostoc*, *Calothrix*, *Scytonema*, *Fishcerella* (Rai et al., 2019). В последнее время, однако, всё больше внимания уделяется не симбиотическим, а более широко представленным в природе ассоциативным взаимодействиям цианобактерий с растениями, например, с рисом, где различные штаммы *Nostoc* колонизируют корни не только эпифитно, но и проникают во внутриклеточные пространства (Nilsson et al., 2002). На примере

цианобактерий, принадлежащих к родам *Calothrix* и *Anabaena*, которыми инокулировали растения пшеницы, был показан вклад этих цианобактерий в улучшение качества зерна по содержанию белка и микроэлементов (Fe, Cr, Zn и Mn), что доказывает передачу азотсодержащих соединений (фиксированного азота) от цианобактерий к растению даже без формирования "компартиментализованного" симбиоза (Rana et al., 2012). Для *Tolypothrix*, *Komarekiella*, *Scytonema*, *Oscillatoria* и *Leptolyngbia* также показана способность заселять и образовывать обрастания на поверхности листьев и корней различных высших растений (Neustupa and Škaloud, 2008; Hentschke et al., 2017).

На примере ассоциаций с тропическими мангровыми деревьями была показана их колонизация значительным разнообразием diaзотрофных микроорганизмов, среди которых азотфиксирующие цианобактерии занимали доминирующее место. На воздушных корнях мангров (пневматофорах) было обнаружено образование массивных биоплёнок цианобактериального сообщества и отмечена зональность в распределении цианобактерий: нижняя часть корней была заселена преимущественно безгетероцистными нитчатыми цианобактериями *Lyngbya* sp. и *Oscillatoria* sp., центральная часть – нитчатыми гетероцистсодержащими *Anabaena* sp., а верхняя часть – коккоидными, *Aphanothece*-подобными цианобактериями (Toledo et al., 1995). Также авторы отмечают сезонные и суточные флуктуации в азотфиксации с пиками в летний период: наибольшие показатели потенциальной азотфиксации были получены в июне и составили 603.69 нмоль этилена/пкг хлорофилла в сутки. В другой тропической экосистеме – на коре деревьев, произрастающих в Яванских горных дождевых лесах, зелёные микроводоросли (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyceae*, *Trentepohlliales*) и цианобактерии также составляют основную массу микроорганизмов, причём на светлых участках леса доминировали именно цианобактерии, тогда как в теневых участках – зелёные микроводоросли. Среди цианобактерий основными изолятами оказались *Nostoc*, *Scytonema* и *Leptolyngbia*, причём *Nostoc*, подтверждая свою широкую распространённость, встречался одинаково часто и в лесных и на открытых пространствах (Neustupa and Škaloud, 2008). Особый интерес вызывает разнообразие коккоидных цианобактерий, обнаруживаемых в тропических регионах. Так, на атлантическом побережье дождевых лесов Бразилии, в наземных местах обитания, встречается широкое разнообразие видов: *Aphanothece*, *Gloeothece*, *Aphanocapsa*, *Chroococcus*, *Gloeocapsopsis*, *Gloeocapsa*, *Chroococcidiopsis* и других представителей коккоидных цианобактерий (Gama Jr. et al., 2014).

Недавно с корней эпифитной дикорастущей орхидеи *Dendrobium crumenatum* были выделены шесть изолятов цианобактерий: на воздушных корнях были обнаружены *Oscillatoria acuta*, *Nostoc carneum* и *Nostoc spongiaeforme* var. *varians*, а на субстратных

корнях – *Anabaena variabilis*, *Nostoc calcicola* и *Rivularia hansgirgi* (Ram and Shamina, 2015a). Эти же авторы (Ram and Shamina, 2015b) выделили представителей *Phormidium bohneri* и *Oscillatoria foreau* из субстратных корней наземной тропической орхидеи *Spathoglottis plicata*.

Таким образом, появляющиеся новые данные подтверждают полученные нами результаты об ассоциативных консорциумах цианобактерий с растениями, особенно формируемых в тропических условиях, об их существенной роли в структурировании микробных сообществ и участии в круговороте ряда соединений, в том числе, будучи источником питательных веществ для других микроорганизмов, составляющих растительно-микробные сообщества, включая гетеротрофные бактерии и грибы, а также об их незаменимой роли в качестве азотфиксаторов. Разнообразие и массивность развития ассоциативных цианобактерий на корнях эпифитных орхидей различается в зависимости от растений, типа их корней и условий их культивирования. Воздушные корни облиственных орхидей заселяет преимущественно *Nostoc*. На субстратных корнях горшечных облиственных растений присутствуют также безгетероцистные виды *Oscillatoria*, LPP, тогда как цианобактериальное сообщество облиственных орхидей *Ph. amabilis* и *D. biggibum*, формирующих только воздушные корни, и находящихся в оптимальных по влажности и температуре для роста цианобактерий условиях, содержит наряду с доминирующими представителями *Nostoc*, *Scytonema*, *Calothrix* и другие цианобактерии (*Spirulina*, *Oscillatoria*, а также одноклеточные виды). Наиболее широко разнообразие изолятов представлено у *Ph. amabilis*, где цианобактериальное сообщество формирует массивные биоплёнки с высокой потенциальной азотфиксирующей активностью. Примечательно, что у безлистных орхидей, выращиваемых в тех же условиях и в той же оранжерее, что и облиственные горшечные виды, разнообразие и доминирующие изоляты цианобактерий отличаются. Тогда как у горшечных видов *D. moschatum* и *A. praemorsae* это нитчатые гетероцистсодержащие виды *Nostoc*, а их распространение на корнях присутствует локально в виде небольшого налёта, то у безлистных растений цианобактерии формируют массивные биоплёнки, преимущественно на более старых участках корней (тогда как в молодых происходит фотосинтез), а наибольшее распространение получает *Komarekiella*. Отличительной особенностью цианобактериального сообщества безлистных орхидей является наличие коккоидных видов *Synechococcus* и, прежде всего, *Microcoleus*. Таким образом, именно особенности биологии орхидей и их потребности могут быть определяющими для развития орхидно-цианобактериальных сообществ и селекции подходящих партнёров.

3.2.2. Ассоциативные грибы облиственных эпифитных орхидей

Симбиотические отношения орхидей с грибами-микоризообразователями известны и широко изучаются на протяжении длительного времени, хотя до сих остаётся множество нерешённых вопросов, касающихся биоразнообразия, специфичности в выборе между растением-хозяином и основным микобионтом, условий, влияющих на успешное формирование симбиоза и стабильное существование партнёров. Изучение микоризы, прежде всего, проводят на дикорастущих растениях, а также при исследовании симбиотического прорастивания семян в условиях *in vitro*. Взаимодействие между орхидеями и микромицетами в значительной степени зависит от внешних условий и влияния абиотических факторов. Например, доступность питательных веществ и соотношение C:N существенно влияет на хрупкий баланс во взаимодействии растения и гриба (Peterson and Currah 1990) и, в крайних случаях, на переход от симбиоза к антагонизму и даже паразитизму гриба, что случается при симбиотическом культивировании орхидей *in-vitro*.

Другие исследования посвящены контролю и активности болезнетворных грибов, которые инфицируют орхидеи при их искусственном выращивании. Подобные антагонистические взаимодействия возникают при нарушении условий культивирования и наличии стрессовых факторов, а также из-за потери естественных (биотических) консортивных связей орхидей с их симбиотическими и ассоциативными партнёрами, которые обеспечивают иммунитет и повышают адаптационные свойства растения-хозяина и его устойчивость к фитопатогенам. Лишь в последнее время (Yuan et al., 2009; Chen et al., 2011; 2012) отмечен интерес среди исследователей орхидных к изучению биоразнообразия и роли ассоциативных грибов, колонизирующих их ризоплану и филлоплану. В данном исследовании, которое является продолжением полученных нами ранее пионерских результатов по выделению изолятов ассоциативных микромицетов с оранжерейных орхидей (Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003в), целью стала их идентификация с помощью молекулярно-биологических методов. Кроме того, помимо оранжерейных растений, для сравнительного анализа биоразнообразия микромицетов были также изучены представители дикорастущих тропических облиственных видов (Цавкелова и др., 2005а; Tsavkelova et al., 2008).

3.2.2.1. Микробиоты орхидей

Ранее при изучении ассоциативных микробиот, колонизирующих эпифитные горшечные облиственные орхидеи *A. praemorsa* и *D. moschatum*, которые образуют воздушные и субстратные корни, были выявлены некоторые отличия в их составе, как между растениями, так и в зависимости от типа образуемых ими корней (Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003в). Наиболее многочисленными среди всех выделенных изолятов оказались представители родов *Trichoderma*, а также *Fusarium*. Изоляты рода *Fusarium* были выделены с субстратных, но не воздушных корней и представлены следующими видами: на корнях *D. moschatum* – *Fusarium culmorum* (W. G. Smith) Sacc., *F. ventricosum* Appel et Wr, *F. solani* (Mart.) Sacc., а на корнях *A. praemorsa* – *F. oxysporum* Schlecht.: Fr. (Цавкелова и др., 2003в). В то же время представители триходермы заселяли активно и субстратные, и воздушные корни эпифитов: *Trichoderma viride* Pers.: Fr. и *T. harzianum* Rifai были выделены с корней *Acampe praemorsa*, а на корнях *Dendrobium moschatum* были обнаружены *T. virens* (Miller et al.) Arx на субстратных и *T. viride* на воздушных корнях.

Представители рода *Trichoderma* являются полиантагонистами, находясь в авангарде защиты растения от наиболее опасных фитопатогенных грибов в ризосфере растений, включая *Fusarium*, *Pythium*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* (Agrios, 1997; Александрова и др., 2000; Zeilinger and Omann, 2007; Sachdev and Singh, 2020). В основе антибиоза и микопаразитизма триходермы лежит образование целого комплекса литических ферментов, включая хитиназы, целлюлазы, протеазы, пектиназы, лакказы и другие гидролазы, а также летучих и нелетучих антимикробных соединений и антибиотиков (Kubicek, 2001; Алимова, 2006; Садыкова и др., 2015; Sachdev and Singh, 2020). Одновременная продукция и синергизм их действия (Schirmbock et al., 1994) являются эффективным защитным барьером для растения-хозяина. Кроме того, *Trichoderma* образует различные вторичные метаболиты, в том числе салициловую и жасмоновую кислоты, которые способствуют развитию местной или системной устойчивости растения-хозяина; они стимулируют рост растений и улучшают их водное и минеральное питание, в значительной степени способствуют их устойчивости в стрессовых условиях, таких как засуха, переувлажнение, повышенная минерализация, а также окислительный стресс (Sachdev and Singh, 2020). Поэтому присутствие и разнообразие видов *Trichoderma* в составе ассоциативных микробиот эпифитных орхидей в значительной степени определяет внешний иммунитет растения и оказывается исключительно благоприятным для устойчивого развития растения-хозяина.

Выделенный нами в числе ассоциативных грибов с субстратных корней акампы *Clonostachys rosea* (Цавкелова и др., 2003в) также является известным некротрофным микопаразитическим микромицетом, используемым в качестве агента биоконтроля для борьбы с целым спектром фитопатогенов, среди которых *Botrytis cinerea*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria* spp. (Hue et al., 2009; Nygren et al., 2018). Среди механизмов воздействия, как и у триходермы, выделяют прямой паразитизм на фитопатогенных грибах, антибиоз, образование литических ферментов, разрушающих клеточную стенку грибов, а также индукцию системного ответа растений и стимуляцию роста растений (Nygren et al., 2018).

Таким образом, присутствие и активное заселение ризопланы корней орхидей представителями родов *Trichoderma* и *Clonostachys* может играть значительную и решающую роль во "внешнем иммунитете" растений, защищая его от фитопатогенных видов грибов, что подчеркивает важность состава популяций ассоциативных грибов для орхидей. Примечательно, что с воздушных корней горшечных эпифитов *A. praemorsa* и *D. moschatum* вообще не были изолированы представители рода *Fusarium*, что может быть связано с неоптимальными условиями для их роста (отсутствие субстрата и необходимой влажности, прямое воздействие солнечной радиации). В этих условиях, тем не менее, биоконтролирующие грибы, наоборот, широко представлены на поверхности воздушных корней.

На воздушных корнях дендробиума мускатного удалось обнаружить представителя базидиомицетов, которые, как известно, являются основными микоризообразующими грибами орхидей; наиболее распространенные из них – телеоморфы комплексного таксона *Rhizoctonia*: родов *Tulasnella*, *Sebacina* и *Ceratobasidium* (Burgeff, 1959; Clements, 1988). При этом они проявляют двойственную природу, выступая как микоризообразователи для одних видов орхидей, и будучи патогенами для других растений, включая другие виды орхидей (Mosquera-Espinosa et al., 2013). Так, среди представителей *Ceratobasidium* и *Rhizoctonia* описано немало микоризообразователей (Arditti 1992, Otero et al., 2002, Rasmussen 2002), но другие виды являются фитопатогенами для многих сельскохозяйственных культур растений.

При изучении состава эндофитных грибов, помимо горшечных орхидей *A. praemorsa* и *D. moschatum*, с воздушных корней эпифитного *Phalaenopsis amabilis*, на поверхности которых цианобактериальное сообщество формировало плотные массивные биоплёнки, ранее (Цавкелова, 2003) нами были также изолированы различные представители триходермы (*T. viride*, *T. virens*, *T. citrinoviride*), подтверждая, что эти

грибы могут не только заселять поверхность, но и проникать во внутренние ткани корней орхидных, колонизируя, как минимум, область веламена. Наши данные согласуются с результатами других исследователей об эндофитной природе взаимодействия ряда изолятов триходермы с растениями. В исследованиях Вае с коллегами (2011) было выделено большое разнообразие видов триходермы в качестве эндофитов тропических растений, причём не только корней, но и их наземных частей (стволов, стеблей и плодов). Более того, при инокуляции выделенными изолятами растений перца, они не только оказались эндофитами, но и эффективно проявляли антимикробную активность в отношении фитопатогена *Phytophthora capsici*, индуцируя защитные реакции в растении (Bae et al., 2011). В других работах было показано, что некоторые виды триходермы проникают во внутренние ткани и колонизируют эпидермис и внешние слои коровой паренхимы растений, при этом стимулируя их рост (Martinez-Medina et al., 2011), улучшая минеральное питание и увеличивая их устойчивость к фитопатогенам (Shore et al., 2005; Korolev et al., 2008).

Большинство изолятов эндофитных грибов, выделенных нами ранее (Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003в) из внутренних тканей субстратных корней облиственных горшечных эпифитов, принадлежали к роду *Fusarium*. Поскольку видовая идентификация некоторых представителей рода *Fusarium* затруднительна при использовании исключительно морфологических признаков, а также микроскопического анализа макро- и микроконидий, – для выделенных эндофитов была проведена их молекулярно-генетическая идентификация по секвенированию фрагментов ITS области 18S рРНК (Tsavkelova et al., 2008).

Результаты секвенирования одного из представителей *Fusarium* (№1) выделенного из субстратных корней *D. moschatum*, показали его 100%-ную идентичность с видом *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg (AF291061). Этот изолят был обозначен как *F. proliferatum* ET1. Другие изоляты, охарактеризованные ранее по морфологическим признакам, как *F. oxysporum* и выделенные с субстратных корней *A. praemorsa*, показали идентичность 99% с *F. oxysporum* f. *cubense* ATCC 96285 (EF590328.1). Два других штамма с корней акампы, однако, показали идентичность с *F. chlamydosporum* (AY213655.1) и *Neonectria radicularis* (Gerlach & L. Nilsson) Mantiri & Samuels (DQ093688.1). Род *Neonectria* относится к семейству *Nectriaceae*, к которому относятся и представители рода *Fusarium*. После проведения молекулярно-биологической идентификации эндофитных грибов, заселяющих внутренние ткани субстратных корней

изученных оранжерейных орхидей, уточнённый состав ассоциативных микромицетов представлен в таблице 9.

Таблица 9. Разнообразие представителей семейства *Nectriaceae* среди эндофитных грибов облиственных оранжерейных эпифитных орхидей.

Растение	Эндофитные микромицеты
<i>Dendrobium moschatum</i>	<i>Fusarium solani</i> <i>F. proliferatum</i> <i>F. culmorum</i>
<i>Acampe praemorsa</i>	<i>F. chlamydosporum</i> <i>F. oxysporum</i> <i>Neonectria radicicola</i>

Для подтверждения таксономической принадлежности изолятов из рода *Fusarium* был также использован другой маркерный ген (*cpr*), кодирующий высококонсервативную NADPH-цитохром-Р450 редуктазу, которая используется при филогенетическом анализе представителей этого рода (Malonek et al., 2005a). Амплифицированные с помощью P138-5 и P138-6 праймеров (Tsavkelova et al., 2008) фрагменты были секвенированы и проведено филогенетическое сравнение с опубликованными ранее данными по составу видов, входящих и находящихся вне так называемого комплекса видов *Gibberella fujikuroi* (Malonek et al., 2005a). Максимальная идентичность (93%) по *cpr* гену *F. fujikuroi* была обнаружена у *F. proliferatum* ET1, который был сгруппирован с другими представителями *F. proliferatum* внутри комплекса видов *G. fujikuroi* (рис. 58). Как и ожидалось, оба штамма *F. oxysporum*, также как и *F. chlamydosporum* и *N. radicicola*, оказались расположенными вне комплекса видов *G. fujikuroi*. Анаморфы, принадлежащие этому комплексу к настоящему моменту разделены между 11-тью различными sexually fertile mating populations (от MP-A до MP-K) и более чем 35-тью несовершенными видами *Fusarium* (O'Donnell et al., 1998; Kerényi et al., 1999).

Fusarium fujikuroi и *F. proliferatum* – достаточно близкие виды (Leslie et al., 2004). Более того, в природе обнаруживаются гибриды обоих видов, что также подтверждает их близкое родство (Leslie et al., 2007). Для того, чтобы однозначно убедиться в принадлежности выделенного штамма ET1 к виду *F. proliferatum*, были амплифицированы и секвенированы фрагменты трёх дополнительных генов: IGS1 (intergenic spacer), TEF1 (фактор элонгации трансляции EF-1 α) и TUB (β -тубулин). Анализ (данные не представлены) по этим трём генам также подтвердил принадлежность выделенного штамма к виду *F. proliferatum* (Tsavkelova et al., 2008).

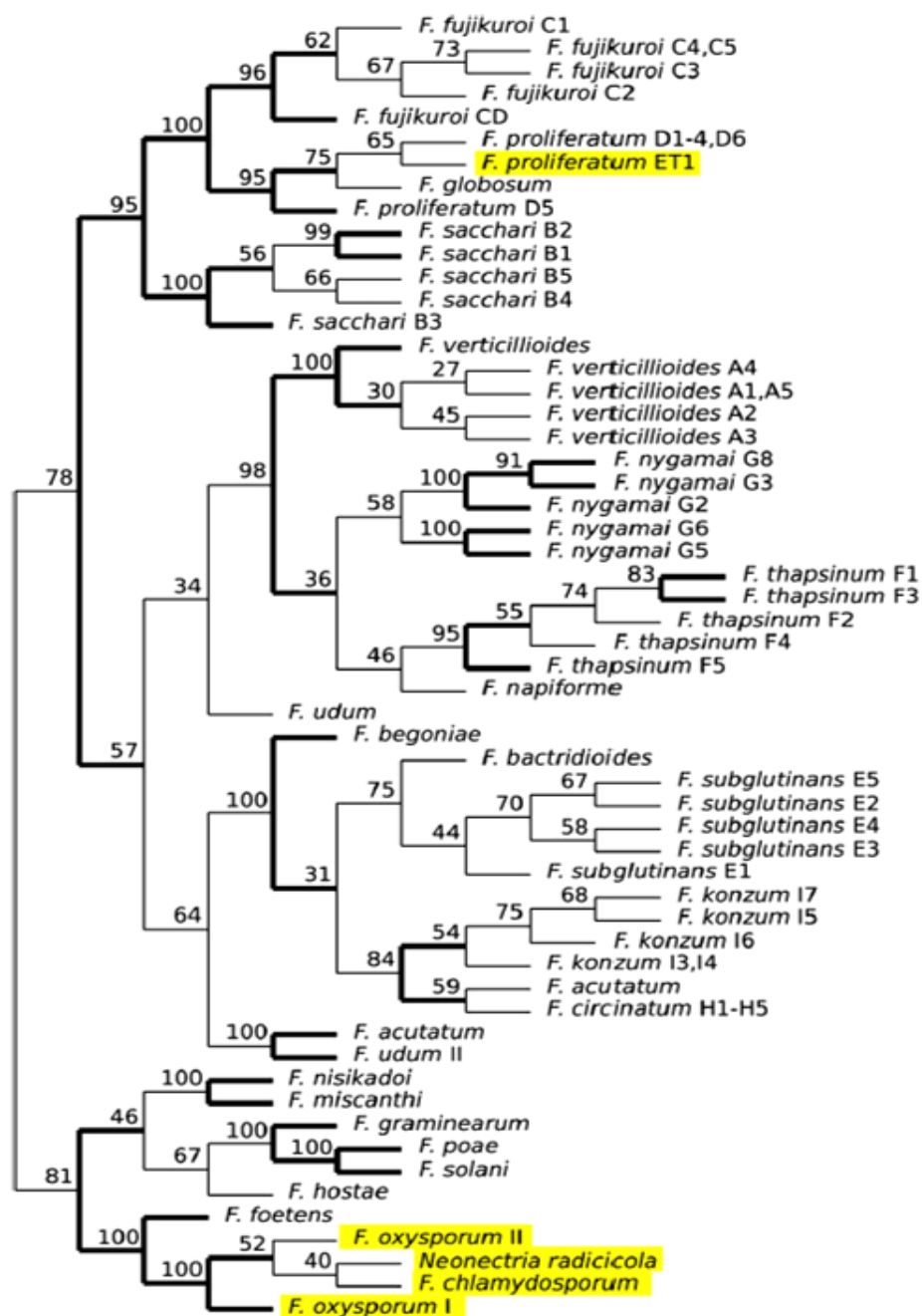


Рисунок 58. Филогенетический анализ на основе гена *cpr* представителей рода *Fusarium* (Источник: Tsavkelova et al., 2008). Консенсусное (согласованное) дерево, отражающее генетическую изменчивость видов и штаммов *Fusarium* по данным нуклеотидных последовательностей гена *cpr*. Ветвление узлов выполнено на основе 1000 повторов (реплик) методом повторной выборки (bootstrap) объединения соседей (neighbor joining). Величины bootstrap указаны как % от 1000 реплик, жирные линии указывают на величины выше, чем 75%. Жёлтым цветом выделены микромицеты, изолированные с корней орхидей. Филогенетическое дерево, взятое за основу, описано для других видов и штаммов *Fusarium* ранее (Malonek et al., 2005a).

При исследовании филлопланы *D. moschatum* с помощью сканирующей электронной микроскопии было также обнаружено большое количество дрожжей, тогда как гифы мицелиальных грибов практически отсутствовали. После идентификации

выделенных на среде ТСА колоний дрожжей с помощью амплификации участка гена 26S рРНК с использованием пары праймеров NL (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G-3') и LS2 (5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3') (Cocolin et al., 2000) и последующего секвенирования, изоляты оказались принадлежащими к трём родам: *Naganishia*, *Cryptococcus* и *Symmetrospora* (табл. 10).

Таблица 10. Ассоциативные дрожжи, выделенные из филлопланы облиственной горшечной эпифитной орхидеи *D. moschatum*.

№ изо- ля- та	Микроорганизм с максимальной степенью сходства по базе данных NCBI		Аффилиация и обозначение изолята
	Идентифика- ционный номер (ID)	Видовая принадлежность и идентичность (%)	
1	EU386724	<i>Cryptococcus flavescens</i> strain 69-10 26S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%)	<i>Cryptococcus</i> sp.
2	NG_058410	<i>Symmetrospora foliicola</i> CBS 8075 28S rRNA gene, partial sequence; from TYPE material (99%)	<i>Symmetrospora</i> sp.
3	MF462762	<i>Naganishia albidosimilis</i> isolate lhWW134 26S ribosomal RNA gene, partial sequence (99%)	<i>Naganishia</i> sp.

Известно, что филлоплана растений зачастую бывает заселена как пигментированными, принадлежащими, например, к родам *Rhodotorula* и *Sporobolomyces*, так и непигментированными видами дрожжей, – такими как *Cryptococcus* (McBride and Hayes 1977; Глушакова и Чернов, 2004; Fonseca and Inacio, 2006; Glushakova and Kachalkin, 2017). В филлоплане тропических бромелиевых (*Vriesea* sp. и *Tillandsia* sp.) встречаются дрожжи, принадлежащие к аскомицетам (*Candida* и *Debaryomyces*), а также к базидиомицетам (*Cryptococcus*, *Rhodotorula* и *Sporobolomyces*; Landell et al., 2006). Представители рода *Cryptococcus* зачастую преобладают в сообществах микромицетов на листьях различных растений, произрастающих в тропическом и умеренном регионах: у сахарного тростника (de Azeredo et al., 1998), ананаса (Robbs et al., 1989), яблони, пшеницы (McCormack et al., 1994), клёна, дуба (Inácio et al., 2002), папоротника *Athyrium filix-femina* (Golubev and Sampaio, 2009).

Представители *Symmetrospora*, выделенные недавно в результате таксономических преобразований в отдельный род, ранее относились к пигментированным базидиомицетовым дрожжам *Sporobolomyces* и *Rhodotorula* (Wang et al., 2015), которые обнаружены как эпи- и эндофиты бобовых растений (Prior et al., 2017), кукурузы и сахарного тростника (Khunnamwong et al., 2018). Род *Naganishia* изначально включал

представителей *Naganishia globosus* (Goto, 1963), которые были затем синонимизированы с представителем криптококков, *Cryptococcus saitoi* (Fonseca et al., 2011). Некоторые виды рода *Naganishia* были также ранее отнесены к другим родам дрожжей, например, *Torula*, *Torulopsis*, *Cryptococcus* и *Rhodotorula* (Liu et al., 2015). Ассоциативные представители рода *Naganishia* заселяют филлоплану таких древесных и травянистых растений, как люцерна, рукола (гусеничник посевной), бугенвиллия, барвинок, пеларгония, вербена, олива и олеандр (Sipiczki and Selim, 2019). Полифилетический род *Sporobolomyces* к настоящему времени объединяет около 20-ти видов и, как многие другие рода, включает как сапротрофные, так и патогенные виды. Эти окрашенные представители базидиомицетовых дрожжей также широко представлены в почве и филлосфере растений (Cobban et al., 2016). Как и в другие пигментированные дрожжи (*Phaffia*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*), спороболомицеты образуют каротиноиды, предохраняющие их от солнечной радиации, в том числе от фотоокисления, что немаловажно для заселяющих филлосферу микроорганизмов (Manimala and Murugesan, 2014). В работе этих авторов представители спороболомицетов были выделены из листьев многих деревьев: березы, клена, платана, ясеня, ольхи, осины, красного дуба.

Неоднократно была показана фитостимулирующая активность филлодрожжей, улучшающих адаптацию и стимулирующих рост и развитие растений. На примере эндофитного *Cryptococcus* sp., заселяющего филлоплану *Brassica chinensis*, его благотворное влияние было особенно выраженным в условиях повышенного содержания в субстрате тяжелых металлов, к которым данный вид дрожжей проявлял устойчивость (Deng et al., 2012). Конкурируя за питательные вещества с мицелиальными грибами, а также образуя антимикробные, в том числе летучие, соединения и стимулируя рост растения-хозяина, ассоциативные дрожжи выступают антагонистами ряда фитопатогенных грибов (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006). К наиболее активным агентам биоконтроля относят представителей родов *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* (Anderson et al. 1997; El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006). Таким образом, присутствие дрожжей в составе микробного сообщества филлопланы оранжерейных орхидей может способствовать повышению резистентности растения-хозяина к фитопатогенным мицелиальным микромицетам и препятствовать их проникновению и развитию на листовой пластинке растения.

3.2.2.2. Грибы, ассоциированные с дикорастущими облиственными тропическими орхидеями

Для сравнительного анализа биоразнообразия ассоциативных грибов, которые заселяют ризоплану корней тропических орхидей, наряду с оранжерейными видами, также были исследованы корни двух дикорастущих орхидей: наземной *Paphiopedilum appletonianum* (Gower) Rolfe и эпифитной *Pholidota articulata* Lindl., произрастающих в Южном Вьетнаме (провинция Фу Куок). Как и во всех предыдущих исследованиях, использовали только неповрежденные корни здоровых генеративно-зрелых растений без каких-либо признаков заболеваний. Результаты идентификации изолятов представлены в таблице 11. Из ризопланы субстратных корней наземной орхидеи были выделены *Cylindrocladium* sp., *Fusarium decemcellulare* Brick, *Pestalotiopsis maculans* (Corda) Nag Rai, *Mucor* sp., а также несколько видов рода *Trichoderma*: *T. hamatum* (Bonorden) Bainier, *T. virens* (Miller et al.) von Arx и *T. harzianum* Rifai. Также был выделен представитель базидиомицетов, относящийся к роду *Ceratobasidium* sp., а среди эндофитных ассоциативных грибов этого растения были обнаружены исключительно представители рода *Trichoderma* – *T. virens* и *T. hamatum* (Цавкелова и др., 2005а).

Разнообразие микромицетов, выделенных с корней эпифитной орхидеи *Ph. articulata* было сходным: среди доминирующих изолятов были идентифицированы представители родов *Pestalotiopsis*, *Trichoderma* и *Fusarium*. Кроме того, был выделен аскомицет, *Sordaria lappae* Potebnia, и, принадлежащий к классу *Coelomycetes*, *Cryptosporiopsis* sp. В качестве эндофитов у этой эпифитной орхидеи было выделено большее разнообразие грибов, чем у наземной *P. appletonianum*, а именно, *Fusarium flocciferum*, *Trichoderma virens*, *Pestalotiopsis maculans*, *Aureobasidium pullulans* и *Chaetospermum chaetosporum* (таблица 11).

Таблица 11. Ассоциативные грибы тропических дикорастущих облиственных орхидей

Вид орхидеи	Ризоплана	Эндофиты
<i>P. appletonianum</i>	<i>Ceratobasidium</i> sp., <i>Trichoderma hamatum</i> , <i>T. virens</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Pestalotiopsis</i> sp., <i>Fusarium decemcellulare</i> , <i>Cylindrocladium</i> sp.	<i>Trichoderma hamatum</i> , <i>T. virens</i>
<i>Ph. articulata</i>	<i>Fusarium incarnatum</i> , <i>Pestalotiopsis</i> sp., <i>Trichoderma virens</i> , <i>Sordaria</i> sp, <i>Cryptosporiopsis</i> sp.	<i>Fusarium flocciferum</i> , <i>Pestalotiopsis</i> sp., <i>T. virens</i> , <i>Chaetospermum</i> sp., <i>Aureobasidium pullulans</i>

Таким образом, среди ассоциативных микромицетов как дикорастущих, так и оранжерейных орхидей общими являются виды, принадлежащие к родам *Fusarium* и *Trichoderma*. Разнообразие представителей триходермы (*T. harzianum*, *T. virens*, *T. viride* и *T. hamatum*) также оказалось идентичным у исследуемых вьетнамских орхидей и растений, культивируемых в оранжерейных условиях. Проявляя антагонизм по отношению к целому ряду фитопатогенных грибов, триходерма, видимо, становится привлекательным партнёром для орхидей вне зависимости от условий произрастания. Род триходерма представлен несколькими видами, доминирующими среди изолятов ассоциативных микромицетов ризопланов всех изученных орхидей.

В последнее время появляется всё больше информации о роли триходермы как эндофитного гриба, проявляющего свои антагонистические свойства, в составе ассоциативных микромицетов ряда растений, включая эпифитные орхидеи. Так, среди более четырёхсот изолятов эндофитных грибов из корней десяти различных видов *Dendrobium*, произрастающих на территории Юннаня (Китай), среди доминирующих изолятов были выделены *Acremonium*, *Alternaria*, *Ampelomyces*, *Bionectria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Xylaria*, а также *Trichoderma* (Chen et al., 2011). Примечательно, что представители рода *Fusarium* присутствовали у всех изученных видов дендробиумов, тогда как остальные грибы встречались лишь у трёх-девяти проанализированных растений. Авторы также указывают на факультативность взаимодействия взрослых фотосинтетически активных орхидей с микоризообразующими грибами, типичные представители которых (базидиомицеты) не были обнаружены при анализе. В другом исследовании этих авторов (Chen et al., 2012) было показано, что из корней взрослых растений и протокормов *Dendrobium nobile* и *D. chrysanthum* было выделено более ста эндофитов, среди которых доминирующими грибами оказались микоризообразующие *Rhizoctonia*-подобные микромицеты, идентифицированные как принадлежащие к *Tulasnellales* (из протокормов *D. nobile*), *Sebacinales* (из корней *D. nobile* и из протокормов *D. chrysanthum*) и *Cantharellales* (из корней *D. nobile*). Среди эндофитных микромицетов авторы также выделили представителей *Fusarium* (*F. solani*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*) и *Trichoderma*, а кроме того, – *Xylaria*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* и *Colletotrichum*. При исследовании эндофитных микромицетов, заселяющих корни, стебли, а также листья *D. nobile*, были обнаружены *Guignardia mangiferae* (доминирующий в листьях представитель *Xylariaceae*, активно заселяющий разные части растения), а также *Phomopsis*, *Fusarium*, *Clonostachys rosea* и *Trichoderma chlorosporum*, выделенные из корней (Yuan et al., 2009). Изолят *Trichoderma* sp., в качестве эндофита из орхидеи *Pleione bulbocodioides*,

способствовал лучшему прорастанию семян этого растения (до 84,6%) по сравнению с контролем (77,6%; Yang et al., 2008).

Таким образом, всё больше современных данных подтверждают и согласуются с нашими пионерскими результатами о разнообразии ассоциативных микромицетов, формирующих необходимый консорциум эпи- и эндофитных грибов, которые долгое время оставались недооценены и которые могут играть значительную роль в здоровье и стабильном развитии растения. К настоящему моменту известно, что у фотосинтетически активных облиственных орхидей ассоциативные микромицеты, их разнообразие и численность, зачастую превышают эти показатели микоризообразующих грибов (Yuan et al., 2009). Появляющиеся новые данные свидетельствуют о тесном взаимодействии между ассоциативными и микоризообразующими грибами. Так, на примере злака плевела (*Lolium multiflorum*) и его инфицировании арбускулярным микоризообразующим грибом, *Glomus* sp., а также эндофитом, колонизирующим листья растения, *Neotyphodium occultans*, было показано, что увеличение биомассы растения-хозяина, аккумуляция питательных веществ (азот и фосфор), а также конкурентоспособность повышались именно при наличии эндофитного ассоциативного партнёра (Omacini et al., 2006). В то же время некоторые авторы (Herrera et al., 2010) предлагают не относить все грибы, выделенные даже после поверхностной стерилизации корней орхидных, к эндофитам, так как, возможно, что часть этих грибов заселяет только наружные слои веламена, который представляет многослойную структуру из мертвых клеток. Соответственно, колонизирующие только веламен грибы не могут считаться эндофитами по определению о том, что эндофиты заселяют здоровые живые ткани, не провоцируя развитие заболеваний. Однако, этот вопрос остаётся дискуссионным, поскольку старение и отмирание клеток веламена происходит в динамике его развития постоянно и его нижние слои постоянно возобновляются.

В наших исследованиях мы изучали здоровые, молодые, функционально-активные корни генеративно-зрелых растений и не выявили представителей *Xylaria* среди эндофитов. Некоторые авторы считают, что эти грибы играют свою роль прежде всего в качестве деструкторов органического вещества, переводя его в доступную форму, в том числе для растения, а также разлагая стареющие и отмирающие корни (Yuan et al., 2009). Представители разнообразного рода *Pestalotiopsis*, объединяющего сапрофитов и фитопатогенов, также встречаются среди эндофитов тропических растений: они были выделены из различных тропических эпифитных орхидей: *P. rapposa* был изолирован из корней *Epidendrum schlechterianum*, *Gongora unicolor*, *Nidema boothii*, *Maxillaria endresii* и *Pleurothallis corniculata* (Arditti and Pridgeon, 1997). Последние данные свидетельствуют о

широкой приуроченности этих микромицетов к надземным вегетативным частям орхидей: изоляты выделены из стеблей *D. nobile*, произрастающего в Китае (Yuan et al., 2009), из листьев *Camaridium micranthum* и *Ornithidium adendrobium* из Коста-Рики (Tempesta et al., 2011), из листьев эпифитных *Bulbophyllum neilgherrense* и *Pholidota pallida* индийского штата Карнатака (Sawmya et al., 2013).

Среди представителей *Cryptosporiopsis*, которые были нами обнаружены на корнях эпифитной *Ph. articulata*, выделяют ассоциативные грибы некоторых древесных растений и вересков (Verkley et al., 2003), а также эндофитов, выделенных из тропических эпифитных орхидей *Maxillaria* sp., *Pleurothallis* sp., *Stelis* (Arditti and Pridgeon, 1997) и из веламена некоторых орхидей Эквадора (Herrera et al., 2010).

Среди базидиомицетов представитель *Ceratobasidium* sp. (анаморфа *Rhizoctonia*) был изолирован нами из корней наземной *Paphiopedilum appletonianum* (табл. 14). Виды, принадлежащие к этому роду, зачастую оказываются не только эндофитами, но и истинными микоризообразующими грибами многих наземных и эпифитных орхидей, в том числе тропических видов (Otero et al., 2002). Одновременно с этим, представители *Ceratobasidium* spp. могут проявлять себя как патогены, например, газонных трав и злаков (Currah et al., 1997; Mosquera-Espinosa et al., 2013). Интересно отметить, что некоторая приуроченность к микоризообразователям этого рода наблюдается у представителей тропических орхидных из подтрибы *Oncidiinae* трибы цимбидиевых (*Cymbidieae*; Otero et al., 2002; Valadares et al., 2015), тогда как *Ceratorhiza*, – анаморфный род цератобазидиума – наиболее распространённый микобионт, выделяемый из корней многих наземных орхидей умеренной зоны (Zelmer and Currah, 1995).

Дрожжеподобный гриб *Aureobasidium pullulans*, выделенный нами как эндофит эпифитной *Ph. articulata*, является сапрофитом, широко распространенным в различных лесных, в том числе и тропических, почвах; он также широко встречается в филлоплане растений и выделяется как эндофит из коры и древесины многих деревьев (Domsch et al., 1980). Alvarez-Perez и Herrera (2013) выделили дрожжей *A. pullulans* и *Metschnikowia reukaufii* из нектара наземной микогетеротрофной Европейской орхидеи *Limodorum abortivum*.

Наряду с потенциальным микоризообразующим представителем базидиомицетов с корней обеих тропических дикорастущих орхидей, также как и из оранжевых видов, исследованных нами, были выделены изоляты, принадлежащие к различным видам *Fusarium*: *F. decemcellulare*, *F. incarnatum* и *F. flocciferum* (табл. 12) широко представлены в тропических и субтропических почвах (Domsch et al., 1980). *Fusarium decemcellulare* в качестве эндофита был выделен из лекарственного китайского растения магонии Форчуна

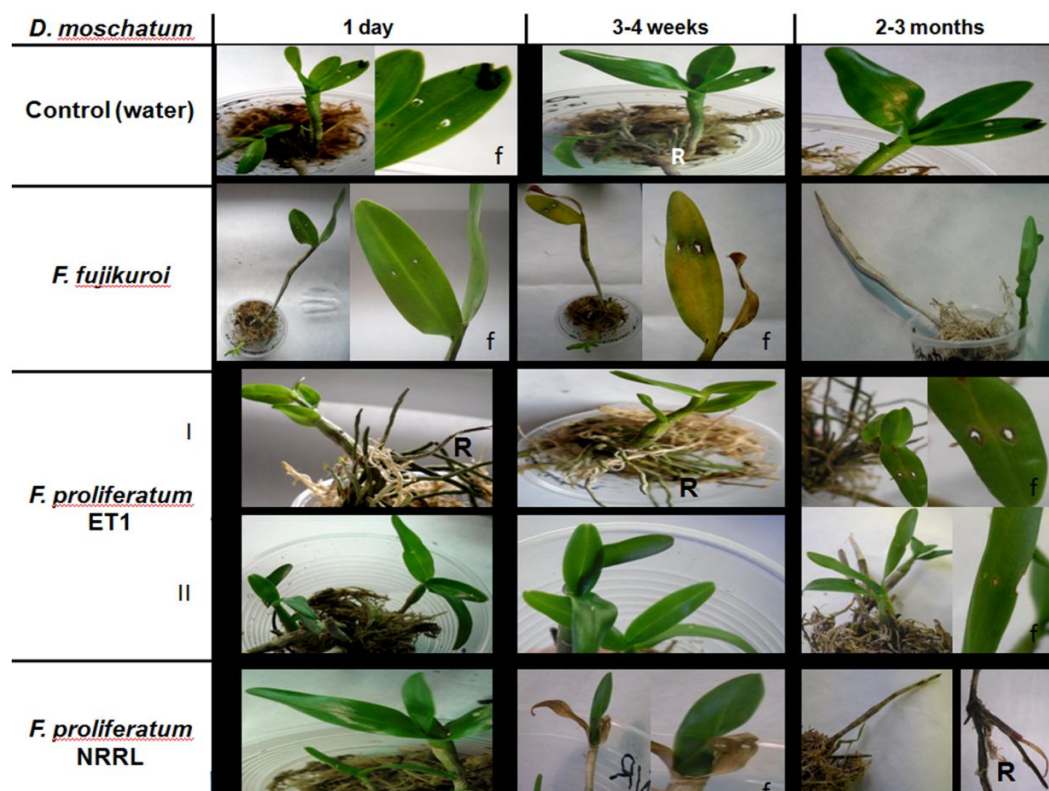
(*Mahonia fortunei*), а циклические пептиды, которые образует этот грибок, имея низкое антибактериальное действие, оказывали аллелопатическое ингибирование развития другого эндофитного гриба, *Glomerella acutata*, выделенного из этого же растения. Это подтверждает концепцию сбалансированного антагонизма, имеющего место между сообществом эндофитных микроорганизмов и растением-хозяином (Li et al., 2016). Среди фузариий встречаются патогенные и непатогенные изоляты, которые могут одновременно колонизировать ткани растений, что было показано на примере изолятов *F. decemcellulare*, выделенных из шоколадного дерева (del Castillo et al., 2016).

Фитопатогенные виды *Fusarium* провоцируют развитие заболеваний на орхидеях: вилта, пятнистости и корневой гнили, увядания и загнивания корней растений. Так, Latiffah с соавт. (2009) сообщают об изолятах *F. oxysporum*, *F. proliferatum* и *F. solani*, выделенных из инфицированных тканей *Dendrobium* sp. с симптомами корневой и стеблевой гнили. Напротив, непатогенные штаммы *F. oxysporum* и *F. solani* способствовали уменьшению развития симптомов заболеваний, вызванных фитопатогенными изолятами этого рода, что отмечено на примере различных сельскохозяйственных культур (Olivain and Alabouvette, 1997; Forsyth et al., 2006; Kavroulakis et al., 2007). Более того, для изолята *Fusarium* sp. была показана возможность стимулирования прорастания семян орхидеи *Cypripedium reginae* в условиях *in vitro* (Vujanovic et al., 2000). Таким образом, к настоящему времени получено достаточно свидетельств о том, что некоторые представители обширного рода *Fusarium* могут вступать во взаимовыгодные отношения с растением-хозяином, проявляя себя, по крайней мере, в определённых условиях, как ассоциативные и дружественные партнёры, что требует изучения возможных механизмов такой стратегии взаимодействия.

3.2.2.3. Взаимодействие изолята *F. proliferatum* ET1 с эпифитными орхидеями из рода *Dendrobium*

С целью определить характер взаимодействия между орхидеями и ассоциативными грибами, принадлежащими к роду *Fusarium*, а также исследовать потенциальную видоспецифичность во взаимоотношениях партнёров, были использованы две эпифитные оранжевые орхидеи из рода дендробиум – *D. moschatum* и *D. nobile*. Поскольку штамм *F. proliferatum* ET1 был исходно выделен из корней *D. moschatum* (Tsavkelova et al., 2008), именно это растение, а также другой эпифитный вид дендробиума, культивируемый в той же оранжерее, были выбраны для проведения биотеста (рис. 59).

A



B

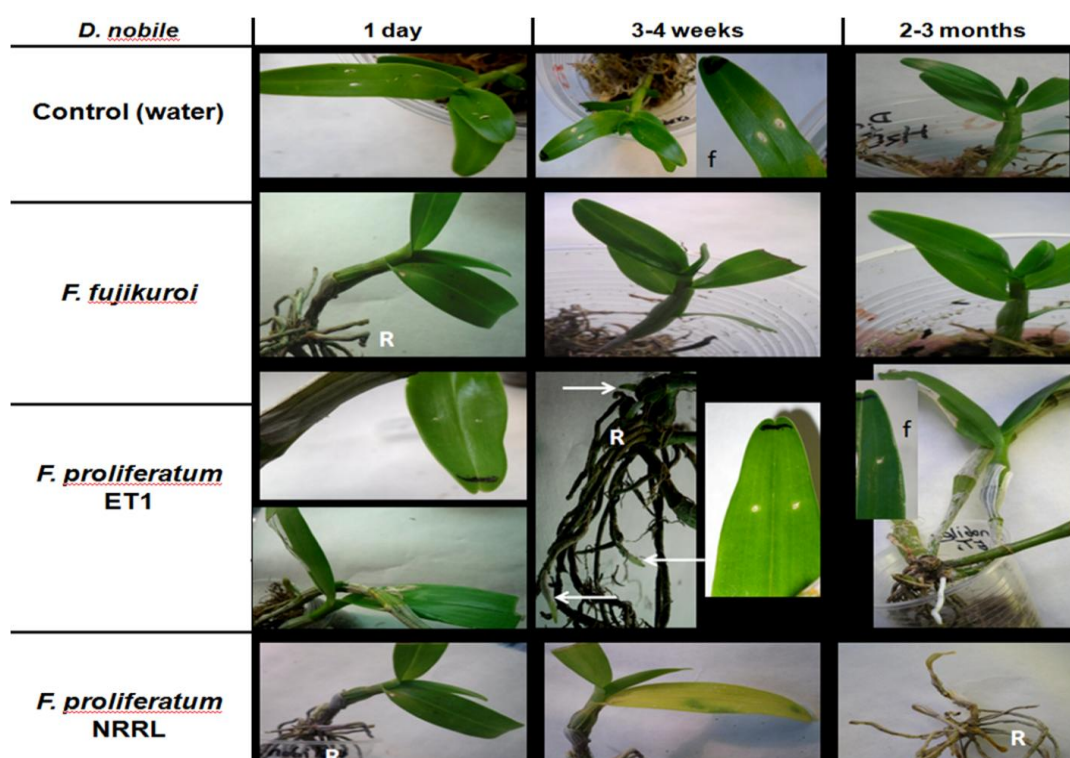


Рисунок 59. Биотест по определению воздействия ассоциативного и фитопатогенных видов *Fusarium* на эпифитные орхидеи из рода *Dendrobium*: *D. moschatum* (A) и *D. nobile* (B). Обозначения: control - контроль (обработка стерильной водой), фитопатогенный штамм *F. proliferatum* NRRL 62905; ассоциативный штамм *F. proliferatum* ET1; фитопатогенный штамм *F. fujikuroi*. R - корни; f - увеличенный фрагмент. Стрелками отмечены растущие корни.

В отличие от *F. proliferatum* ET1, два других гриба (*F. proliferatum* штамм 62905 и *F. fujikuroi*), являются известными фитопатогенами. В результате проведения биотеста, в котором инокулят вносили и на корни, и на листья опытных и контрольных растений, орхидеи показали различную реакцию на тестируемые культуры грибов. Никаких симптомов развития заболеваний не было обнаружено при инокуляции *F. proliferatum* ET1 во всех типах анализа на обоих тестируемых растениях (рис. 59).

Напротив, фитопатогенный для кукурузы штамм *F. proliferatum* NRRL 62905 вызывал полное увядание и гибель листьев *D. moschatum* и *D. nobile*, обработанных инокулятом этого гриба, а также увядание рядом расположенных (необработанных) листьев. Развитие негативных симптомов у *D. moschatum* заняло около двух недель после инокуляции, тогда как у *D. nobile* постепенное увядание обработанных листьев происходило через 4-6 недель после инокуляции. При обработке культурой фитопатогенного *F. fujikuroi* на примере *D. moschatum* были отмечены сходные симптомы увядания листьев, однако, отрицательного влияния при обработке корней не было выявлено. Более того, никаких симптомов патогенности вообще не было обнаружено для другого растения – *D. nobile* в обоих вариантах теста, что может предполагать либо видоспецифическую реакцию орхидей на инокуляцию их *F. fujikuroi*, либо более высокую невосприимчивость *D. nobile*, чем у *D. moschatum*. Для того чтобы выяснить характер взаимодействия грибов с изученными растениями, срезы их корней были изучены с помощью СЭМ. Корни, инокулированные фитопатогенным штаммом *F. proliferatum* 62905, были полностью заполнены разросшимся мицелием этого гриба; также были выявлены многочисленные симптомы разложения и деструкции растительных тканей. *Fusarium proliferatum* ET1 колонизировал внутренние ткани корней орхидей с умеренной активностью. Гифы *F. fujikuroi* в корнях *D. moschatum* и *D. nobile* проникали во внутренние ткани, используя естественные перфорации в структуре веламена (рис. 60).

Таким образом, на примере двух облиственных эпифитных орхидей из рода *Dendrobium* мы подтвердили видо- и штамм-специфическую стратегию взаимодействия с несколькими различными представителями рода *Fusarium*. В то время как эндофит *F. proliferatum* ET1, выделенный из корней *D. moschatum*, не вызывал никаких отрицательных симптомов, ни у *D. moschatum*, ни у *D. nobile*, другой фитопатогенный для растений кукурузы штамм того же вида, *F. proliferatum* 62905, разрастался во внутренних тканях корней и проявлял некротрофные свойства, что приводило к повреждениям, увяданию и гибели частей растения или всего растения. Оба штамма одного вида *Fusarium proliferatum* демонстрируют различную стратегию взаимодействия со взрослыми генеративно-зрелыми растениями *Dendrobium*.

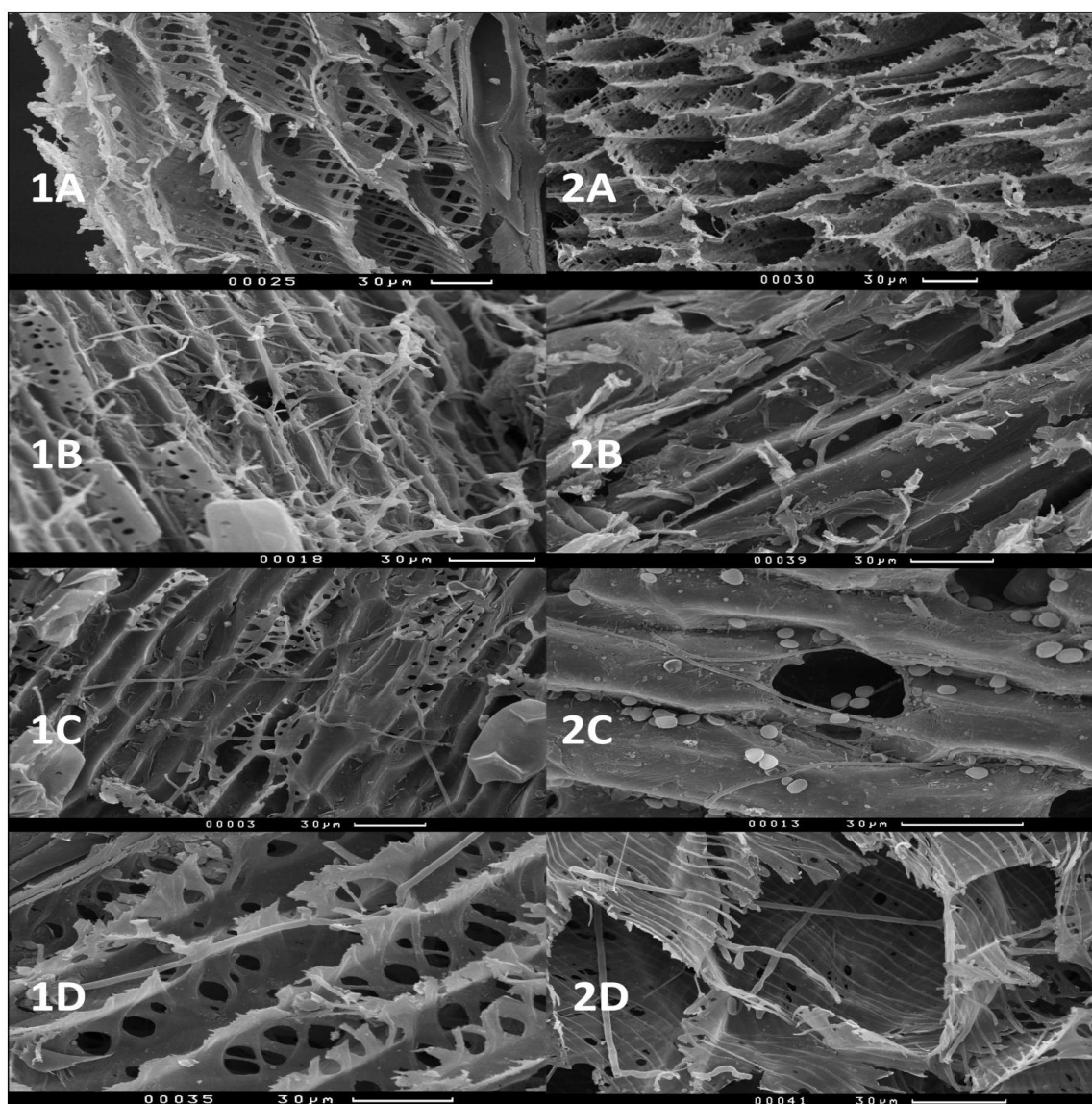


Рисунок 60. Фрагменты продольных срезов корней эпифитных орхидей: *D. moschatum* (1A-D) и *D. nobile* (2A-D), обработанных водой (контроль, A), а также культурами *F. proliferatum* 62905 (B), *F. proliferatum* ET1 (C) и *F. fujikuroi* (D). Проникновение грибных гиф внутрь корня (B-D): отмечены единичные гифы *F. proliferatum* ET1 (C) и инвазивное разрастание гиф фитопатогенного штамма *F. proliferatum* 62905 и деструкция тканей корней (B). Снимки (СЭМ) сделаны через 3 недели после инокуляции.

В то же время фитопатоген риса, *F. fujikuroi*, не вызывал подобных симптомов у *D. nobile*, однако, провоцировал обесцвечивание листьев у *D. moschatum*. Известно, что патогенные для ряда сельскохозяйственных растений штаммы *Fusarium proliferatum* образуют, кроме того, спектр микотоксиснов (фумонизины, боверицины, монилиформин; Desjardins et al., 2006), однако, потенциал токсигенности таких грибов может варьировать, например, в зависимости от температурных условий (Waskiewicz et al., 2010). Более того, отмечена штаммоспецифичность в уровне биосинтеза этих соединений: в то время как подавляющее большинство исследованных изолятов *F. proliferatum* продуцировали

умеренные количества фумонизинов (10 нг/мкл), некоторые из них образовывали более 100 нг/мкл (Stępień et al., 2015). Также широкая вариабельность и генетическая изменчивость между штаммами *F. proliferatum*, вызывающими коронную гниль у спаржи (*Asparagus officinalis*), была выявлена у них по наличию и различной активности генов *FUM*, ответственных за образование фумонизина В (von Barga et al., 2009), а некоторые изоляты *F. proliferatum*, колонизирующие корни и вегетативные части растений, не вызывали никаких симптомов заболеваний в отличие от фитопатогенных штаммов этого же вида (Stępień et al., 2015).

Таким образом, в проведённом исследовании было показано, что изолят *F. proliferatum* ET1, ранее выделенный из корней *D. moschatum*, не проявляет фитопатогенные свойства в отношении генеративно-зрелых растений, в отличие от другого агрессивно-патогенного штамма того же вида (62905). Таким образом, *F. proliferatum* ET1 можно отнести к эндофиту, что согласуется с определением Petrini и соавторов (1991), которые определяют эндофиты, как организмы, заселяющие внутренние ткани растения, без нанесения вреда растению-хозяину, по крайней мере, в определенный период совместного развития.

Ассоциативные грибы, представляющие альтернативные жизненные циклы и стратегии взаимодействия, и не проявляющие себя как патогены, повышают адаптивные и конкурентные возможности растений за счёт улучшения их минерального (например, способствуя использованию различных источников азота) и водного питания, повышения устойчивости при стрессовых воздействиях различных абиотических факторов, стимулируя их рост, повышая защитные свойства (Paparū et al., 2007; Usuki and Narisawa, 2007; Благовещенская, 2015). Сравнительный анализ разнообразия эндофитов оранжерейных и дикорастущих тропических эпифитных орхидей показал сходство по доминирующим изолятам, составляющим сообщество микромицетов ризопланы. Стратегия взаимодействия орхидей и их партнёров – прежде всего видов рода *Fusarium* и *Trichoderma*, как и других представителей ассоциативных грибов, показывает всю их сложность и зависимость консорциума от окружающих биотических и абиотических факторов, а также от иммунного статуса растения. Тем не менее, оказывается очевидным, что ассоциативные взаимоотношения с микромицетами, играют важную роль и являются необходимыми для устойчивого развития орхидей. Причём значимость таких взаимодействий и определённая "селекция" растением своих грибных партнёров, видимо, возрастает по мере "взросления" растения, тогда как микоризные взаимодействия, необходимые на этапах прорастания, у фотосинтетически активных генеративно-зрелых орхидей, особенно эпифитов, становятся не столь существенны.

3.2.3. Потенциальные биотехнологические свойства некоторых ассоциативных микроорганизмов

Среди вышерассмотренных ассоциативных микроорганизмов, заселяющих ризоплану эпифитных орхидных, нитчатые гетероцистсодержащие цианобактерии семейства *Nostocaceae* и мицелиальные грибы, принадлежащие к родам *Fusarium* и *Trichoderma*, представляют доминирующие популяции. Чтобы показать биотехнологический потенциал этих микроорганизмов, при этом отражающий их функциональную роль в микробном сообществе, мы изучили некоторые свойства и возможности их использования на примере цианобактерии *Anabaena variabilis* и гриба *Trichoderma viride*, выделенного из ризопланы воздушных корней *Dendrobium moschatum*. В качестве конечного биотехнологически-значимого продукта рассматривали возможность получения биогаза. Известно, что анаэробные метаногенные сообщества чрезвычайно разнообразны таксономически (Angelidaki et al., 2011; Цавкелова и Нетрусов, 2012). Такой консорциум бактерий и архей преобразует органическое вещество в многоступенчатом процессе биоконверсии благодаря участию гидролитиков, начинающих разложение биополимеров, синтрофных бактерий, участвующих в межвидовом переносе водорода и образующих субстраты метаногенеза (водород, углекислый газ, ацетат), а также метаногенов, которые в результате ацетокластического и/или гидрогенотрофного метаногенеза синтезируют основной компонент биогаза – метан (Stams, 1994; Schink, 1997; Sieber et al., 2010; Ali Shah et al., 2014). Использование метаногенного микробного сообщества удобно также с целью точной количественной оценки биоконверсии исходного субстрата (органического вещества) в конечный продукт – метан.

3.2.3.1. Биоразложение мортмассы цианобактерий с образованием биогаза

Как было показано выше, на воздушных корнях эпифитных орхидей, особенно в оптимальных для роста цианобактерий (по температуре и влажности) условиях, формируется массивное цианобактериальное сообщество, в котором доминирующую роль играют продуценты из семейства *Nostocaceae* (*Nostoc*, *Anabaena*, *Komarekiella*). Выделяемые корнями растений экссудаты, а также продукты метаболизма цианобактерий, в том числе азотсодержащие, образующиеся за счет высокой диазотрофной активности цианобактерий, позволяют микробному сообществу ризопланы функционировать как микробиоценоз, в котором различные группы микроорганизмов, представленные

продуцентами, консументами и редуцентами, взаимодействуют друг с другом, в том числе и в виде трофической сети. Так, формирование цианобактериальных сообществ способствует образованию своеобразного субстрата на поверхности воздушных корней, достаточного для развития микоризного гриба, образующего пелотоны в коровой паренхиме. *Phalaenopsis amabilis* (рис. 40).

Для изучения функционального потенциала ресурсной (нутриентной) роли цианобактериальных сообществ и для оценки возможности утилизации биомассы цианобактерий в качестве единственного источника углерода мы исследовали биоразложение мортмассы анабены выделенными нами ранее (Цавкелова и др., 2012а, б) термофильными метаногенными сообществами, которые были селектированы в течение нескольких пассажей на основе способности к разложению целлюлозы (фильтровальная бумага) при 55°C. Ранее (Gasanova et al., 2006a) была показана эффективная биоконверсия биомассы цианобактерий *Spirulina platensis* и *Anabaena variabilis* в биогаз, в том числе в непрерывном биореакторе с использованием мезофильного сообщества. В тоже время микробные термофильные сообщества значительно отличаются по составу входящих в их состав участников – в частности, гидролитиков и синтрофов, среди которых преобладают представители родов *Herbinix*, *Acetivibrio*, *Thermoanaerobacterium* и *Tepidanaerobacter*, что было показано нами при исследовании структуры наиболее активных целлюлозолитических сообществ (Tsavkelova et al., 2018). Кроме того, известно, что использование термофильных сообществ более эффективно, поскольку анаэробная биodeградация в этих условиях занимает меньше времени и способствует большему выходу метана (Gallert et al., 1997; Kardos et al., 2011).

В результате исследования было показано, что биоконверсия мортмассы цианобактерий проходила с неодинаковой эффективностью: некоторые анаэробные сообщества вообще не проявили метаногенной активности или содержание метана в составе биогаза не превышало 5-15% (рис. 61). Наибольшую эффективность (более 60% кумулятивного метана) проявили сообщества № 3, 4 и 7, выделенные исходно из жома красного и белого виноградов и навоза КРС (крупного рогатого скота), соответственно. Однако несмотря на то, что содержание метана в биогазе было высоким (55–64%), – при пересчете количества образовавшегося метана на г исходной биомассы субстрата значения продукции метана не превышали 4–5 ммоль $\text{CH}_4/\text{г}$ (табл. 12), тогда как эти же микробные сообщества (№ 3, 4 и 7) при конверсии в биогаз фильтровальной бумаги образовывали 16,6; 10,5 и 16,2 ммоль $\text{CH}_4/\text{г}$, соответственно (Цавкелова и др., 2012а, б).

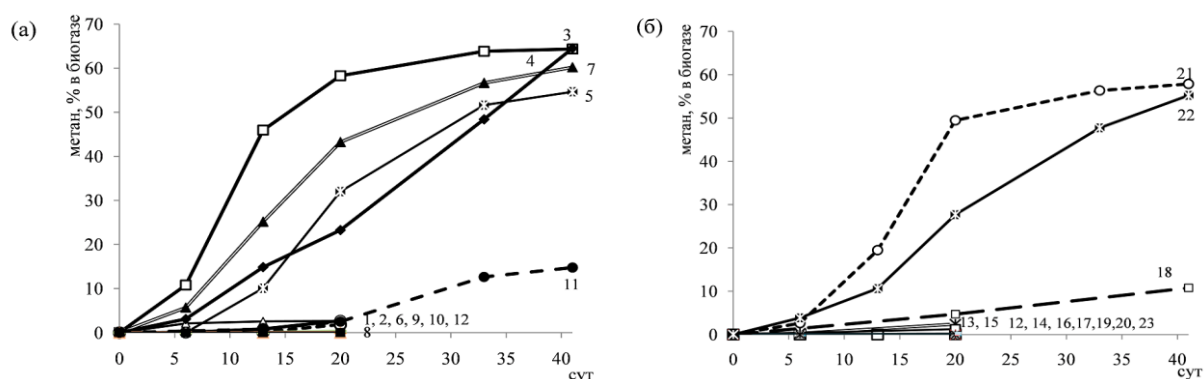


Рисунок 61. Динамика образования метана (%) термофильными микробными сообществами № 1–12 (а) и № 13–23 (б) в процессе конверсии биомассы *Anabaena variabilis* при 55°C. Данные представлены средним арифметическим из 3 повторностей; вариабельность значений внутри данных составляет не более 5-7%. Источники выделения сообществ № 1–23 описаны в разделе "Материалы и методы" (по Петрова и др., 2017).

Таблица 12. Выход метана в составе биогаза, образуемого термофильными анаэробными метаногенными сообществами при утилизации биомассы *Anabaena variabilis*.

Микробный консорциум	Выход метана	Максимальное содержание CH ₄
3	CH ₄ (%-ое содержание)	64,4 ± 3,2
	ммоль CH ₄ /г биомассы	3,8 ± 1,1
4	CH ₄ (%)	64,5 ± 5,7
	ммоль CH ₄ /г биомассы	4,9 ± 0,5
5	CH ₄ (%)	54,6 ± 2,6
	ммоль CH ₄ /г биомассы	2,3 ± 0,2
7	CH ₄ (%)	60,2 ± 3,6
	ммоль CH ₄ /г биомассы	3,6 ± 0,9
21	CH ₄ (%)	57,9 ± 2,1
	ммоль CH ₄ /г биомассы	4,1 ± 1,8
22	CH ₄ (%)	55,2 ± 1,0
	ммоль CH ₄ /г биомассы	3,2 ± 1,4

В результате проведённого исследования нам удалось показать, что биомасса цианобактерий, оставаясь даже единственным источником органического вещества, может быть использована в качестве субстрата для роста многокомпонентных микробных сообществ и достаточно эффективно переработана консорциумом микроорганизмов до конечных продуктов. Это, в свою очередь, расширяет круг используемых альтернативных субстратов для образования биогаза, учитывая, что фототрофные микроорганизмы рассматривают как альтернативный высшим растениям и перспективный источник органики при получения биотоплива (Dębowski et al., 2013; Montingelli et al., 2015). Кроме того, это еще раз подтверждает возможность утилизации мортмассы цианобактериального сообщества как субстрата для развития других микроорганизмов сообщества, в том числе, на воздушных корнях эпифитных орхидей.

Учитывая, что в экологии микроорганизмов ключевой особенностью микробных местообитаний являются гетерогенность и гетерохронность (Kozhevin et al., 2017), когда основные характеристики среды могут кардинально изменяться в пространстве и времени (включая абиотические факторы), а источником парниковых газов (CO₂, CH₄ и N₂O) становятся даже микроагрегаты почвенных частиц с включёнными в них остатками органического вещества (Wang et al., 2018), полученные нами данные целесообразны и допускают возможность наличия резких градиентов в ризоплане воздушных корней, в особенности, покрытых массивными цианобактериальными обрастаниями. В то же время, будучи активными продуцентами целого ряда внеклеточных гидролитических ферментов, грибы могут иметь преимущество в деградации цианобактериальной биомассы, таким образом, используя этот ресурс для своего роста и развития, а также для формирования симбиотических отношений микоризообразующего гриба с растением-хозяином.

3.2.3.2. Целлюлозолитическая активность *Trichoderma viride*

Грибы из рода *Trichoderma* представлены в ризоплане как оранжерейных, так и дикорастущих орхидей, колонизируя и субстратные, и воздушные корни эпифитов (табл. 9). Эти микромицеты нашли широкое применение в промышленных и биотехнологических целях, прежде всего, в качестве агента биоконтроля для борьбы с фитопатогенами растений, которые вызывают повреждения клубней или корнеплодов и провоцируют развитие корневых гнилей, а также в качестве продуцентов разнообразных высокоактивных литических ферментов (Kubicek, 2001; Алимова, 2006; Sachdev and Singh, 2020), среди которых целлюлазы занимают ведущее место. За последние десятилетия использование целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ многократно возросло, особенно в текстильной, пищевой, пивоваренной и винодельческой, а также целлюлозно-бумажной промышленности (Uhlig, 1998; Bhat, 2000). Примечательно, что значительную часть используемых ферментов, составляющих около 20% глобального рынка ферментов, производят на основе биосинтеза *Trichoderma* и *Aspergillus* (Uhlig, 1998; Bhat, 2000; Алимова, 2006). *Trichoderma reesei* наиболее изучена в качестве продуцента целлюлаз, у которой наибольшую активность проявляют две экзоглюконазы (1,4-β-D-глюкан целлобиогидролаза) – целлобиогидролаза I и целлобиогидролаза II, которые имеют разное воздействие на редуцирующие и нередуцирующие концы молекул целлюлозы; эндоглюконазы (1,4-β-D-глюкан-4-глюканогидролаза) и β-глюкозидазы. Экзоглюканазы, имеющие большее сродство к кристаллической целлюлозе, необходимы для деструкции нативной конформации целлюлозы и отщепляют целлобиозу от полисахаридной цепи;

эндоглюканазы активны на аморфных участках целлюлозы, расщепляя внутренние связи и сокращая полимеризацию цепочек, что интенсифицирует активность обеих целлобиогидролаз (Рабинович и Мельник, 2000; Сеницын и др., 2015). Интересным фактором влияния целлюлаз на микробно-растительные взаимодействия является то, что, как было показано Saravanakumar с соавторами (2016) целлюлазы, образуемые *Trichoderma harzianum*, в процессе колонизации этим грибом кукурузы, взаимодействуют с корнями растения и индуцируют его системную устойчивость, в частности к фитопатогену *Curvularia lunata*, вызывающему листовую пятнистость. Среди механизмов воздействия рассматривается своеобразная "мимикрия нападения патогенов", при которой целлюлазы, воздействуют на клеточные стенки растения (а также и патогенов), высвобождая олигосахариды (олигосахарины), которые, в свою очередь, являются элиситорами индуцированной системной устойчивости (ИСУ), повышая экспрессию генов, относящихся к регуляции за счёт жасмоновой и салициловой кислот и этилена (Saravanakumar et al., 2016; см. главу 1.4.4.3).

В наших экспериментах по изучению целлюлозолитической активности мы использовали изолят *Trichoderma viride*, выделенный с воздушных корней *D. moschatum*, который выращивали в синтетической среде Чапека–Докса; известно, что на небогатых питательных средах грибы выделяют целлюлазы в большем количестве (Padmavathi et al., 2012). В работе использовали различные типы бумаг (офисную и фильтровальную бумаги, газетную и журнальную бумаги, а также картон и смесь бумаг). Наиболее высокие показатели общей целлюлазной активности были достигнуты к 3-м сут на офисной бумаге: 0,80 Ед./мл (10,2 Ед./мг белка) и на смеси бумаг – к 7-м сут: 0,73 Ед./мл (3,0 Ед./мг белка; рис. 62). Более длительный период связан с наличием трудноразлагаемых журнальной и газетной бумаг в составе смеси, разложение которых по отдельности проходило крайне затруднительно и составило к 7-м суткам 0,43 Ед./мл (1,0 Ед./мг белка) и 0,20 Ед./мл (0,6 Ед./мг белка), соответственно. Показатели активности β -1,4-эндоглюканазы были также более высокими при разложении офисной бумаги – 0,3 Ед./мл (3,7 Ед./мг белка), смеси бумаг – 0,25 Ед./мл (0,9 Ед./мг белка) и картона – 0,28 Ед./мл (0,86 Ед./мг белка). Полученные нами результаты не противоречат данным других исследователей, указывающим на то, что, например, общая целлюлозолитическая активность *T. viride* QM 9123 на среде с ячменной соломой составляла 0,8 Ед./мл (Peitersen et al., 1975), а активность эндоглюканазы *T. reesei* QM 9414 на микрокристаллической целлюлозе составляла 0,4-0,5 Ед./мл (Kubicek, 1981).

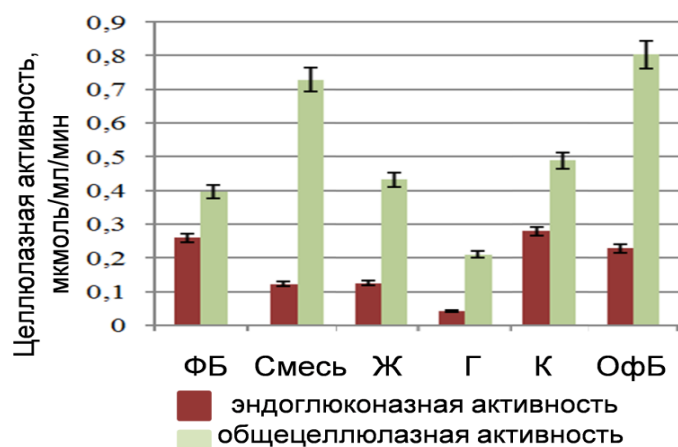


Рисунок 62. Максимальные значения активностей целлюлозолитических ферментов *Trichoderma viride* при культивировании на различных типах бумаг. Обозначения: ФБ - фильтровальная бумага; смесь - смесь всех типов бумаг; Ж - журнальная бумага; Г - газетная бумага; К - картон; ОфБ - офисная бумага (с изменениями по Прокудина и др., 2016).

При добавлении к среде сахарозы в качестве ко-субстрата, она увеличивала выход β -1,4-эндоглюканазы на третьи сутки культивирования на журнальной бумаге – в 1,4 раза, на газетной бумаге – в 5 раз и на смеси бумаг – в 2 раза (рис. 63).

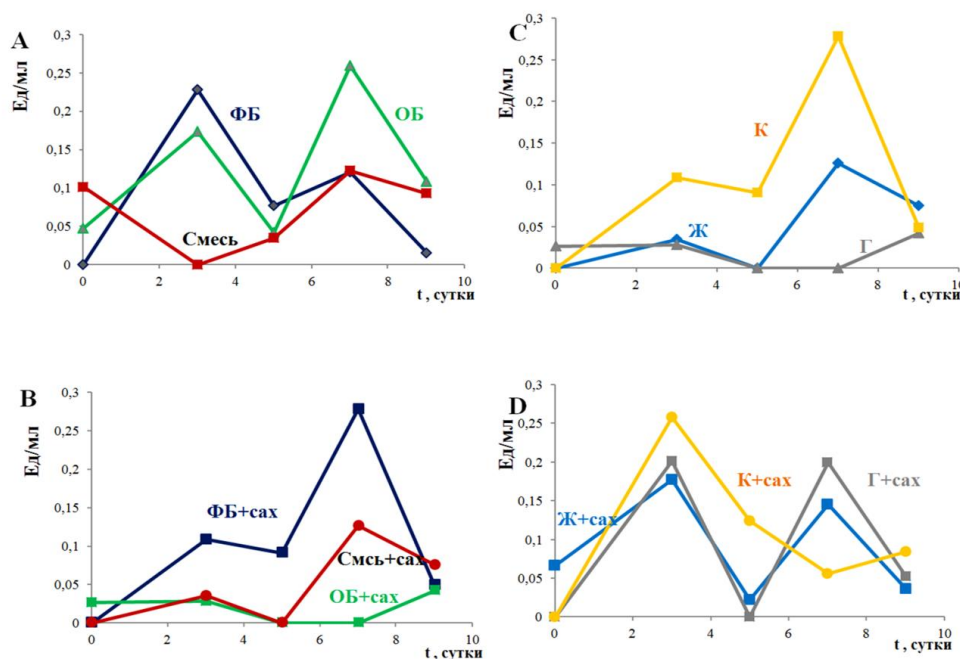


Рисунок 63. Активность β -1,4-эндоглюконазы (в, г) *Trichoderma viride* при культивировании на целлюлозосодержащих субстратах без (А, С) и с добавлением сахарозы (В, Д). Обозначения: ФБ - фильтровальная бумага; ОБ – офисная бумага; Смесь – смесь всех бумаг; Ж – журнальная бумага; Г – газетная бумага; К – картон; "+сах" – с добавлением сахарозы (30 г/л). результаты представлены средним арифметическим из трёх повторностей (разброс внутри повторностей не превышал 10%); с изменениями по Прокудина и др., 2016.

Примечательно, что на легкоразлагаемых субстратах (фильтровальная бумага, картон, офисная бумага) этот эффект был минимальным или отсутствовал, тогда как при утилизации трудноразлагаемых журнальной и газетной бумаг добавление углевода к среде способствовало повышению уровня образования эндоглюконазы и появлению пика активности на 2-3 сут культивирования. Известно, что эндоглюконазы первыми взаимодействуют с волокнами целлюлозы, разбивая её на филаменты и интенсифицируя выработку и активность целлобиогидролаз, что объясняет подобную индукцию активности эндоглюконаз, направленную на разложение именно трудноразлагаемых целлюлозосодержащих субстратов.

Трудности биоразложения журнальной и газетной бумаг могут быть связаны как с наличием в них лигнина (от 2 до 24%, Sun and Cheng, 2002), так и с особенностями производства данного типа продукции, при котором используются различные химикаты, включая синтетические добавки (хелатирующие агенты, осушители, поверхностно-активные вещества), клей, чернила и красители (Pivnenko et al., 2015), которые негативно влияют на развитие микроорганизмов, что было нами показано при росте на этих субстратах анаэробных метаногенных сообществ (Tsavkelova et al., 2018). Использование смеси бумаг, состоящей в равных долях из легко- и трудноразлагаемых компонентов, позволяет повысить эффективность биоразложения всего субстрата в целом. Это может быть связано с тем, что микромицеты образуют комплекс целлюлозолитических энзимов, благодаря чему их синергичное действие и эффективность гидролиза возрастают. Синергизм вообще характерен для ферментов, образуемых *Trichoderma* не только в отношении целлюлозосодержащих субстратов (Selig et al., 2008), но и при их антагонистическом воздействии на фитопатогенные микроорганизмы, когда общая активность хитиназ, β -гликозидаз и протеаз значительно выше, чем отдельных ферментов (Antal et al., 2001), или когда гидролитические ферменты действуют синергично с антибиотиками, также продуцируемыми этими грибами (Lorito, 1998; Алимова, 2006).

Таким образом, нами показано, что один из представителей *Trichoderma*, *T. viride*, который был обнаружен в ризоплане оранжерейных орхидей: *Dendrobium moschatum*, *Acampe praemorse* и *Phalaenopsis amabilis*, обладает высокой активностью целлюлаз, что может служить защитой от фитопатогенных грибов, индуцируя системную устойчивость растения-хозяина, как описано выше. Образуемые *Trichoderma harzianum* антибиотики пептаболы, действующие синергично с хитиназами и β -1,3-глюканазой, существенно подавляют прорастание спор и рост мицелия *Botrytis cinerea* (Schirmböck et al., 1994). Кроме того, представители рода *Trichoderma*, обладая широким набором гидролитических

ферментов, и активно присутствуя в ризоплане воздушных корней эпифитов, могут выступать основными редуцентами – деструкторами органической морт-массы, в том числе, цианобактериальных обрастаний, таким образом, способствуя деградации и их биомассы для формирования субстрата в ризоплане воздушных корней.

3.2.3.3. Предобработка целлюлозосодержащих субстратов для получения биогаза

Изоляты активных штаммов грибов и образуемые ими ферменты используют для разложения биомассы растений в различных областях биотехнологии и промышленности (компостирование, бумажная промышленность, получение биотоплива и др.). Сложности с биоразложением растительной биомассы связаны с наличием лигнина, представленного трёхмерным полимерным соединением, состоящим из метоксилированных фенилпропановых структурных единиц (Феофилова и Мысякина, 2016). Лигнин придаёт клеточным стенкам растений механическую прочность, устойчивость от воздействия широкого круга соединений, стрессовых возействий и активности микроорганизмов. Содержание лигнина в растительном материале варьирует: 15–40 % – в древесине, 30–40 % – в скорлупе орехов, 10–30 % – в траве, 0–30 % – в различного типа бумагах, 17–19 % – в соломе (Sun and Cheng, 2002).

Для предобработки растительного сырья с высоким содержанием лигнина применяют различные химические и физико-химические методы, такие как автогидролиз и гидротермолиз при высоких температурах, микроволновое излучение, озонлиз, гидролиз с помощью концентрированных и разбавленных кислот и щелочей, а также окислирование перекисью водорода, органосолв и другие (Sun and Cheng, 2002; Lynd et al., 2002). В то же время, эти методы дорогостоящи и неэкологичны, что обуславливает поиск легкоразлагаемых целлюлозосодержащих субстратов и подходов к их предобработке и биоконверсии до целевых продуктов.

Особый интерес вызывают целлюлозосодержащие субстраты с низким содержанием лигнина, такие как травянистые растения, в том числе "энергетические", например, мискантус, сорго, сахарный тростник, кукуруза, рапс, подсолнечник (Antizar-Ladislao and Turrion-Gomez, 2008), или неиспользуемые в пищу культуры. В последнее время возрос интерес к переработке в биотопливо бумажных отходов, отдельно или смешанным с отходами пищевой или сельскохозяйственной промышленности (Цавкелова и Нетрусов, 2012; Malakhova et al., 2015; Rodriguez et al., 2017; Qin et al., 2018). В качестве

биологической предобработки растительных материалов наиболее часто используют грибы "белой гнили", – представителей родов *Phanerochaete*, *Trametes*, *Pleurotus*, *Phlebia*, *Ganoderma* (Singh and Singh, 2017), которые выделяют различные лигнинолитические ферменты, включая основные: фенолоксидазы или лакказы, лигнин-пероксидазы и Mn-пероксидазы (марганец-зависимые пероксидазы), а также мультифункциональные пероксидазы (комплекс изоферментов) (Sun and Cheng, 2002; Dashtban et al., 2010; Феофилова и Мысякина, 2016). Предобработка растительного сырья с помощью грибов более экологична и имеет низкую себестоимость процесса, однако, этот очень длительный процесс требует значительных площадей для оптимального развития микромицетов, а разложение лигнина просиходит одновременно с использованием полисахаридов, что делает этот процесс менее привлекательным для биотехнологии. Однако использование методов молекулярной биологии позволяет конструировать штаммы, в том числе на основе диких типов видов *Trichoderma*, экспрессирующих гены целлюлаз или лигниназ под собственными или регулируемыми промотерами, что значительно повышает выход этих ферментов (Алимова, 2006). Представители рода *Trichoderma* сами участвуют в расщеплении лигнина и полисахаридов, например, при твёрдофазной ферментации вегетативных частей топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.; Рязанова и др., 2016).

В нашей работе мы использовали целлюлозолитический изолят *Trichoderma viride*, который выращивали при жидкофазном культивировании на смеси бумаг (фильтровальная журнальная и газетная бумаги, картон и офисная бумага с чёрно-белой печатью). После предобработки в течение 1, 3 и 9-ти суток полученный субстрат использовали для анаэробной биоконверсии в биогаз, используя в качестве инокулята навоз крупного рогатого скота (КРС), поскольку именно эта схема эксперимента оказалась наиболее оптимальной (Прокудина и др., 2016) из ранее опробованных. В результате, предобработка смеси бумаг с помощью *T. viride* позволила в 2,2 раза повысить кумулятивное содержание метана в составе биогаза до 52,3%, по сравнению с необработанным материалом (23,9%; табл. 13). Наибольшую эффективность гидролиза субстрата и его биоконверсию в биогаз (в пересчете на г субстрата) наблюдали к 3-м суткам культивирования. При дальнейшем культивировании микромицета эффективность процесса падает за счёт потребления грибом углеводов, что сокращает их доступность для микроорганизмов из анаэробного микробного сообщества.

Таблица 13. Предобработка смеси бумажных отходов *Trichoderma viride* с последующей биоконверсией в биогаз микробным сообществом из навоза крупного рогатого скота (с изменениями по Прокудина и др., 2016).

Время культивирования	Содержание биометана		
	кумулятивное содержание метана, %	ммоль/л среды	мл/г субстрата
0 сут	23,9 ± 2,7	29,5	44,1
1 сут	42,7 ± 3,5	52,9	79,0
3 сут	52,3 ± 0,8	64,7	96,6
9 сут	20,1 ± 2,2	24,9	37,1

Таким образом, мы показали, что *Trichoderma viride* обладает биотехнологическим потенциалом для использования в предобработке бумажных отходов (смеси разного типа бумаг), что значительно повышает эффективность их биоконверсии в биогаз анаэробным метаногенным сообществом. То есть, гидролитическая активность *Trichoderma* позволяет микробному сообществу более эффективно использовать целлюлозосодержащую биомассу. Другим (биологическим) аспектом полученных результатов, применительно к рассмотрению консорциума микроорганизмов, заселяющих ризоплану растений, является тот факт, что именно представители рода *Trichoderma* могут выступать в роли первичных деструкторов отмирающих частей растения, при этом, обладая высокой антимикробной активностью, не допуская развития в прикорневой области других, в особенности фитопатогенных, микромицетов. Подобную роль на примере дикорастущей эпифитной орхидеи *Dendrobium nobile* авторы (Yuan et al., 2009) отводят другому представителю аскомицетов (класс Sordariomycetes) - *Xylaria*. Таким образом, наши результаты показывают многогранность взаимоотношений ассоциативного сообщества микромицетов эпифитных орхидей, которые также определяют функционирование микробного сообщества, формируемого в ризоплане растения-хозяина, обеспечивая защитную функцию, а также, очевидно, ресурсную, участвуя в трофических цепочках в ризоплане, что особенно существенно для воздушных корней эпифитов, не находящихся в субстрате.

3.2.4. Ассоциативные бактерии ризопланы облиственных эпифитных орхидей

При изучении состава бактериальных популяций, заселяющих корни эпифитных орхидей, нами были использованы как традиционные методы выделения чистых культур бактерий на различных питательных средах, так и современные методы молекулярной

биологии (высокопроизводительное секвенирование), позволяющие учесть и некультивируемых представителей прокариот, колонизирующих ризоплану этих растений. При выделении чистых культур было обнаружено, что отличительным признаком большинства колоний бактерий, изолированных с воздушных корней эпифитных орхидей на разных типах питательных сред, является их яркая пигментация с оттенками желтого, оранжевого, рыжего, красного, розового и фиолетового цветов, в то время, как основная часть бактериальных популяций, заселяющих субстратные корни представлена бесцветными – сероватыми и мучнисто-белыми колониями, с некоторым количеством присутствующих колоний желтого цвета (Цавкелова и др., 2001; Цавкелова и др., 2004; Tsavkelova, 2011; Teixeira da Silva et al., 2015a; Tsavkelova et al., 2016). Частично эти результаты представлены на рисунке 64.

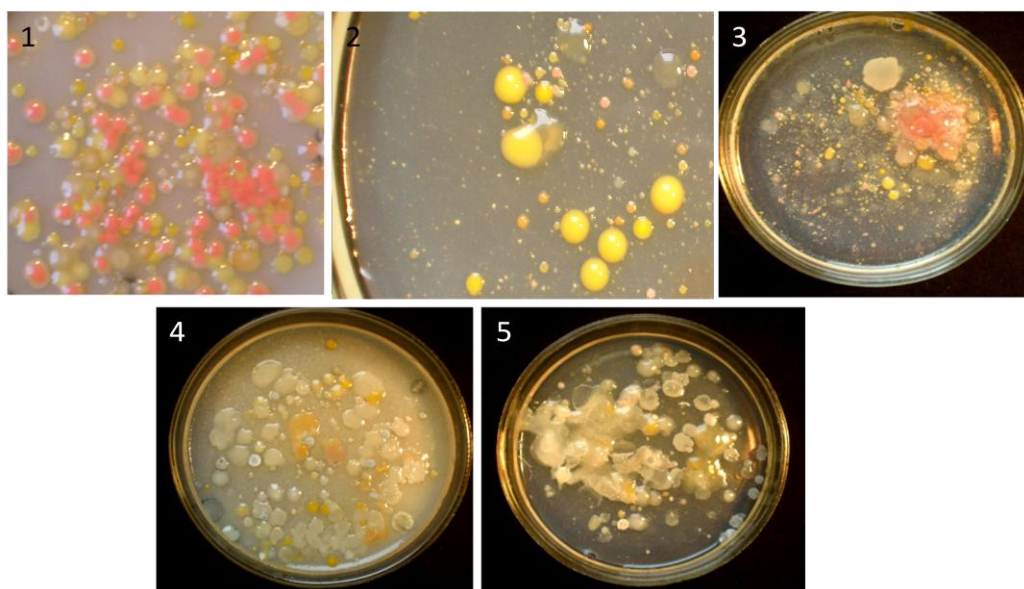


Рисунок 64. Колонии бактерий, выделенных из воздушных (верхний ряд) и субстратных (нижний ряд) корней *Dendrobium moschatum*. Агаризованные среды: среда Rich с глицеролом (1), крахмал-аммонийная среда (2, 4), модифицированная среда Чапека с дрожжевым экстрактом (3, 5). Образование обильного внеклеточного матрикса отчетливо заметно на средах с глюкозой (3, 5; с изменениями по Teixeira da Silva et al., 2015a).

Известно, что пигменты обычно защищают от ультрафиолетовой радиации и повышают толерантность к солнечному УФ-излучению, что является характерным признаком для эпифитных бактерий, заселяющих филлосферу растений (Roy et al., 1998; Sundin and Jacobs, 1999). Так, каротиноиды, образуемые *Erwinia herbicola*, а также нейроспорин и β -каротин из *Escherichia coli*, также как и микоспорин и сцитонемин, образуемые цианобактерией *Nostoc commune*, играют важную роль в клеточной защите от

UV-A и UV-B радиации (Becker-Napak et al., 1997; Ehling-Schulz et al., 1997). Очевидно, что бактериям, колонизирующим ризоплану воздушных корней, также присуще наличие пигментов.

Другой важной характеристикой большинства выделенных ассоциативных бактерий является наличие у них выраженного межклеточного матрикса, что особенно отчетливо проявлялось на средах с высоким содержанием глюкозы, подтверждая углеводную природу большинства образуемых экзополисахаридов (Цавкелова и др., 2004; Tsavkelova et al., 2015-2017). Внеклеточная слизь и капсулы, выступая в качестве скрепляющего агента, способствуют образованию бактериальных агломератов, обнаруженных нами на поверхности воздушных и субстратных корней орхидей, при их исследовании с помощью СЭМ. Помимо фиксации и адгезии клеток на поверхности, матрикс обеспечивает создание им локальной микросреды, способствуя концентрированию питательных веществ, различных регуляторов и ионов, защищая их от УФ излучения и высыхания, структурируя микробные популяции в составе биоценозов (Олескин и др., 2000; Morris and Monier, 2003). Например, показано, что биоплёнки, которые образуются в основном за счет образования внеклеточного матрикса, помогают ризобактериям, а особенно неспорообразующим, колонизировать корни растений (Rinaudi and Giordano, 2010). У спорообразующих бацилл было выявлено, что растительные полисахариды (компоненты клеточной стенки) индуцируют формирование биоплёнок и ассоциаций между представителями *Bacillus* и растениями томата или арабидопсиса (Beauregard et al., 2013).

После идентификации выделенных с *D. moschaum* бактериальных культур (описание результатов по идентификации представлено в следующем разделе), у некоторых из них был проанализирован состав их межклеточного матрикса и содержания в нем углеводов и белков (табл. 14, Цавкелова и др., 2004).

У представителей *Rhizobium* sp. и *Pseudomonas* sp. наблюдали образование обильного высокомолекулярного полимерного матрикса. Значительное количество полисахаридов было отмечено именно у культуры *Rhizobium* sp. Преобладание углеводов выявлено также у культур *Mycobacterium* sp. и *Bacillus* sp., а у *Microbacterium* sp. и *Sphingomonas* sp. матрикс, помимо углеводов содержит значительную долю белков. Среди бактерий, заселяющих корни акампы, также были выявлены культуры с преимущественно полианионной (кислой) природой внеклеточного матрикса с преобладанием в нём углеводов или белков (Цавкелова и др., 2004).

Таблица 14. Состав внеклеточного матрикса некоторых ризобактерий, ассоциированных с *Dendrobium moschatum*.

Бактерии	Природа матрикса ^a		Степень полимерности матрикса ^b	Соотношение углеводов: белок в матриксе
	Наличие кислых групп	Присутствие углеводов		
<i>Sphingomonas</i> sp.	+	+ –	+	0,5
<i>Microbacterium</i> sp.	+	–	+	0,3
<i>Pseudomonas</i> sp.	+	+ –	+	1,0
<i>Bacillus</i> sp.	+	+ –	++	1,2
<i>Mycobacterium</i> sp.	+	+	+	1,5
<i>Rhizobium</i> sp.	+	++	+++	2.4
<i>Pseudomonas</i> sp.	+	+ –	+	0,9

Обозначения: ^a – “+” – визуально много, “+ –” – визуально мало, “–” – визуально не отмечено. Методика проведения экспериментов по определению природы матрикса описана в разделе "Материалы и методы". ^b – “–” – отсутствие формирования полисахаридного осадка; “+ –” – небольшое количество осаждаемого из супернатанта полимера; “++++” – обильно сформированный осадок, занимающий весь объем раствора; промежуточные формы осаждения полимера обозначены как “+”, “++”, “+++”. Наличие белка определяли по методу Лоури, содержание углеводов определяли фенол-серным методом (Dubois et al., 1956).

Таким образом, наличие у ризобактерий, заселяющих воздушные и субстратные корни, экзополисахаридного межклеточного матрикса подтверждает его значимую роль в образовании и поддержании тесных ассоциаций микроорганизмов с растением-хозяином, их прикрепление и “заякоривание” на корневой поверхности. С помощью внеклеточного матрикса бактерии формируют на корнях эпифитных тропических орхидей микробные сообщества, состав которых зависит от типа экониши, предпочитаемой микроорганизмами (воздушные или субстратные корни), а также от морфофизиологических особенностей растения-хозяина.

При изучении количественного распределения культивируемых бактерий на корнях, чашечный метод Коха, позволяющий учесть жизнеспособные клетки, был использован при анализе микробных популяций оранжерейных и дикорастущих тропических орхидей. При анализе воздушных и субстратных корней облиственных оранжерейных эпифитов *D. moschatum* и *A. praemorsa* было подтверждено, что бактерии в большем количестве присутствуют в ризоплане воздушных корней этих растений. Так, воздушные корни *A. praemorsa* заселяет 2135×10^6 бактериальных клеток/г, в то время как субстратные – $7,6 \times 10^6$ клеток/г (Цавкелова и др., 2004). Еще более отчетливо эта разница

оказалась видна при анализе дендробиума, на воздушных корнях которого было обнаружено $300,0 \pm 18,80 \times 10^6$ клеток/г, а на субстратных – $0,24 \pm 0,03 \times 10^6$ клеток/г. Для сравнения результатов, полученных на оранжерейных эпифитах, были также исследованы дикорастущие Вьетнамские орхидеи – эпифит *Pholidota articulata* и наземная *Raphiopedillum appletonianum*. Тогда как с корней наземной орхидеи было выделено $3,5 \pm 0,18 \times 10^6$ КОЕ/г, – с корней эпифитного вида – $192 \pm 8,5 \times 10^6$ КОЕ/г (Tsavkelova et al., 2007a). Эти данные подтверждают наше предположение о том, что воздушные корни эпифитных орхидей, в том числе из-за наличия особой структуры, характерной исключительно для орхидных – многослойного губчатого веламена, представляют собой удобную эконишу для заселения ризобактериями. Кроме того, на воздушных корнях можно предполагать наличие большего содержания корневых экссудатов, тогда как на субстратных корнях происходит их разбавление вследствие более влажных условий и использование другими микроорганизмами, в том числе беспозвоночными и насекомыми, которые обитают в почве или субстрате, но не встречаются на воздушных корнях из-за неподходящих для них условий существования. В отличие от остальных растений, произрастающих в субстрате, у эпифитных орхидных зоной максимальной микробной активности становится не ризосфера, которая практически отсутствует у оранжерейных, культивируемых на сосновой коре эпифитных орхидей, а именно ризоплана их субстратных и, тем более, воздушных корней.

3.2.4.1. Идентификация ассоциативных бактерий ризопланы

При исследовании состава ассоциативных бактерий, заселяющих корни дикорастущих вьетнамских орхидей были получены результаты, представленные в таблицах 15 и 16 (Tsavkelova et al., 2007a). Микробное сообщество эпифитной *Pholidota* отличалось от такового у наземного вида *Raphiopedillum*: наиболее распространенными бактериями *P. appletonianum* были грамположительные штаммы *Streptomyces* и *Bacillus*, а доминирующими видами корней эпифитной *Ph. articulata* – грамотрицательные *Pseudomonas* и *Flavobacterium* (таблица 15). Бактериальное разнообразие ризопланы *Ph. articulata* оказалось намного шире, хотя популяции *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* и *Erwinia* встречались в ризоплане обоих растений. Среди эндофитных бактерий *P. appletonianum* доминирующими остались бациллы, тогда как представители рода *Pseudomonas* превалировали в составе эндофитных популяций другой орхидеи (*Ph. articulata*).

Таблица 15. Биоразнообразие и распределение культивируемых бактерий, изолированных с корней наземной *P. appletonianum* и эпифитной *Ph. articulata*

Растение	Бактерии	Состав доминирующих бактериальных популяций (%) ^a	
		ризоплана	эндофиты
<i>Paphiopedilum appletonianum</i>	<i>Streptomyces</i>	43 ± 3.5	14 ± 2.2
	<i>Bacillus</i>	26 ± 2.7	65 ± 4.2
	<i>Pseudomonas</i>	12 ± 1.5	1 ± 0.4
	<i>Burkholderia</i>	10 ± 1.9	0
	<i>Erwinia</i>	8 ± 0.9	21 ± 3.3
	<i>Nocardia</i>	1 ± 0.7	0
<i>Pholidota articulata</i>	<i>Pseudomonas</i>	24 ± 2.5	54 ± 4.7
	<i>Flavobacterium</i>	14 ± 1.2	17 ± 1.2
	<i>Stenotrophomonas</i>	12 ± 2.0	0
	<i>Pantoea</i>	12 ± 1.7	0
	<i>Chryseobacterium</i>	10 ± 2.5	0
	<i>Bacillus</i>	8 ± 1.3	29 ± 1.6
	<i>Rhizobium</i>	6 ± 1.8	0
	<i>Erwinia</i>	6 ± 0.8	0
	<i>Burkholderia</i>	6 ± 1.7	0
	<i>Paracoccus</i>	2 ± 0.8	0

Обозначения: ^a - Процентное содержание бактериальных популяций (%) оценивали как число КОЕ одного вида к общему числу колоний (КОЕ) × 100%. Выделение проводили на модифицированной среде Чапека с дрожжевым экстрактом и крахмал-аммонийной среде. Данные представлены средним арифметическим из трёх повторностей ± SD.

Представители семейств *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Burkholderiaceae*, *Xanthomonadaceae* и *Bacillaceae* довольно часто обнаруживаются в ризосфере и ризоплане различных растений (Garbeva et al., 2001; Halda-Alija, 2003; Loiret et al., 2004; Park et al., 2010). Распространенность эндосимбионтов *Pseudomonas* и *Bacillus* также была показана и для некоторых Восточно-Австралийских наземных орхидей (Wilkinson et al., 1989, 1994a).

При выделении культивируемых бактерий, заселяющих корни эпифитных орхидейных растений *Dendrobium moschatum* и *Acampe praemorsa*, на модифицированной среде Чапека с дрожжевым экстрактом ранее были получены чистые культуры, для идентификации которых использовали ряд морфологических характеристик и физиолого-биохимических тестов (Цавкелова, 2003). В последующем была проведена их идентификация с помощью молекулярно-биологических методов – секвенирования по 16S рРНК. Состав ассоциативных бактерий орхидейных эпифитов представлен в таблицах 16 и 17. Также было проведено выделение эндофитных бактерий с корней *Acampe praemorsa*.

Таблица 16. Идентификация с помощью секвенирования фрагментов 16S rRNA и филогенетическая принадлежность ассоциативных бактерий Вьетнамских облиственных орхидей (с изменениями по Tsavkelova et al., 2007a).

# (GenBank acc. No)	Соответствие с базой данных NCBI (the closest sequence)	(%)	Родовая принадлежность
DQ255949	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> (AY866408)	99	<i>Pseudomonas</i> sp.
DQ255950	<i>Flavobacterium</i> sp. (AY162137)	97	<i>Flavobacterium</i> sp.
DQ255959	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i> (AY468448)	98	<i>Chryseobacterium</i> sp.
DQ255955	<i>Paracoccus marcusii</i> (Y12703)	100	<i>Paracoccus</i> sp.
DQ255956	<i>Burkholderia</i> sp. (AB191223)	99	<i>Burkholderia</i> sp.
DQ255957	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (AY179327)	99	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
DQ255958	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY315435)	98	<i>Pantoea</i> sp.
DQ665911	<i>Rhizobium</i> sp. (MH000624) ^a / <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AY513492)	100	<i>Rhizobium</i> sp.

Условия секвенирования и использованные праймеры описаны в разделе "Материалы и методы". ^a – Парафилетичный род *Agrobacterium* несколько раз реклассифицировали и большинство его видов в настоящее время принято относить к роду *Rhizobium*, в том числе и *Rhizobium radiobacter* (*A. tumefaciens*).

После проведения секвенирования штаммов, выделенных из ризопланы дендробиума (Tsavkelova et al., 2007b), которые показали себя активными продуцентами ауксинов, культура *Sphingomonas* sp. (accession number AM498043) показала максимальное сходство с *Sphingomonas* sp. ZnH-1 (EF061133.1, 99% идентичности), *Microbacterium* sp. (accession number AM498042) – с *Microbacterium* sp. JL1116 (EF061133.1, 98% идентичности), *Mycobacterium* sp. (accession number AM498041) – с *Mycobacterium* sp. CH-2 (DQ083240.1, 97% идентичности), а *Rhizobium* sp. (accession number AM500637) – с *Rhizobium* sp. (e.g., Ca-BZ, DQ647055.1, 99% идентичности).

Для обоих растений характерно отличие видового состава бактерий, заселяющих их воздушные корни от бактериальных популяций, колонизирующих субстратные корни. При этом для обоих типов корней характерно присутствие представителей *Pseudomonas* и *Bacillus*, которые являются типичными для ризосферы и ризопланы растений (Ahmad et al., 2008; Jha et al., 2013; Ahemad and Kibret, 2014). Для обоих эпифитов отмечено, что их воздушные корни заселены видами, принадлежащими к родам *Flavobacterium*, *Microbacterium* и *Sphingomonas*, которые не были обнаружены среди доминирующих популяций на субстратных корнях. Наоборот, *Mycobacterium* и *Rhizobium* не были выявлены на воздушных корнях. Среди эндофитов *Bacillus* и *Pseudomonas* встречались на обоих типах корней этого растения, в то время как *Flavobacterium* и *Microbacterium* обнаруживались только на воздушных корнях, а *Gluconobacter* и *Alcaligenes* – на субстратных корнях. Таким образом, общим как для оранжевых, так и дикорастущих орхидей является тот факт, что независимо от условий их роста, разнообразие микробных

популяций ассоциативных бактерий эпифитов шире по составу и количественно, чем у наземных растений, что также было показано нами ранее на примере оранжерейной наземной орхидеи *Calanthe vestita* var. *rubro-oculata*, культивируемой в той же оранжерее, что и эпифитные растения, с корней которой были выделены представители *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Mycobacterium* (Цавкелова и др., 2001; Цавкелова, 2003).

Таблица 17. Состав ассоциативных культивируемых бактерий *Dendrobium moschatum* и *Acampe praemorsa* (Цавкелова и др., 2004; Tsavkelova et al. 2007b; Tsavkelova, 2011; Tsavkelova et al., 2016).

Растение / тип корней	Ризоплана	Растение / тип корней	Ризопланы	Эндофитны
<i>Dendrobium moschatum</i> Воздушные корни	<i>Bacillus</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Microbacterium</i> <i>Nocardia</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Sphingomonas</i> <i>Xanthomonas</i>	<i>Acampe praemorsa</i> Воздушные корни	<i>Bacillus</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Micrococcus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Sphingomonas</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Streptomyces</i> <i>Xanthomonas</i> <i>Microbacterium</i> <i>Haloanella</i>	<i>Bacillus</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Microbacterium</i> <i>Xanthomonas</i>
Субстратные корни	<i>Acinetobacter</i> <i>Bacillus</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rhizobium</i> <i>Rhodococcus</i>	Субстратные корни	<i>Acinetobacter</i> <i>Bacillus</i> <i>Cellulomonas</i> <i>Gluconobacter</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Streptomyces</i>	<i>Alcaligenes</i> <i>Bacillus</i> <i>Gluconobacter</i> <i>Pseudomonas</i>

Разнообразие бактерий, ассоциированных с корнями эпифитов, дополняется, по сути, двумя микробными сообществами, заселяющими отдельно их воздушные и субстратные корни. При этом даже внутри одного растения отмечены различия в составе бактериальных популяций их воздушных и субстратных корней с преобладанием представителей, образующих яркоокрашенные колонии: *Flavobacterium* и *Haloanella* (семейство *Flavobacteriaceae*), *Microbacterium* (*Microbacteriaceae*) и *Sphingomonas* (*Sphingomonadaceae*), в том числе активно колонизирующих веламен и внутренние ткани воздушных корней (на примере акампы). Неизменным для оранжерейных и дикорастущих видов является присутствие видов, принадлежащих к родам *Bacillus* и *Pseudomonas*. Состав микробных популяций растений, произрастающих в естественных условиях,

отличается от оранжерейных видов наличием энтеробактерий (*Pantoea*, *Erwinia*) и представителей *Burkholderia*, а также представителей актиномицетов (*Streptomyces* и *Nocardia*), колонизирующих эпифитный вид *Pholidota appletonianum*.

Именно экологическая ниша и приуроченные к ней микроорганизмы ограничивают выбор бактериальных партнеров, вынуждая растение выстраивать микробно-растительные взаимодействия именно с теми микробными популяциями, которые присутствуют в данной эконише. Ранее австралийские авторы (Wilkinson et al., 1989, 1994a) указывали на ограниченность в выборе орхидеями своих бактериальных партнеров и распространенность эндофитных штаммов *Pseudomonas* и *Bacillus* у австралийских орхидей. Корневые экссудаты растений также способны оказывать влияние на состав микробных сообществ ризосферы и ризопланы (Kamilova et al., 2006). А сами орхидеи являются активными продуцентами разнообразных фенольных соединений, которые известны своей антимикробной активностью (Stoessl and Arditti, 1984) и также могут выступать как факторы селекции тех или иных бактериальных популяций в сосаве ассоциативных микробных сообществ, о чём речь пойдёт ниже.

Для сравнительного анализа состава бактериальных популяций, заселяющих ризоплану эпифитных орхидей на примере *Dendrobium moschatum* был проведен более детальный анализ ассоциативных бактерий его воздушных и субстратных корней с использованием различных методов: с помощью традиционного чашечного метода Коха по выделению культивируемых штаммов, а также с использованием высокопроизводительного секвенирования. При изучении состава культивируемых бактерий, помимо модифицированной среды ЧДЭ, был использован целый ряд других питательных сред, например, триптон-соевый агар, среда R2A, среда с глицерином (см. раздел "Материалы и методы"). После секвенирования доминирующих колоний, выделенных на различных питательных средах, были получены результаты, представленные в таблицах 18, 19.

Использование двух типов сред позволило расширить разнообразие выделенных с корней *D. moschatum* культивируемых бактерий, так, например, на среде TSA удалось выделить представителей *Mucilaginibacter*, *Agrococcus*, *Serinicoccus*, *Dyadobacter*, *Aureimonas*, *Ferrovibrio* и *Enterobacter*. В то же время, на минеральной полусинтетической среде ЧДЭ были изолированы виды, которые не обнаружены на органической среде TSA, например, *Phaeospirillum*, *Nesterenkonia*, *Jeongeupia*, *Mitsuaria*, *Cupriavidus*, *Azospirillum*.

Таблица 18. Филогенетическая принадлежность некоторых выделенных ассоциативных бактерий с указанием номера в Генбанке (с изменениями по Tsavkelova et al., 2016).

№	Соответствие (ближайший родственник)	% идентичности	Аффилиация
KP794603	<i>Caulobacter vibrioides</i> (GU459216.1)	98	<i>Caulobacter</i> sp. SR ^a -C13
KP794604	<i>Roseomonas cervicalis</i> (NR_114672.1)	98	<i>Roseomonas</i> sp. AR-1
KP794605	<i>Streptomyces</i> sp. (JN187861.1)	96	<i>Streptomyces</i> sp. SR-C12
KP794606	<i>Azospirillum irakense</i> (HQ018753.2)	95	<i>Azospirillum</i> sp. SR-C10
KP794607	<i>Enterobacter cloacae</i> (GQ260073.1)	98	<i>Enterobacter</i> sp. SR-C20
KP794608	<i>Agrococcus iejuensis</i> (HQ896931.1)	98	<i>Agrococcus</i> sp. AR- II5
KP794609	<i>Sphingomonas</i> sp. (JQ660212.1)	96	<i>Sphingomonas</i> sp. AR-II14

Примечания: ^a - SR - бактерии, выделенные с субстратных корней и AR - бактерии, выделенные с воздушных корней *Dendrobium moschatum*. Представители *Agrococcus* sp. и *Sphingomonas* sp. - эндофиты.

Таким образом, использование этих сред позволяет выделить бактериальные популяции, максимально отражающие структуру микробных сообществ, заселяющих корни растений. Представители рода *Microbacterium* заселяют преимущественно внутренние ткани воздушных корней и являются доминирующими в ризоплане воздушных корней. Другие бактерии рода *Sphingomonas* также характерны для эндофитной микрофлоры воздушных корней дендробиума, составляя около половины от его эндофитных бактериальных популяций. В целом, разнообразие эндофитов (культивируемых на питательных средах) воздушных корней этого растения значительно превышает таковое, обнаруженное в его субстратных корнях, что также не противоречит ранее полученным результатам (Цавкелова, 2003). В то время, как с поверхностно-стерилизованных субстратных корней были выделены представители *Penibacillus*, *Caulobacter*, *Rhizobium* и *Phaeospirillum*, из которых только споровые грамположительные *Penibacillus* были изолированы также и из воздушных корней этого растения, во внутренних тканях воздушных корней дендробиума были идентифицированы и другие представители актинобактерий (*Nesterenkonia*, *Subtercola*, *Brachybacterium*), а также псевдомонады и метиловобактерии. Необходимо отметить, что среди эндофитных бактерий субстратных корней этого растения представители *Penibacillus* занимали доминирующее положение (более 70% популяции).

Таблица 19. Состав ассоциативных культивируемых бактерий, заселяющих ризоплану и внутренние ткани (эндофитные бактерии) корней *Dendrobium moschatum*.

	Субстратные корни				Воздушные корни			
	Ризоплана	%-ое содержание (%) ^a	Эндофиты ^b	(%)	Ризоплана	(%)	Эндофиты	(%)
TSA	<i>Pseudomonas</i> <i>Caulobacter</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Mitsuaria</i> <i>Ferrovibrio</i> <i>Enterobacter</i>	52±5.5 6±2.8 5±2.0	<i>Paenibacillus</i> <i>Caulobacter</i>	78±2 22±2	<i>Sphingomonas</i> <i>Brevundimonas</i> <i>Microbacterium</i> <i>Methylobacterium</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Dyadobacter</i> <i>Pedobacter</i> <i>Mucilaginibacter</i> <i>Agrococcus</i> <i>Serinicoccus</i> <i>Aureimonas</i>	18±3.0 15±2.6 13±1.6 12±2.0 4±2.8 3±1.0 3±2.2	<i>Microbacterium</i> <i>Sphingomonas</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Subtercola</i> <i>Paracoccus</i> <i>Methylobacterium</i> <i>Agrococcus</i> <i>Brachybacterium</i>	42±3.8 19±1.4 8±2.4 6±1.0
ЧДЭ	<i>Pseudomonas</i> <i>Rhizobium</i> <i>Variovorax</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Caulobacter</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Pedobacter</i> <i>Jeongeupia</i> <i>Mitsuaria</i> <i>Cupriavidus</i> <i>Azospirillum</i> <i>Streptomyces</i>	29±4.2 11±1.2 9±3.5	<i>Paenibacillus</i> <i>Caulobacter</i> <i>Rhizobium</i> <i>Phaeosporillum</i>	77±2 13±5 6±0.8	<i>Microbacterium</i> <i>Sphingomonas</i> <i>Aeromicrobium</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Methylobacterium</i> <i>Brevundimonas</i> <i>Hymenobacter</i> <i>Porphyrobacter</i> <i>Roseomonas</i>	14±1.2 10±2.6 9±1.8 5±0.5 5±2.8 3±2.2	<i>Microbacterium</i> <i>Sphingomonas</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Nesterenkonia</i> <i>Methylobacterium</i>	28±3.8 20±2.0 3±1.8
"N ₀ " ^c	<i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Pedobacter</i> <i>Paenibacillus</i>		- ^d		<i>Paenibacillus</i> <i>Sphingomonas</i> <i>Brevundimonas</i>			

Примечания: ^a - Процентное содержание бактериальных популяций (%) оценивали как число КОЕ одного вида к общему числу колоний (КОЕ) × 100%. Данные представлены средним из трёх повторностей ± SD.

^b – эндофитные бактерии были выделены после поверхностной стерилизации корней раствором гипохлорита натрия (как описано в разделе "Материалы и методы").

^c – безазотистая среда "N₀" представляет собой селективную среду Эшби, не содержащую каких-либо связанных источников минеральных или органических азотных соединений, позволяющую выделить азотфиксирующие бактерии.

^d – не исследовали

Если сравнивать состав микробных популяций ризопланы субстратных и воздушных корней, то на воздушных корнях *D. moschatum* среди доминирующих популяций были выделены представители *Microbacterium* (порядок *Actinomycetales*), *Sphingomonas* (порядок *Sphingomonadales*), споровые (*Paenibacillus* и *Bacillus*),

метилобактерии (род *Methylobacterium*), а также *Brevundimonas* (порядок *Caulobacterales*). Среди других бактерий, заселяющих ризоплану воздушных корней, были идентифицированы также *Agrococcus* и *Serinicoccus*, принадлежащие к актинобактериям; *Mucilaginibacter*, *Pedobacter* и *Dyadobacter*, принадлежащие к порядку *Sphingobacteriales*, а также *Aureimonas* (порядок *Rhizobiales*), *Hymenobacter* (порядок *Flavobacteriales*), *Porphyrobacter* (порядок *Sphingomonadales*) и *Roseomonas* (порядок *Rhodospirillales*). На субстратных же корнях этого вида орхидей помимо преобладающих представителей *Pseudomonas*, *Paenibacillus* и *Rhizobium*, выделенных также и в предыдущем исследовании (Цавкелова, 2003), в настоящей работе с использованием молекулярно-биологических методов был идентифицирован целый ряд других бактерий: относящиеся к порядку *Burkholderiales* *Mitsuaria*, *Cupriavidus* и *Variovorax*, *Ferrovibrio* (порядок *Rhodospirillales*), *Enterobacter* (порядок *Enterobacteriales*), *Pedobacter* (порядок *Sphingobacteriales*), *Jeongeupia* (семейство *Chromobacteriaceae* порядка *Neisseriales*), *Azospirillum* и *Phaeospirillum* (порядок *Rhodospirillales*), а также представители актиномицетов (*Streptomyces*) и *Caulobacter* (порядок *Caulobacterales*).

Как и в случае с дикорастущими видами орхидей, в частности, наземной *Paphiopedilum appletonianum*, на субстратных корнях *D. moschatum* обнаружены преимущественно представители бацилл, псевдомонад, буркхольдерий, энтеробактерий и стрептомицетов. На уровне порядков микробное сообщество оранжерейных орхидей оказалось практически идентично по занимаемой эконише дикорастущим видам. В то же время, отличие заключается именно в микробном сообществе воздушных корней оранжерейных орхидей: тогда как в естественной среде воздушные корни практически сразу могут оказаться в непосредственной близости от субстрата (трещины коры, развилки ствола и ветвей с опавшими и перегнившими листьями) и начинают функционировать как субстратные, в условиях оранжереи воздушные корни длительное время или даже постоянно остаются в воздушном пространстве без какого-либо соприкосновения с субстратом). И именно эта экониша (по сути близкая к филлосфере растений) становится новым центром для развития иного бактериального сообщества, кардинально отличающегося от почвенной микрофлоры (или в случае орхидей, субстратной (так как вместо почвы используется сосновая кора, мох сфагнум)). Это микробное сообщество более разнообразно по структуре (особенно при анализе эндофитных бактерий) и более многочисленно.

Использование безазотистой среды Эшби позволило выделить азотфиксирующих представителей, среди которых *Paenibacillus*, *Sphingomonas* и *Brevundimonas* были

изолированы с воздушных корней и *Pseudomonas* и *Paenibacillus* – с субстратных корней дендробиума. Эти ризобактерии известны своими diaзотрофными видами, которые зачастую составляют доминантную ассоциативную микрофлору различных растений и в том числе способствуют их лучшему росту и развитию именно благодаря своей азотфиксирующей активности (Montañez et al., 2009; Puri et al., 2016; Pham et al., 2017).

Для более полной информации о составе ризобактери *D. moschatum*, было проведено **профилирование бактериальных сообществ** воздушных и субстратных корней с помощью высокопроизводительного секвенирования (табл. 20, рис. 65). Из общего количества прочитанных последовательностей, составивших 54 055 и 64 040 для воздушных и субстратных корней, соответственно, операционные таксономические единицы (ОТЕ) были кластеризованы на уровне сходства $\geq 97\%$, что позволяет провести идентификацию основных групп микроорганизмов.

Всего было получено 178 и 111 ОТЕ для воздушных и субстратных корней, соответственно. Однако, при анализе микробных сообществ воздушных и субстратных корней было обнаружено 19% и 26% последовательностей, которые были классифицированы только до уровня семейств и высших рангов, а также 11% и 19% последовательностей, обозначенных как "unassigned", которые в дальнейшем анализе не учитывали, так как они могут содержать как последовательности неописанных микроорганизмов, но также с большей вероятностью, по мнению ряда авторов (Carlsen et al., 2012; Degnan and Ochman, 2012; Rocchi et al., 2017), – это могут быть ошибочные последовательности, появившиеся в результате ПЦР амплификации или секвенирования, а также во время БИАС (bias, Bioinformatics Integrated Application Software) анализа или ошибок, связанных с NGS (next generation sequencing) технологиями. В результате анализа последовательностей, объединенных в кластеры, которые имели $\geq$ пяти прочтений и проанализированных на основе сервера MG-RAST (<http://matagenomics.anl.gov>), а также количественной оценки распределения идентифицированных бактериальных таксонов в составе микробных сообществ, были получены данные, представленные на рис. 65 и в таблице 20.

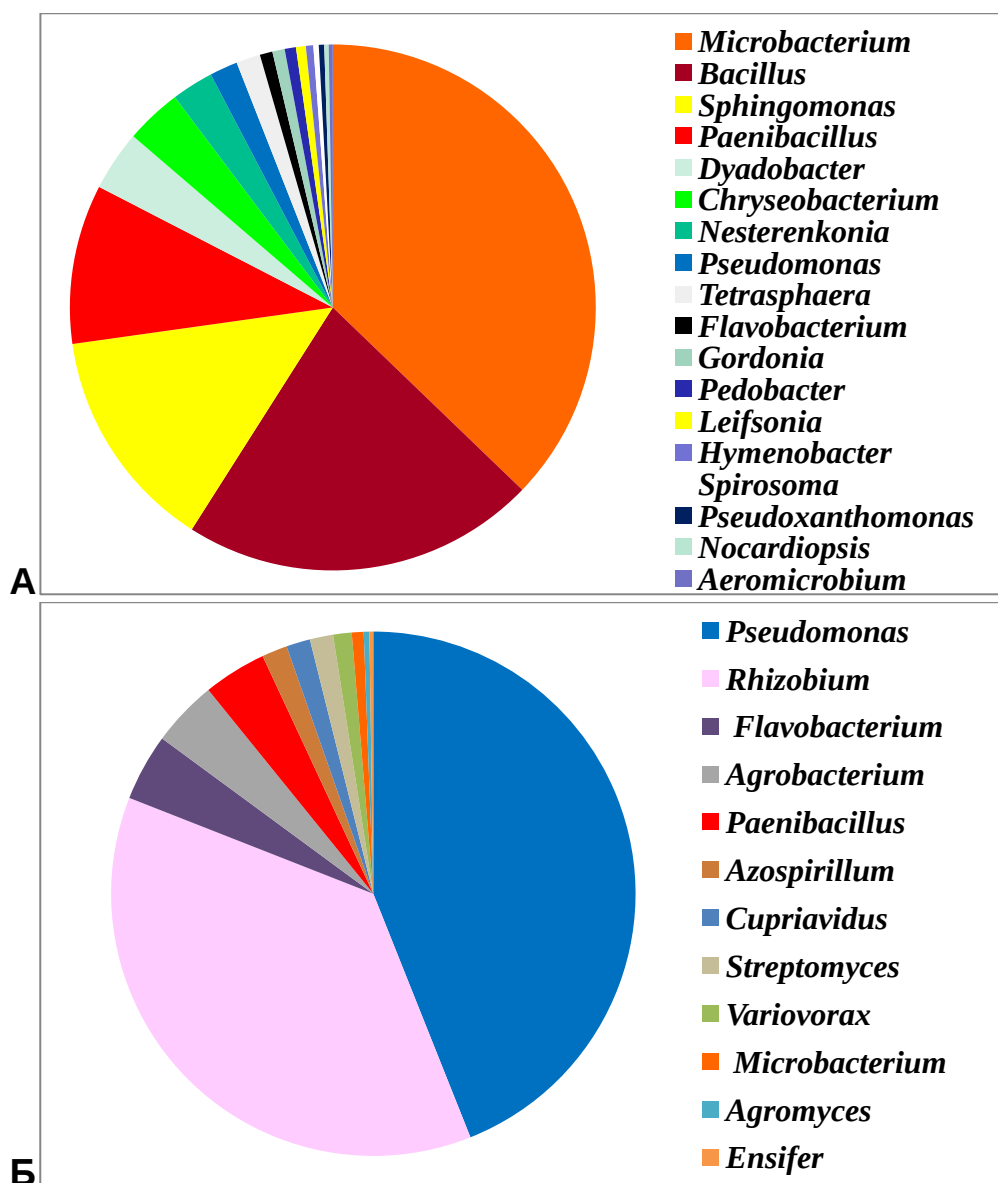


Рисунок 65. Профилирование бактериального сообщества воздушных (А) и субстратных (Б) корней *D. moschatum*.

Известно, что использование высокопроизводительного секвенирования (HTS) позволяет учесть некультивируемые микроорганизмы и бактерии, которые трудно выделить в чистую культуру при традиционных методах получения чистых культур. В то же время, этот метод на молекулярном уровне подтвердил результаты, полученные нами при традиционном способе анализа микробно-растительных сообществ. Еще более очевидными оказались существенные различия в структуре бактериальных сообществ воздушных и субстратных корней одного и того же растения (рис. 65).

Таблица 20. Доминирующие ризобактерии и их доля в микробном сообществе ассоциативных бактерий ризопланы воздушных и субстратных корней *D. moschatum*.

Бактерии ризопланы воздушных корней	Филлум (порядок)	% ^a	Бактерии ризопланы субстратных корней	Филлум (порядок)	%
<i>Microbacterium</i>	<i>Actinobacteria</i> (<i>Actinomycetales</i>)	34.0	<i>Pseudomonas</i>	<i>Proteobacteria</i> (<i>Pseudomonadales</i>)	43.6
<i>Bacillus</i>	<i>Firmicutes</i> (<i>Bacillales</i>)	21.4	<i>Rhizobium</i>	<i>Proteobacteria</i> (<i>Rhizobiales</i>)	36.7
<i>Sphingomonas</i>	<i>Proteobacteria</i> (<i>Sphingomonadales</i>)	13.5	<i>Flavobacterium</i>	<i>Bacteroidetes</i> (<i>Flavobacteriales</i>)	4.1
<i>Paenibacillus</i>	<i>Firmicutes</i> (<i>Bacillales</i>)	9.6	<i>Agrobacterium</i>^b	<i>Proteobacteria</i> (<i>Rhizobiales</i>)	4.0
<i>Dyadobacter</i>	<i>Bacteroidetes</i> (<i>Sphingobacteriales</i>)	3.6	<i>Paenibacillus</i>	<i>Firmicutes</i> (<i>Bacillales</i>)	3.9
<i>Chryseobacterium</i>	<i>Bacteroidetes</i> (<i>Flavobacteriales</i>)	3.4	<i>Azospirillum</i>	<i>Proteobacteria</i> (<i>Rhodospirillales</i>)	1.6
<i>Nesterenkonia</i>	<i>Actinobacteria</i> (<i>Micrococcales</i>)	2.5	<i>Cupriavidus</i>	<i>Proteobacteria</i> (<i>Burkholderiales</i>)	1.5
<i>Pseudomonas</i>	<i>Proteobacteria</i> (<i>Pseudomonadales</i>)	1.7	<i>Streptomyces</i>	<i>Actinobacteria</i> (<i>Actinomycetales</i>)	1.4
<i>Tetrasphaera</i>	<i>Actinobacteria</i> (<i>Actinomycetales</i>)	1.5	<i>Variovorax</i>	<i>Proteobacteria</i> (<i>Burkholderiales</i>)	1.1
<i>Flavobacterium</i>	<i>Bacteroidetes</i> (<i>Flavobacteriales</i>)	0.8	<i>Microbacterium</i>	<i>Actinobacteria</i> (<i>Actinomycetales</i>)	0.7
<i>Gordonia</i>	<i>Actinobacteria</i> (<i>Actinomycetales</i>)	0.7	<i>Agromyces</i>	<i>Actinobacteria</i> (<i>Actinomycetales</i>)	0.3
<i>Pedobacter</i>	<i>Bacteroidetes</i> (<i>Sphingobacteriales</i>)	0.7	<i>Ensifer</i>	<i>Proteobacteria</i> (<i>Rhizobiales</i>)	0.2
<i>Leifsonia</i>	<i>Actinobacteria</i> (<i>Actinomycetales</i>)	0.6			
<i>Hymenobacter</i>	<i>Bacteroidetes</i> (<i>Flavobacteriales</i>)	0.4			
<i>Spirosoma</i>	<i>Bacteroidetes</i> (<i>Sphingobacteriales</i>)	0.3			
<i>Pseudoxanthomonas</i>	<i>Proteobacteria</i> (<i>Xanthomonadales</i>)	0.3			
<i>Nocardiopsis</i>	<i>Actinobacteria</i> (<i>Actinomycetales</i>)	0.3			
<i>Aeromicrobium</i>	<i>Actinobacteria</i> (<i>Actinomycetales</i>)	0.2			

Примечания: ^a – относительное процентное (%) содержание в популяции.

Жирным шрифтом выделены названия родов культивируемых бактерий, которые также были выделены традиционным чашечным методом (табл. 19).

^b - в современной таксономии, *Agrobacterium* считается устаревшим названием все представители перенесены в род *Rhizobium*.

В таксономическом составе микробиома воздушных корней дендробиума среди основных микробных популяций доминировали представители филумов *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. При этом в количественном выражении сфингомонады,

представители *Proteobacteria*, занимали третье место в процентном соотношении их присутствия в сообществе. На субстратных корнях, наоборот, разнообразие таксонов ограничивалось представителями *Proteobacteria*, со значительно меньшим присутствием актинобактерий. Единственный представитель *Firmicutes* – род *Paenibacillus*, заселяет оба типа корней, но активнее он колонизирует именно воздушные корни растения. В итоге, среди бактерий, входящих в фитобиом обеих экониш (ризоплана воздушных и субстратных корней) и составляющих $\geq 1\%$ популяций внутри этих сообществ, лишь только *Tetrasphaera* и *Chryseobacterium* с воздушных корней и *Flavobacterium* с субстратных корней не были выделены при традиционном способе анализа культивируемых бактерий и секвенировании чистых культур (табл. 19). Однако ранее (Цавкелова, 2003; Tsavkelova, 2011) изоляты *Flavobacterium* были нами выделены и идентифицированы в ризоплане обеих оранжевых эпифитов, *Acampe* и *Dendrobium*, при высеве на среду ЧДЭ (табл. 17). Таким образом, практически все доминирующие бактериальные популяции в составе обоих сообществ ризопланы воздушных и субстратных корней *D. moschatum*, идентифицированные с помощью высокопроизводительного секвенирования, соответствовали нашим данным, полученным после идентификации чистых культур при высеве на питательные среды: представители родов *Microbacterium*, *Sphingomonas*, *Paenibacillus* и *Bacillus* преобладали в составе ассоциативных бактерий на воздушных корнях, а *Pseudomonas*, *Rhizobium* и *Paenibacillus* – на субстратных корнях. То есть, несмотря на существующее мнение о том, что культивируемые бактерии, выделяемые из ризосферы растений, могут не представлять значимой доли в микробном сообществе, наши данные, наоборот, подтверждают правомочность использования традиционных методов выделения чистых культур, которые позволяют достоверно оценить не только биоразнообразие микроорганизмов, представленных в сообществе, но и количественно охарактеризовать состав доминирующих бактериальных популяций в различных эконишах: ризоплане воздушных и субстратных корней. Не только с помощью профилирования на базе Illumina MiSeq, но и при выделении отдельных колоний и их последующей идентификации удалось выявить представителей таких родов, как *Nesterenkonia*, *Hymenobacter*, *Pedobacter* и *Aeromicrobium* в составе ассоциативных бактерий ризопланы воздушных корней, а также *Cupriavidus*, *Azospirillum*, *Streptomyces* и *Variovorax* в составе микробного сообщества ризопланы субстратных корней *Dendrobium moschatum*.

Некоторое несоответствие в составе микробных ассоциаций при сравнении этих двух методов связано со значительным присутствием метиловых бактерий и представителей

родов *Brevundimonas* и *Aeromicrobium* на воздушных корнях, обнаруженных культуральным методом, но не выявленных среди доминирующих популяций при профилировании. Представители этих родов при проведении HTS анализа были обнаружены, но составляли в микробном сообществе $\leq 0,1\%$ популяций. Необходимо отметить, что биоразнообразие бактерий в этом сегменте, составляющем от 0,05 до 0,1% от всех бактерий сообщества, также довольно разнообразно для воздушных корней: это представители родов *Weeksella*, ***Roseomonas***, *Clavibacter*, *Nocardioideis*, ***Arthrobacter***, *Aeromonas*, *Sanguibacter*, *Thioalkalivibrio*, *Kocuria*, *Clavaria*, *Streptomyces*, *Deinococcus*, ***Methylobacterium***, *Phyllobacterium* (жирным шрифтом выделены рода, представители которых были изолированы чашечным методом). Для субстратных корней среди бактерий, составляющих от 0,05 до 0,1% популяции, были идентифицированы представители *Aeromonas*, ***Acinetobacter***, *Bradyrhizobium*, *Chryseobacterium*, ***Enterobacter***, *Burkholderia*, *Sinorhizobium*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, ***Pedobacter***, *Klebsiella*, ***Mitsuaria***, ***Caulobacter***. Таким образом, некоторые бактерии, которые были выделены в виде чистых культур, оказались при HTS анализе в составе минорных компонент сообщества. Несмотря на то, что эти микроорганизмы могут не представлять доминирующие популяции в микробном сообществе и (по данным HTS) в количественном соотношении не превышать 0,1%, такие бактерии могут, тем не менее, играть немаловажную роль во взаимодействии с растением-хозяином: как будет показано ниже (см раздел 3.3.3.), некоторые из этих бактерий, а именно, *Roseomonas*, *Enterobacter*, *Mitsuaria* оказались активными продуцентами индолил-3-уксусной кислоты (ауксина), оказывающей прямое влияние на рост растений. Поэтому, даже будучи в составе минорных популяций, ассоциативные бактерии могут оказывать непосредственное и существенное воздействие на развитие и устойчивость растения-хозяина. Кроме того, необходимо учитывать динамику развития микробно-растительных сообществ, когда в процессе развития растения от прорастания семян и роста ювенильных растений до их сенильного состояния и отмирания состав микробных сообществ и распределение бактериальных популяций в ризоплане может изменяться.

К настоящему времени становится всё более очевидным, что способность растений успешно адаптироваться к условиям окружающей среды и быть конкурентно-успешными в немалой степени определяется функциональной активностью их фитобиома, – микробных сообществ, колонизирующих растение, и влияющих на рост и развитие растения-хозяина. Несмотря на то что исходно ассоциативные микроорганизмы рекрутируются из окружающей среды, растение селекционирует наиболее подходящие для себя RGPB штаммы. В современной фитосимбиологии наличие "симбиотических

каскадных эффектов" предусматривает, что не только факторы окружающей среды и метаболизм растения определяют становление микробно-растительных взаимодействий, но и сами микробные партнёры являются в немалой степени дирижёрами этих отношений, в особенности эндофиты (Uroz et al., 2019). При этом состав фитомикробиома на растениях отличается от состава микробных сообществ в той же экологической нише или даже в субстрате, в котором произрастает растение, что также говорит о направленной селективности в выборе между партнёрами.

Использование современных технологий в отношении идентификации микроорганизмов позволило получать большие массивы данных относительно состава микробных сообществ, ассоциированных с растениями. Результаты, полученные нами относительно состава ассоциативных бактерий, заселяющих ризоплану эпифитных орхидей показывают, что у этих растений существует практически два различных фитобиома, формирующихся на субстратных и воздушных корнях, отличающихся качественно (по составу входящих в сообщество видов и преобладанием протеобактерий на субстратных корнях и актинобактерий – на воздушных корнях) и количественно (обсеменённость воздушных корней в разы превышает таковую на субстратных корнях).

Поверхности различных тропических растений обеспечивают благоприятную среду обитания для колонизирующих их микроорганизмов (Baldotto and Olivares, 2008). Подавляющее большинство идентифицированных нами бактерий известны тем, что входят в состав ассоциативных фитобиомов различных растений, встречаясь эпи- или эндофитно и оказывая спектр RGPB реакций, благоприятно воздействуя на развитие и устойчивость растения-хозяина. К настоящему моменту считается, что эндофитные микроорганизмы (грибы и бактерии) находятся в каждом растении, а растения без ассоциативных RGPB штаммов менее конкурентны и подвергаются активному нападению фитопатогенов; кроме того, они становятся более восприимчивыми к стрессовым влияниям внешней среды (Timmusk et al., 2011; Verma et al., 2019). На тему взаимодействия эндофитных и ассоциативных бактерий написаны многие работы, в том числе касающиеся биоразнообразия и функциональной активности входящих в такие сообщества микроорганизмов, в частности обзорные статьи (Hallmann et al., 1997; Sturz et al., 2000; Uroz et al., 2019), которые, однако, преимущественно посвящены микробно-растительным взаимодействиям с сельскохозяйственными растениями. Так, при исследовании ряда культур были выявлены следующие закономерности доминирующего содержания представителей некоторых филумов в фитобиомах этих растений: например, у рапса – это представители *Chloroflexi*, *Proteobacteria* и *Bacteroidetes* (Fierer et al., 2012; Peiffer et al., 2013) у кукурузы – *Verrucomicrobia* и *Planctomycetes* (Janssen, 2006), у

пшеницы - *Acidobacteria*, *Actinobacteria* и *Bacteroidetes* (Donn et al., 2015). Среди других древесных растений можно привести пример мангров с доминирующими представителями цианобактерий, *Fusobacteria* и *Betaproteobacteria*, тогда как у тополя преобладают *Alphaproteobacteria*, *Firmicutes* и *Betaproteobacteria*, а у ивы – *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* и *Firmicutes* (по Bhargava et al., 2019).

Среди основных колонизаторов ризопланов, в том числе эндофитов, наиболее широко известны представители следующих родов: *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Paenibacillus*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, а также представители метиловых бактерий и некоторых спорообразующих видов бацилл (Ahemad and Kibert, 2014). Всё больше появляется данных о встречаемости в составе фитобиомов древесных и травянистых растений представителей *Sphingomonas* (McInroy and Kloepper, 1995; Doty et al., 2009). Среди эндофитов также выделяют *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconoacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Nocardioideae*, *Pantoea*, *Planomonospora*, *Pseudomonas*, *Serratia* и представителей стрептомицетов (Yadav et al., 2017).

Здесь же отметим, что представители рода *Paenibacillus*, выделенные в отдельный таксон из рода *Bacillus*, зачастую обнаруживают как спорообразующих эндофитов различных растений. Более того, эти бактерии встречаются как внутриклеточные спутники микоризообразующего гриба *Laccaria bicolor* (Bertaux et al., 2003), эндофиты у *Sordariomycetes* и *Eurotiomycetes* (Hoffman and Arnold, 2010), а также ассоцианты грибов из порядка *Sebacinales* (Sharma et al., 2008). Примечательно, что среди эндофитов также встречаются представители семейств *Sphingomonadaceae* (*Alphaproteobacteria*), *Burkholderiaceae*, *Comamonadaceae*, *Oxalobacteraceae* (*Betaproteobacteria*), *Moraxellaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Pasteurellaceae*, *Enterobacteriaceae* (*Gammaproteobacteria*), *Bacillaceae* и *Paenibacillaceae* (*Firmicutes*), которые зачастую формируют ассоциативные взаимодействия с растениями (Hoffman and Arnold, 2010).

В составе ассоциативных фитобиомов растений, произрастающих в засушливых и пустынных регионах, выделяют представителей филумов *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Bacteroidetes*, среди которых также зачастую доминируют актинобактерии, в том числе виды *Rhodococcus* и *Nesterenkonia* (Soussi et al., 2016). В другом исследовании, на примере кустарника *Reaumuria negevensis*, произрастающего в пустыне Негев, авторы показали, что популяция актинобактерий в ризосфере этого растения остаются количественно постоянными на протяжении всех сезонов, а наиболее многочисленной группой являются представители *Bacteroidetes* (Saul-Tcherkas and Steinberger, 2011).

Что касается орхидей, то долгое время фитомикробиомы этих растений вообще не изучали. После работ Wilkinson с соавт (1989, 1994b), проведенных на некоторых дикорастущих наземных австралийских орхидеях, и наших пионерских работ по изучению состава микробных сообществ тропических дикорастущих и оранжерейных орхидей, исследованию их влияния и механизмов взаимодействия с этими растениями (Цавкелова и др., 2000; 2003а; 2004; Tsavkelova et al., 2016; Pavlova et al., 2017), в последнее время стало появляться всё больше статей, посвященных исследованию эндофитов, заселяющих наземные и эпифитные орхидеи (Galdiano Jr. et al., 2011; Shekhovtsova et al., 2013; Faria et al., 2013; Yu et al., 2013; Yang et al., 2014; Li et al., 2017b). В таблице 21 представлены данные по разнообразию эндофитных бактерий, выделенных из некоторых дикорастущих и оранжерейных наземных и эпифитных орхидей.

Таблица 21. Эндофитные бактерии, ассоциированные с различными представителями семейства Orchidaceae

Вид орхидеи, регион произрастания, тип растения	Части растений	Родовая/видовая принадлежность бактерий	Тип выделения и идентификации	Авторы, ссылка
<u>Австралийские наземные орхидеи:</u> <i>Thelymitra crinita</i> Lindley <i>Lyperanthus nigricans</i> R.Br. <i>Pterostylis recurva</i> Benth.	Подземные части (корни)	Эндофиты: <i>Pseudomonas fluorescens-putida</i>	Высев на питательные среды, идентификация по морфологическим и культуральным признакам.	Wilkinson et al., 1989
Вид орхидеи, регион произрастания, тип растения	Части растений	Родовая/видовая принадлежность бактерий	Тип выделения и идентификации	Авторы, ссылка
<u>Австралийские наземные орхидеи:</u> <i>Rhizanthella gardneri</i> R.S. Rogers; <i>Calodenia latifolia</i> R.Br.; <i>Diuris longifolia</i> R.Br.; <i>D. purdiei</i> Diels <i>Pterostylis recurva</i> Lindl.; <i>P. vittata</i> Lindl., <i>Thelymitra crinita</i> Lindl.; <i>Lyperonthus nigricans</i> Br.	Подземные части (корни)	Эндофиты: <i>Pseudomonas</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Kurthia</i> , <i>Micrococcus</i>	Чашечный метод (высев на питательные среды). Идентификация с помощью газовой хроматографии метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК), по морфологическим и биохимическим признакам.	Wilkinson et al., 1994b

Эпифит лесов Бразилии: <i>Cattleya walkeriana</i>	Корни	Эндофиты: <i>Bacillus</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Cutrobacterium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Achromobacter</i>	Чашечный метод (высев на питательные среды), идентификация выросших культур секвенированием участка 16S rRNA.	Galdiano Junior et al., 2011
Эпифит. <i>Dendrobium officinale</i> Kimura et Migo	Эндо- фиты (корни)	Эндофиты: <i>Paenibacillus</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Sinorhizobium</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Lysinibacillus</i>	ПЦР -ДПЭ (денатурирующий градиентный гель- электрофорез)	Yu et al., 2013; Yang et al., 2014
Эпифит. <i>Cymbidium eburneum</i> Lindl. (провинция Чжэцзян, Китай)	Мерис- тема- тические ткани	Эндофиты: <i>Paenibacillus lentimorbus</i> , <i>P. macerans</i>	Чашечный метод, идентификация МЭЖК	Faria et al., 2013
Наземная орхидея умеренного климата: <i>Dactylorhiza maculata</i> (L.) Soó	Подзем- ные части: туберидии	Эндофиты: доминирующие представители: <i>Hyphomicrobium</i> , <i>Methylococcus</i> , <i>Nitrobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Sphingomonas</i> (<i>Proteobacteria</i>), <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i> (<i>Actinobacteria</i>), <i>Bacillus</i> и <i>Clostridium</i> (<i>Firmicutes</i>).	GC-MS анализ МЭЖК	Shekhov- tsova et al., 2013
<i>Dendrobium catenatum</i> - эпифит. Растения, выращенные на посадочных базах в нескольких провинциях Китая.	Корни, стебли и листья	Эндофиты: доминирующие группы: <i>Proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Actinobacteria</i> и представители: <i>Pseudomonas</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Shigella</i> , <i>Delftia</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Sphingomonas</i>	Метагеномный анализ - профилирование на базе Illumina GAIIx (гены 16S rRNA и <i>nifH</i>)	Li et al., 2017b

Как видно из таблицы 21, среди эндофитных бактерий различных орхидей, особенно дикорастущих, выделяют представителей *Pseudomonas*, *Burkholderia* и энтеробактерий, а также спорообразующих бацилл. Необходимо отметить, что методы выделения и идентификации отличаются и поэтому невозможно провести точное сравнение результатов даже по родам, учитывая что классификация за последние десятилетия претерпела изменения и многие представители были переименованы или перенесены в другие рода. Тем не менее, обнаружение на различных дикорастущих эпифитных растениях доминирующих представителей семейств *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Burkholderiaceae* и *Bacillaceae* (Wilkinson et al., 1989; 1994b; Galdiano Jr. et al., 2011; Yu et al., 2013; Li et al., 2017b) подтвердило наши результаты, полученные ранее на дикорастущих *Pholidota articulata* и *Paphiopedillum appletonianum* (Tsavkelova et

al., 2007a; табл. 15). Практически все исследователи (табл. 21) отмечают присутствие представителей сфингомонад, впервые выделенных нами с корней *D. moschatum* (Цавкелова и др., 2009). Авторы также отмечают различия в составе ассоциативных сообществ изученных растений: так, например, около 73% штаммов, выделенных из видов рода *Pterostylis*, принадлежали к псевдомонадам, тогда как на растениях из рода *Diuris* их было лишь 22,6%, тогда как две трети от выделенных изолятов принадлежали грамположительным бактериям (Wilkinson et al., 1989).

В одной из последних работ (Li et al., 2017b), проведённой на эпифитном виде дендробиума, *D. catenatum*, авторы исследовали состав бактериальных сообществ, колонизирующих корни этого растения: на основании мета-16S rRNA анализа (на базе Illumina Miseq) было показано, что на уровне рода доминирующими были следующие группы и рода: *Proteobacteria* (71,81-96,08%), *Delftia* (10,39-38,42%), *Pseudomonas* (2,68-30,72%), *Burkholderia* (2,71-15,98%), *Escherichia/Shigella* (4,90-25,12%) и *Sphingomonas* (1,83-2,05%). Представителей кишечной группы *Escherichia/Shigella* в последнее время всё чаще выявляют в различных средах, в почвенных и водных эконисах, в том числе, на сельскохозяйственно-возделываемых растениях (Berg et al., 2016). При изучении микробиоты листьев *D. catenatum* было обнаружено значительное присутствие различных видов метиловых бактерий (род *Methylobacterium*) (Li et al., 2017b). Авторы также провели исследование на присутствие diaзотрофных бактерий в составе фитобиома этого растения, выявив что среди азотфиксаторов наиболее всего были распространены *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, а также *Beijerinckia*, *Xanthobacter* и *Burkholderia*. Также было отмечено, что представители другого diaзотрофного рода, *Sphingomonas*, составляли доминантную эндифитную группу в фитобиоме этого растения, подтверждая необходимость азотфиксирующих микроорганизмов для эпифитных растений.

На примере наземной орхидеи, произрастающей в умеренном климате, *Dactylorhiza maculata*, другие исследователи (Shekhovtsova et al., 2013) показали, что источником заселяющих её подземные части (туберидии) бактерий является ризосфера. В то же время, если в почве преобладают представители актинобактерий, то доминирующей группой микробных сообществ туберидиев являются *Proteobacteria* (56%). Другие группы в порядке уменьшения их численности представлены представителями *Firmicutes* (35%), *Actinobacteria* (7%) и *Bacteroidetes* (2%). Основными представителями родов, составляющими до 10% от протеобактерий, обнаруженных в туберидиях, оказались представители *Sphingomonas*, *Methylococcus*, *Hyphomicrobium* и *Nitrobacter*. Некоторые

другие рода (например, *Agrobacterium*, *Bifidobacterium*, *Riemerella*) обнаружены только в молодых туберидиях, а некоторые (например, *Aeromonas*, *Caulobacter*, *Nocardia*) – только в старых, тогда как основная масса всех выделенных микроорганизмов формировала фитобиом пальчатокоренника на протяжении всего развития туберидиев.

Таким образом, к настоящему времени, появляющиеся новые данные, в том числе с использованием современных молекулярно-биологических методов, подтверждают результаты, полученные в наших пионерских исследованиях (Цавкелова и др., 2000; 2003) о формировании бактериальных сообществ в ризоплане орхидей, причём ассоциативные микроорганизмы не только заселяют поверхность корней, но и проникают эндофитно. Несмотря на то, что можно выявить некоторое сходство (на уровне порядков и филумов) в составе ассоциативных микроорганизмов, на родовом уровне состав фитобиомов может отличаться, прежде всего, в зависимости от занимаемой экониши и климатических условий. То есть, растение вынуждено выбирать своих ассоциативных партнёров, исходя из имеющегося пула микроорганизмов в данной конкретной эконише. Однако отличие состава фитобиомов растений от микробных сообществ ризосферной почвы указывают на селективность в выборе партнёров, прежде всего, основываясь на их фитосимбионтных и PGPB свойствах.

Отдельным моментом в нашем исследовании является тот факт, что при сравнении традиционного подхода по выделению культивируемых бактерий и метода высокопроизводительного секвенирования оказалось, что, несмотря на то что HTS анализ позволяет идентифицировать намного большее разнообразие бактерий, оба подхода дали сходные результаты о составе доминирующих популяций ризопланы воздушных и субстратных корней, подчёркивая правомочность применения традиционных культуральных методов, в частности, при выделении микроорганизмов из растительно-микробных сообществ (при условии использования нескольких оптимальных питательных сред). Также можно отметить, что впервые обнаруженного нами в составе ассоциативных бактерий орхидей представителя рода *Sphingomonas* (Цавкелова и др., 2004), который был выделен чашечным методом и проявил себя как активный PGPB штамм, ускоряющий прорастание орхидей (раздел 3.5, Tsavkelova et al., 2007a), позже стали обнаруживать в составе фитобиомов орхидей некультуральными методами: ДГГЭ (DGGE) анализ эпифита *Dendrobium officinale* (Yu et al., 2013; Yang et al., 2014), GC-MS анализ МЭЖК (метилловые эфиры жирных кислот) фитобиома туберидиев наземного пальчатокоренника (*D. maculata*) и профилирование микробных сообществ с помощью высокопроизводительного секвенирования эпифита *Dendrobium catenatum* (Li et al., 2017b).

3.2.5. Ассоциативные бактерии филлопланы эпифитных орхидей

Чтобы оценить обсеменённость листовой поверхности и учесть истинно ассоциативные и транзиторные филлобактерии была проанализирована филлоплана облиственной оранжерейной орхидеи *D. moschatum*, для чего использовали нативные листья растения и листья, предварительно отмытые, в стерильной воде: количество КОЕ составило $77,5 \times 10^2 \pm 12,5$ и $115 \times 10^2 \pm 15$, соответственно. При пересчёте на массу листьев (г) эти значения составили: $62,5 \times 10^3 \pm 2,3$ и $73,5 \times 10^3 \pm 2,7$ для отмытых листьев и $75,0 \times 10^3 \pm 2,7$ и $88,2 \times 10^3 \pm 3,15$ для нативных листьев при пересчёте на вес сырой и сухой биомассы, соответственно. Как видно из полученных результатов, численность филлобактерий мало отличалась на нативных и отмытых листьях, указывая на то, что транзиторные микроорганизмы среди культивируемых филлобактерий не типичны для филлопланы орхидей (на примере *D. moschatum*), а колонизирующие её поверхность микроорганизмы представлены типично ассоциативными видами, адгезированными к поверхности листьев.

При сравнении результатов количественного анализа филлобактерий с численностью ассоциативных ризобактерий этого же растения (раздел 3.2.3) видно, что по сравнению с данными, полученными для субстратных корней ($0,24 \pm 0,03 \times 10^6$ клеток/г), и тем более, воздушных корней ($300,0 \pm 18,8 \times 10^6$ клеток/г) *D. moschatum*, его обсеменённость листьев филлобактериями значительно меньше. Те же результаты получены и при сравнении с численностью культивируемых ризобактерий, выделенных нами с другой оранжерейной (*Acampe praemorsa*) и дикорастущих (*Pholidota articulata* и *Raphiopedium appletonianum*) орхидей: для воздушных и субстратных корней *A. praemorsa* численность КОЕ ризобактерий составила $213,5 \times 10^6$ и $7,6 \times 10^6$ в пересчёте на г сухой биомассы, соответственно (Цавкелова и др., 2004), для субстратных корней эпифитной *Ph. articulata* – 192×10^6 КОЕ/г, а для субстратных корней наземной орхидеи *P. appletonianum* – $3,5 \times 10^6$ КОЕ/г биомассы (Tsavkelova et al., 2007). Сходная тенденция, при которой численность филлобактерий, заселяющих филлоплану, значительно меньше, чем количество микроорганизмов на корнях, характерна и для других, например, сельскохозяйственных растений: картофеля ($7,6 \times 10^7$ и $1,1 \times 10^6$ КОЕ/г биомассы корней и листьев, соответственно; Berg et al., 2005), риса (10^7 и 10^5 КОЕ/г биомассы корней и листьев, соответственно; Mano et al., 2007), сои (106 и 105 КОЕ/г биомассы корней и листьев, соответственно; Kuklinski-Sorbal et al., 2004). Интересно отметить, что бактерии филлопланы, как и ризобактерии, заселяющие воздушные корни исследуемой эпифитной орхидеи, отличает яркая пигментация их колоний, что выражается в формировании

окрашенных колоний желтого, розового, оранжевого и красного цветов при росте на питательных средах (рис. 66), подтверждая, что схожие экониши по воздействию абиотических факторов (температура, высокая освещенность и УФ воздействие, лимитирование по влагодоступности) формируют окружающую среду, в которой преимущество получают сходные группы бактерий.

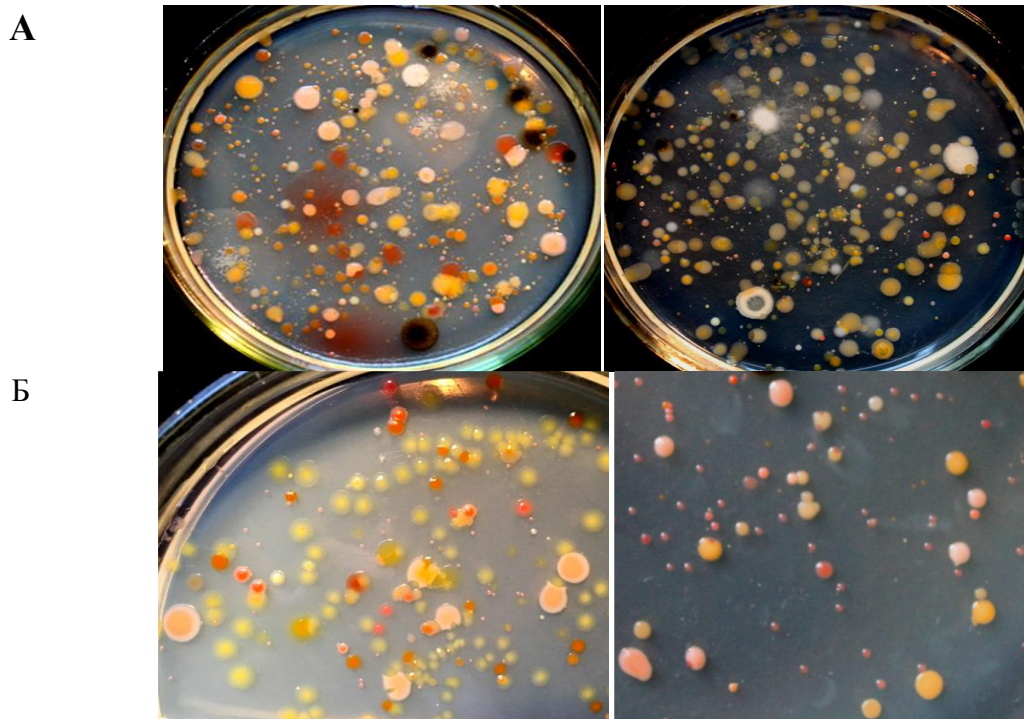


Рисунок 66. Колонии филлобактерий, выделенных из листьев *Dendrobium moschatum*: А: изоляты на среде R2A с нативных листьев (слева) и предварительно отмытых в воде (справа); Б: фрагменты чашек Петри с КОЕ филлобактерий с отмытых листьев на среде R2A (слева) и на среде ЧДЭ (справа).

После выделения в чистые культуры была проведена идентификация изолятов с помощью секвенирования по фрагменту гена 16S рРНК с использованием праймеров B63f-B1387r и UNIV 515F-БАСТ907R. Результаты представлены в таблице 22.

Таблица 22. Идентификация ассоциативных филлобактерий *Dendrobium moschatum*.

Бактерии с максимальной степенью сходства (по базе данных NCBI)		Аффилиация и название идентифицируемого штамма
Идентификационный номер (ID)	Видовая принадлежность и идентичность (%)	
KC853186	<i>Microbacterium</i> sp. W22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (98%)	<i>Microbacterium</i> sp. 1
JQ659399	<i>Microbacterium testaceum</i> strain L6-732 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (98%)	<i>Microbacterium</i> sp. 2
AP012052	<i>Microbacterium testaceum</i> StLB037 DNA, complete genome (97%)	<i>Microbacterium</i> sp. 3
HG931730	<i>Acinetobacter</i> sp. CDC NO-1 strain partial 16S rRNA gene, strain CDC NO-1 (97%)	<i>Acinetobacter</i> sp. 4
CP015515	<i>Rathayibacter tritici</i> strain NCPPB 1953, complete genome (97%)	<i>Rathayibacter</i> sp. 5
Y13043	<i>Deinococcus murrayi</i> 16S rRNA gene, isolate RSPS-7a (98,6%)	<i>Deinococcus</i> sp. 6
KX450446	<i>Rathayibacter</i> sp. strain RYA2 16S ribosomal RNA gene,	<i>Rathayibacter</i> sp. 7

	partial sequence (98%)	
HQ425308	<i>Janibacter</i> sp. M1-20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (98%)	<i>Janibacter</i> sp. 8
AB938197.1/ CP026363.1	<i>Brevibacillus</i> sp. WJP gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence (92%)	<i>Brevibacillus</i> sp. 9
MH165364	<i>Rathayibacter caricis</i> strain FST16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (99%)	<i>Rathayibacter</i> sp. 10
FR872459	<i>Sphingomonas</i> sp. MG-2011-150-FG partial 16S rRNA gene, strain 150, isolate FG (97%)	<i>Sphingomonas</i> sp. 11
KM406770	<i>Janibacter</i> sp. VR16-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (98%)	<i>Janibacter</i> sp. 12
KC207093	<i>Methylobacterium</i> sp. S-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%)	<i>Methylobacterium</i> sp. 13
MK474997	<i>Kocuria rhizophila</i> strain E24CS2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (97%)	<i>Kocuria</i> sp. 14
Y13043	<i>Deinococcus murrayi</i> 16S rRNA gene, isolate RSPS-7a (98,6%)	<i>Deinococcus</i> sp. 15
MH910344	<i>Aureimonas</i> sp. M2BS4Y-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (99%)	<i>Aureimonas</i> sp. 16
AB681463	<i>Spirosoma</i> sp. NBRC 101364 gene for 16S rRNA, partial sequence (98%)	<i>Spirosoma</i> sp. 17
MK182910	<i>Janibacter melonis</i> strain E15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%)	<i>Janibacter</i> sp. 18
MH198278.1	<i>Micrococcus</i> sp. strain UCCB 141 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%)	<i>Micrococcus</i> sp. 19
HQ188662	<i>Serinicoccus</i> sp. N131(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (98%)	<i>Serinicoccus</i> sp. 20
MH371298	<i>Methylobacterium hispanicum</i> strain ArAS154B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%)	<i>Methylobacterium</i> sp. 21
KX022816	<i>Roseomonas</i> sp. OTB25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (99%)	<i>Roseomonas</i> sp. 22
KT899835	<i>Nocardioides lentus</i> strain MCCB 355 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (99%)	<i>Nocardioides</i> sp. 23
KJ654753	<i>Sphingomonas</i> sp. M72C17 from Portugal 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (99%)	<i>Sphingomonas</i> sp. 25
HQ188662	<i>Serinicoccus</i> sp. N131(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%)	<i>Serinicoccus</i> sp. 26
KM507653.1	<i>Marmoricola</i> sp. FXJ8.178 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (99%)	<i>Marmoricola</i> sp. 27
JF496400.1	<i>Frigoribacterium faeni</i> strain EA1-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (99%)	<i>Frigoribacterium</i> sp. 28
KX758066	<i>Rathayibacter</i> sp. strain VKM Ac-2630 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%)	<i>Rathayibacter</i> sp. 29
CP020105	<i>Spirosoma rigui</i> strain KCTC 12531, complete genome (100%)	<i>Spirosoma</i> sp. 30
MG595362	<i>Microbacterium hydrothermale</i> strain APBSITMB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%)	<i>Microbacterium</i> sp. 31
HM204923	<i>Sphingomonas</i> sp. PBI 163 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (99%)	<i>Sphingomonas</i> sp. 32
MK615931	<i>Microbacterium oleivorans</i> strain PS10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%)	<i>Microbacterium</i> sp. 33
KR922276	<i>Sphingomonas</i> sp. PDD-69b-4 16S ribosomal RNA gene, complete sequence (100%)	<i>Sphingomonas</i> sp. 34
KX022816	<i>Roseomonas</i> sp. OTB25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (98%)	<i>Roseomonas</i> sp. 35
MK275660	<i>Microbacterium</i> sp. strain SB31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%)	<i>Microbacterium</i> sp. 36
MK547263	<i>Rhodococcus degradans</i> strain OTU62_I 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%)	<i>Rhodococcus</i> sp. 37
HM204923	<i>Sphingomonas</i> sp. PBI 163 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (97%)	<i>Sphingomonas</i> sp. 41

Таким образом, бактериальное сообщество филлопланы *D. moschatum* представлено преимущественно грамположительными бактериями, принадлежащими к *Microbacterium*, *Janibacter*, *Rathayibacter*, а также *Micrococcus*, *Brevibacillus*, *Kocuria*, *Serinicoccus*, *Nocardioides*, *Frigoribacterium* и *Marmoricola*. Среди грамотрицательных бактерий были выделены представители *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Acinetobacter*, *Spirosoma* и *Roseomonas*. Подавляющее большинство грамположительных филлобактерий за исключением споровых *Brevibacillus* (семейство *Paenibacillaceae* порядка *Bacillales*) относятся к порядку *Actinomycetales*: семействам *Microbacteriaceae* (*Frigoribacterium*, *Microbacterium*, *Rathayibacter*), *Micrococcaceae* (*Kocuria*, *Micrococcus*), *Nocardioideaceae* (*Marmoricola*, *Nocardioides*) и *Intrasporangiaceae* (*Janibacter*, *Serinicoccus*). Изоляты грамотрицательных бактерий относятся к двум классам протеобактерий: *Alphaproteobacteria* (*Methylobacterium*, *Roseomonas*, *Sphingomonas*) и *Gammaproteobacteria* (*Acinetobacter*); *Spirosoma* –представитель филума *Bacteroidetes*.

Подавляющее большинство выделенных нами бактерий являются представителями PGPB и встречаются в ризо- и филлосфере растений: так, *Microbacterium*, *Methylobacterium*, *Aureimonas* и *Roseomonas* входят в состав доминирующих популяций в листьях молочая *Jatropha curcas* (Madhaiyan et al., 2015). Представители рода *Acinetobacter* входят в состав эндофитной и эпифитной микрофлоры стеблей сои (*Glycine max* (L.) Merrill; Kuklinski-Sorbal et al., 2004) и ризосферы имбиря (*Zingiber officinale*; Chan et al., 2011). Представители рода *Rathayibacter* заселяют фотосинтезирующие части осок (Dorofeeva et al., 2002) и пижмы (*Tanacetum vulgare*; Vasilenko et al., 2016). *Janibacter* sp. встречается на корнях и листьях *Maytenus austroyunnanensis* (семейство бересклетовых; Qin et al., 2012), а *Janibacter melonis*, исходно выделенный из плодов *Cucumis melo* (Yoon et al., 2004), был также выделен из стеблей *Solanum melongena* L., где оказывал PGPB действие, подавляя развитие патогенного гриба *Ralstonia solanacearum*. Представители *Brevibacillus* встречаются в филлосфере следующих сельскохозяйственных растений: *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris*, *Lycopersicon esculentum*, *Cucurbita pepo* (Al-Awadhi et al., 2009), а штаммы *Kocuria* sp. – в филлосфере растений гороха (Egamberdieva, 2008) и томата (Енуга et al., 2007).

Несмотря на то что представители рода *Deinococcus* малоизученны в качестве компонентов микробных растительных сообществ, они обнаружены в филлоплане растений томата (Енуга et al., 2007), тополя (Li et al., 2017a), и некоторых цитрусовых (Ahmed et al., 2014). Известно, что PGPB штаммы *Aureimonas* sp. колонизируют филлоплану сахарного тростника и ятрофы, солюбилизирова соединения фосфора и

образуя сидерофоры (Madhaiyan et al., 2015; Pirhadi et al., 2018), а diaзотрофные *Rhodococcus* sp. – листья райграсса (Kukla et al., 2014) и ивы (Kuffner et al., 2010), где у этих RGPB штаммов отмечена фиксация азота, биосинтез ауксинов и образование HCN, что в совокупности стимулирует рост и развитие растения-хозяина.

Метилобактерии (в частности, *Methylobacterium*, *Methylobacillus*, *Methylophilus*, *Methylovorus*) обнаружены на листьях различных травянистых и древесных растений и зачастую входят в микробные сообщества филлопланы (Фёдоров и др., 2011; Капаруллина и др., 2017), что обусловлено, в том числе, потреблением ими метанола, выделяющегося растениями через устьица (Nemecsek-Marshall et al., 1995). Некоторые авторы свидетельствуют о большем распределении метилобактерий именно на нижней стороне листовой пластинки, где расположены устьица (Jourand et al., 2005). Метилобактерии относят к RGPB штаммам за счёт азотфиксации, способности к образованию стимуляторов роста растений и витамина B₁₂, а также образования фермента АЦК-деаминазы, снижающей концентрацию основного ингибитора роста растений – этилена (Фёдоров и др., 2011). В филлоплане клевера метилобактерии могут составлять до 80% от всех культивируемых гетеротрофных бактерий (Kutschera, 2007).

Микрококки широко представлены в почве и ризосфере растений, но также выделяются из филлосферы, например, растений сахарной свеклы (Thompson et al., 1993), пшеницы (Legard et al., 1994), щавеля (Jimoh et al., 2008). Представители рода *Spirosoma* встречаются в филлоплане некоторых растений тропических лесов (Kembel et al., 2014) и на древесных растениях умеренной зоны: например, *S. endophyticum* является эндофитом ивы (*Salix caprea*; Fries et al., 2013). Представители рода *Roseomonas* всё чаще выделяют из ризо- и филлопланы растений: *R. musae* входит в состав филлосферы банана (Naturatat et al., 2012), а *R. genomospecies* был выделен из стеблей *Lolium perenne* (Kukla et al., 2014).

Некоторые другие выделенные нами микроорганизмы также фигурируют в ряде статей, как входящие в состав ризо- и филлосферы растений: *Nocardioides panzhihuaensis* колонизирует стебли *Jatropha curcas* (Qin et al., 2012), представители рода *Marmoricola* выделены в качестве эндофитов мангровых деревьев (Jiang et al., 2018), а один из видов *Frigoribacterium* (*F. endophyticum*) из корней травянистого солончакового растения семейства амарантовых, *Anabasis elatior* (Wang et al., 2015). Представители рода *Serinicoccus*, прежде всего, заселяют различные морские местообитания (Traiwan et al., 2011).

Больше данных можно найти о присутствии в филлоплане других бактерий – представителей граммотрицательных бактерий, – сфингомонад, численность которых в разных частях растений варьирует от 10^3 до 10^7 . Они встречаются на листьях, цветах и семенах риса (*Oryza sativa*), вероники (*Veronica persica*), череды (*Bidens pilosa*) и вербейника (*Lysimachia mauritiana*; Kim et al., 1998), являются эндофитами кукурузы (McInroy and Kloepper, 1995), хлопка и ивы (Doty et al., 2009). Представители рода *Sphingomonas* принадлежат к группе PGPB и способны не только фиксировать азот, синтезировать ИУК или солюбилизовать фосфаты, но и образовывать другие фитогормоны, в частности, гибберелины, а также активны в отношении подавления фитопатогенных бактерий, стимулируя иммунный ответ растений (Khan et al., 2014; Innerebner et al., 2011). Примечательно, что представители сфингомонад также широко представлены среди ризобактерий изученных нами орхидей, одинаково активно заселяя филло- и ризоплану этих растений.

Другие бактерии, разнообразно и массово представленные как в ризоплане воздушных корней, так и филлоплане *D. moschatum*, принадлежат к микробактериям, которые встречаются и в филлосфере сельскохозяйственных растений: *Triticum aestivum* (Legard et al., 1994), *Beta vulgaris* (Thompson et al., 1993), *Solanum melongena* (Achari and Ramesh, 2014), *Oryza sativa* (Mano et al., 2007), а также ятрофы (Madhaiyan et al., 2015). Внутри рода *Microbacterium*, который объединяет к настоящему времени более 30-ти видов, наиболее часто в филлосфере ржи, пшеницы, клевера, кукурузы и картофеля встречаются *M. lacticum*, *M. foliorum*, *M. phyllosphaerae* и *M. testaceum* (Behrendt et al., 2001; Mukhtar et al., 2011; Morohoshi et al., 2011; Pereira and Castro, 2014). PGPB свойства этих бактерий также обусловлены солюбилизацией фосфатов, диазотрофией и биосинтезом ауксинов (Pereira and Castro, 2014). Таким образом, практически все выделенные нами культивируемые филлобактерии, входящие в состав фитомикробиома *D. moschatum*, встречаются в качестве фитосимбионтов других растений, причём во многих случаях показана их благотворная активность для роста и развития растения-хозяина.

Профилирование бактериального сообщества филлобактерий на базе платформы Illumina MiSeq показало, что подавляющее большинство ассоциативных филлобактерий *D. moschatum* относится к филуму *Actinobacteria* (42,57 и 90,45% при выделении отмытых листьев: нативной ДНК и при анализе ДНК из КОЕ, соответственно), другие идентифицированные виды принадлежат к филумам *Bacteroidetes* (1,35 и 16,45%) и *Deinococcus-Thermus* (4,16 и 18,57%). Существенно меньше их среди *Proteobacteria* (0,17 и 2,04%) и *Firmicutes* (0,03 и 1,23%; рис. 67). При сравнении состава сообществ нативных

(неотмытых) и отмытых листьев были выявлены некоторые отличия, подтверждающие присутствие транзитных бактерий, которые не заякореваются на листовой пластинке.

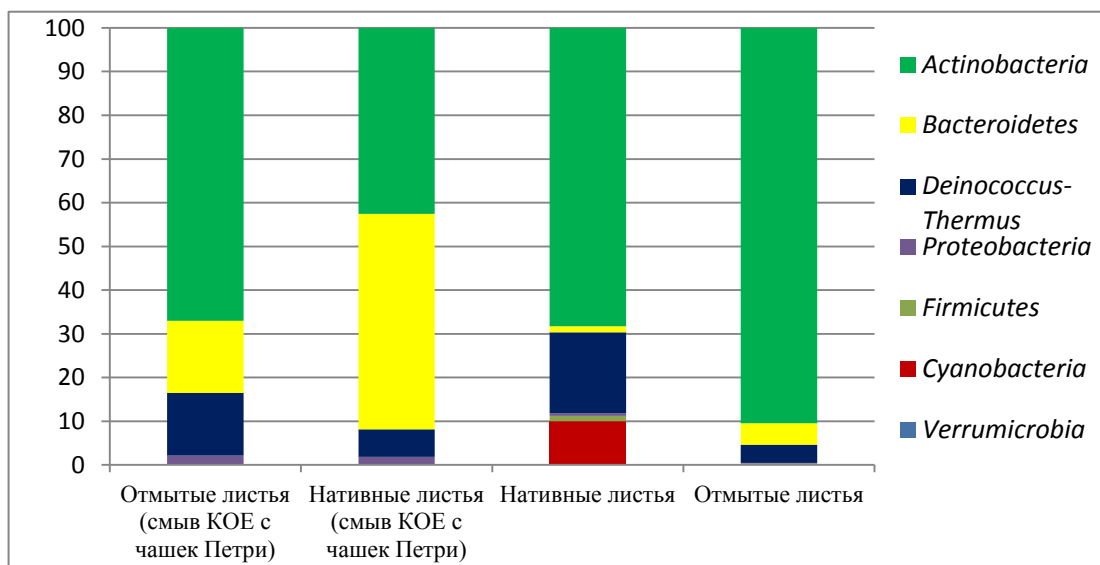
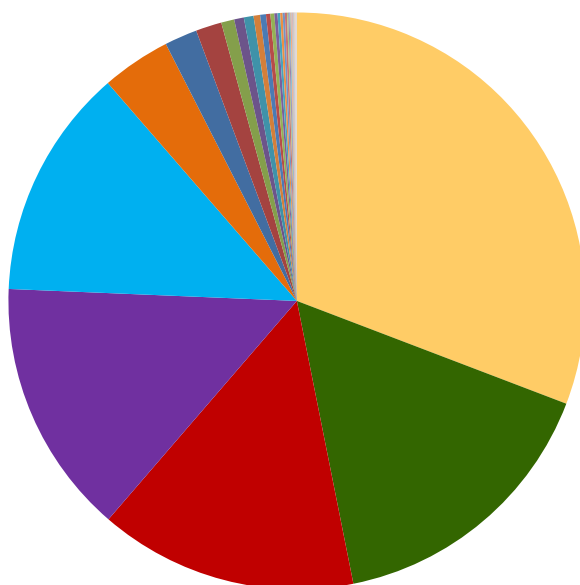


Рисунок 67. Профилирование сообщества филлобактерий *Dendrobium. moschatum*. Приведен сравнительный состав доминирующих филумов, выявленных при идентификации культивируемых гетеротрофных бактерий, выделенных чашечным методом на среде R2A, с отмытых и неотмытых (нативных) листьев, а также при анализе интактных и отмытых в воде листьев.

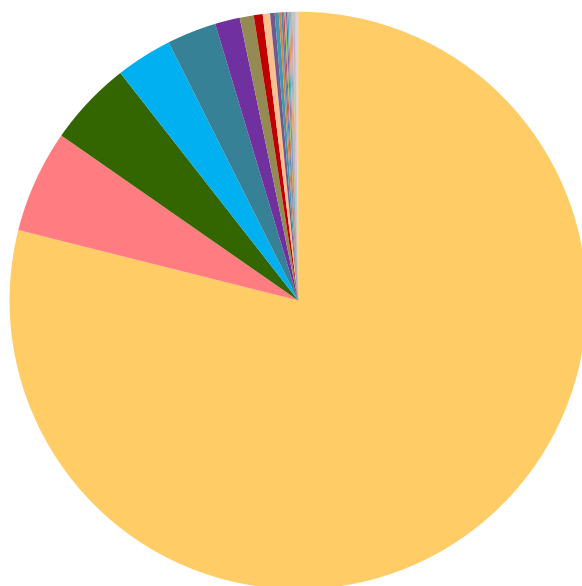
В филлоплане нативных листьев обнаружены представители цианобактерий (10% от состава сообщества). На обоих типах листьев актинобактерии занимают доминирующее положение. Содержание *Bacteroidetes* на отмытых листьях увеличилось незначительно – в 5 раз. Большее содержание в качестве транзитных микроорганизмов получили представители *Deinococcus-Thermus*, в основном детектируемые на неотмытых листьях. При анализе культивируемых бактерий (смыв биомассы выросших бактерий с поверхности агаризованной питательной среды), состав распределения доминирующих филумов ассоциативных филлобактерий изменился в основном за счёт увеличения содержания актинобактерий (рис. 67). Внутри филума *Proteobacteria* были идентифицированы преимущественно представители классов α -, β - и γ -*proteobacteria*. Интересно отметить, что β -протеобактерии были выявлены исключительно в растительных образцах, в то время как γ -*proteobacteria* – в составе микробных сообществ культивируемых на R2A бактерий. Во всех образцах доминирующие популяции филлобактерий представлены актинобактериями (54,5-98,5%).

Отмытые листья (смыв КОЕ с чашек Петри)



- *Microbacterium*
- *Hymenobacter*
- *Rathayibacter*
- *Deinococcus*
- *Kocuria*
- *Rhodococcus*
- *Arthrobacter*
- *Propionibacterium*
- *Paracoccus*
- *Kineococcus*
- *Granulibacter*
- *Sphingomonas*
- *Spirosoma*
- *Methylobacterium*
- *Frankia*
- *Nocardioideis*
- *Paenibacillus*
- *Agrococcus*
- *Janibacter*
- *Kitasatospora*
- *Streptomyces*
- *Sphingobium*
- *Corynebacterium*
- *Micrococcus*
- *Beutenbergia*
- *Sphingobacterium*
- *Agromyces*
- *Cellulosimicrobium*
- *Amycolatopsis*
- *Pseudonocardia*
- *Streptoalloteichus*

Отмытые листья



- *Microbacterium*
- *Rubrobacter*
- *Hymenobacter*
- *Kocuria*
- *Truepera*
- *Deinococcus*
- *Pseudonocardia*
- *Rathayibacter*
- *Rhodococcus*
- *Arthrobacter*
- *Propionibacterium*
- *Clostridium*
- *Bacillus*
- *Frankia*
- *Corynebacterium*
- *Micrococcus*
- *Geodermatophilus*
- *Burkholderia*
- *Prevotella*
- *Kineococcus*
- *Spirosoma*
- *Nocardioideis*
- *Mesorhizobium*
- *Brevundimonas*
- *Sphingobacterium*
- *Tropheryma*
- *Faecalibacterium*
- *Veilonella*

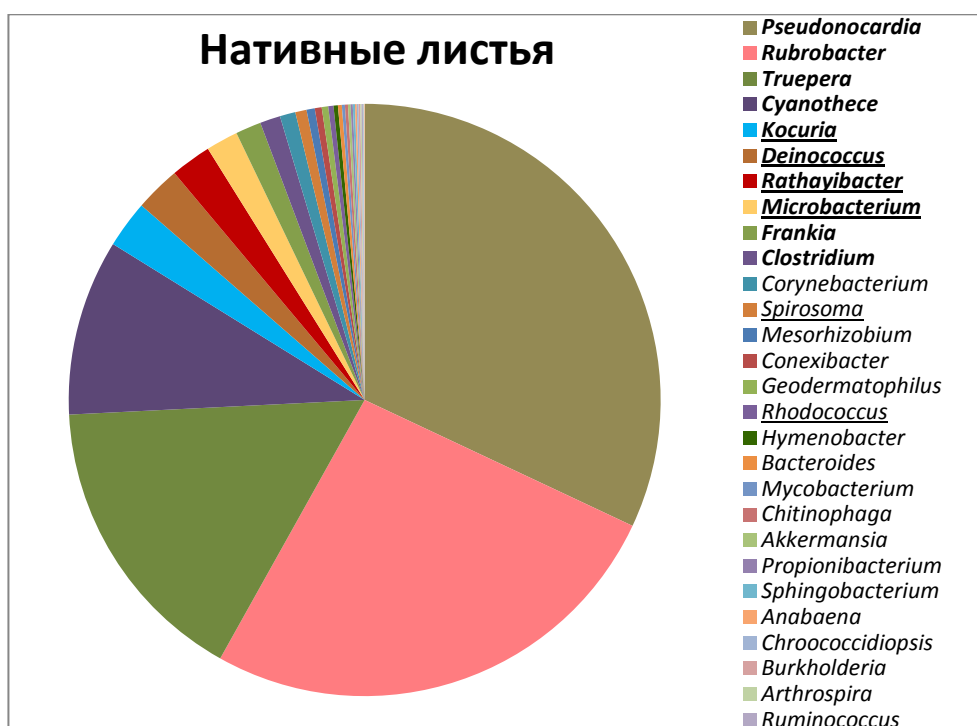


Рисунок 68. Профилирование микробного сообщества филлобактерий *D. moschatum* (на уровне принадлежности к роду). Жирным шрифтом выделены микроорганизмы, содержание популяций которых >1%, подчёркнуты те представители, которые были выделены в чистую культуру и идентифицированы.

При анализе биомассы КОЕ *Firmicutes* представлены минимальным разнообразием – это *Bacillus* и *Clostridium* и количеством (0,15% и 0,03% от общего состава сообщества, соответственно). В сообществе филлопланы листьев встречаются представители обоих этих классов, но их содержание не превышает 1,2% на неотмытых листьях (с учётом транзитных микроорганизмов) и менее 1% – на отмытых листьях (рис. 67, 68). Таким образом, спороносодержащие грамположительные бактерии представлены в составе филлобактерий эпифита *D. moschatum* незначительно. Представители *Bacteroidetes* в растительных образцах включают большее разнообразие бактерий с преобладанием класса *Cytophagia*.

Преобладающей группой являются *Actinobacteria* с преобладанием культивируемых филлобактерий, относящихся к порядку *Micrococcales* (90,2-91,7%), тогда как в нативных образцах листьев большая часть представлена *Pseudonocardiales* и *Rubrobacterales* (46,9 и 38,2% соответственно). Разнообразие филлобактерий на уровне рода представлено на рисунке 68. Численность родов, микробные популяции которых превышали 1% для интактных (нативных) листьев – это *Pseudonocardia*, *Rubrobacter*, *Truepera*, *Cyanothece*, *Kocuria*, *Deinococcus*, *Rathayibacter*, *Microbacterium*, *Frankia* и *Clostridium*, а среди ассоциативных филлобактерий (на отмытых листьях) доминировали представители *Microbacterium*, *Rubrobacter*, *Hymenobacter*, *Kocuria*, а также *Truepera* и *Deinococcus*.

Анализ тотальной ДНК, полученной после смыва выросших на питательной среде колоний бактерий из посева суспензии нативных листьев, показал, что среди идентифицированных (более сорока) родов, семь составляли более 1% популяции в микробном сообществе. Сходные результаты были получены и при анализе тотальной ДНК, полученной при высеве суспензии отмытых листьев (тридцать четыре и восемь родов, соответственно). Для обоих типов листьев общими оказались двенадцать представителей доминирующих популяций: *Microbacterium*, *Corynebacterium*, *Deinococcus*, *Frankia*, *Hymenobacter*, *Kocuria*, *Propionibacterium*, *Pseudonocardia*, *Rathayibacter*, *Rhodococcus*, *Sphingobacterium* и *Spirosoma*.

Представители *Hymenobacter*, *Rubrobacter* и *Truepera*, входящие в число доминирующих ассоциативных филлобактерий были идентифицированы при профилировании растительных образцов, но не чашечным методом. Однако представители рода *Hymenobacter* также были выявлены с помощью HTS анализа в составе культивируемых бактерий. Примечательно, что именно представители филума

Deinococcus-Thermus, а также протеобактерии из рода *Hymenobacter* и актинобактерии из рода *Rubrobacter* известны как организмы, высокорезистентные к ионизирующему и УФ излучению (Egas et al., 2014), что может объяснять их наличие в филлоплане, где фотосинтезирующие части растений находятся непосредственно под воздействием ультрафиолетового излучения.

Необходимо отметить, что доминирующие бактериальные популяции филлопланы схожи на интактных и отмытых листьях и характеризуется присутствием *Burkholderia*, *Deinococcus*, *Corynebacterium*, *Hymenobacter*, *Frankia*, *Kocuria*, *Propionibacterium*, *Microbacterium*, *Sphingobacterium*, *Rhodococcus*, *Spirosoma*, *Rathayibacter*, *Truepera* и *Rubrobacter*. Однако существенные отличия заключаются в их количественном составе: если на интактных листьях содержание представителей *Pseudonocardia*, *Rubrobacter*, *Kocuria*, *Truepera*, *Deinococcus* и *Microbacterium* составило 32%, 26%, 2%, 16%, 2% и 1%, соответственно, то после отмывки листьев представители *Microbacterium* получили преимущественное распространение (79%) в популяции филлобактерий, тогда как доля остальных родов сократилась, не превышая 1%, 6%, 4%, 3% и 2%, соответственно, что подтверждает наличие транзитных микроорганизмов на листовой поверхности.

Представители микробактерий оказались доминирующими актиномицетами как при анализе филлопланы листьев *D. moschatum*, так и при профилировании сообщества культивируемых бактерий при анализе КОЕ. При этом их количество при анализе растительных образцов в 4 раза превышало таковое при анализе бактериальной ДНК. Кроме микробактерий, среди основных популяций истинно ассоциативных филлобактерий (на отмытых листьях) были представители *Hymenobacter* (5-48%), *Deinococcus* (1-6%) и *Kocuria* (3-10%). Среди выделенных филлобактерий много представителей diaзотрофных микроорганизмов: так, виды *Sphingomonas* и *Mesorhizobium* являются известными азотфиксаторами, что зачастую определяет их PGPB свойства. Представители *Sphingomonas* формируют доминантную группу в фитомикробиоме *D. catenatum*, заселяя ризоплану, а также встречаясь эндофитно (Videira et al., 2009; Li et al., 2017). Как мы показали, сфингомонады активно заселяют корни изученных нами эпифитных орхидей (рис. 65, табл. 19, Tsavkelova et al., 2016), причём преимущественно воздушные корни, отражая близость этих экологических ниш.

Другие азотфиксаторы – *Burkholderia* также были выделены нами в составе сообщества ризопланы дикорастущих орхидей (табл. 15, 16, Tsavkelova et al., 2007a). Их выделяют также из различных сельскохозяйственных растений, а в последнее время

появляются данные о наличии непатогенных для растений штаммов, которые, более того, играют роль PGPB, определяя эндофитную diaзотрофную активность в ассоциациях с тропическими травами (Dalton et al., 2004). Представители *Mesorhizobium* sp. широко представлены в естественных и искусственных симбиозах с растениями семейства *Fabaceae*, *Leguminosae* (Bottomley and Maggard, 1990). Кроме азотфиксации эти бактерии активно образуют стимуляторы роста растений (Ahmad et al., 2008) и участвуют в солюбилизации фосфатов (Peix et al., 2001).

Таким образом, изучение состава сообщества филлобактерий с помощью высокопроизводительного секвенирования подтвердило результаты идентификации отдельно изолированных колоний бактерий. Несмотря на то что с помощью высева на питательные среды и последующего секвенирования отобранных колоний было идентифицировано 17 родов, а с помощью Illumina – 28-43, была подтверждена преобладающая роль актинобактерий. Сочетание молекулярно-биологических и традиционных методов обеспечивает стратегию максимально полного и точного анализа состава подобных бактериальных сообществ.

Растения в течение всей жизни взаимодействуют с микроорганизмами, что определяет устойчивость и приспособленность консорциумов к динамичной среде обитания. Всё больше используются термины микробиом, фитобиом, фитомикробиом растений (Uroz et al., 2019). Длительное время устойчивое положительное влияние рассматривали исключительно только для симбиотических бактерий, тогда как современные тенденции всё больше акцентируют внимание на ассоциативной микробиоте растений, на функциональной активности фитомикробиома. При этом среди основных драйверов, которые определяют состав такого микробного сообщества, выявляют как внешние факторы (состав и структура почвы, абиотические факторы окружающей среды, например, климат, влажность, освещённость, температура), но также и внутренние – особенности биологии растений, различие экотипов, представляемых растением (корни, листья, стебли, цветы, плоды; поверхность или же внутренние ткани растений), концентрацию и состав экзометаболитов и экссудатов (Marschner et al., 2001; Chaparro et al., 2014; Colin et al., 2017). Современные стратегии изучения фитомикробиомов, как и прежде, прежде всего, связаны с изучением сельскохозяйственных растений, что объясняется экономической целесообразностью и необходимостью поиска новых экологических подходов к земледелию.

В отличие от других "почвенных" растений, у эпифитных орхидей, по сути, фитомикробиом формируется из различных бактериальных популяций, составляющих отличающиеся по своему биоразнообразию и функциональной активности сообщества их субстратных корней, погруженных полностью или частично в субстрат, ризопланы их воздушных корней, находящихся в воздушной среде, и филлопланы. Зоной наибольшей микробной активности становится непосредственно ризо- и филлоплана, а не практически отсутствующая (в особенности, у воздушных корней) эпифитов область ризосферы. Эти факты обуславливают тесное взаимодействие растения с его ассоциативными микробными сообществами, вынуждая селективировать определённым образом благоприятных и полезных для успешного взаимного существования партнёров, улучшающих рост и развитие растения и способствующих повышению его адаптационных свойств. Имея практически отличающиеся друг от друга "сайты формирования микробных сообществ" (корни обоих типов, листья) на одном эпифите, растение значительно расширяет свои возможности за счёт различных популяций колонизирующих его микроорганизмов, что позволяет с максимальной выгодой использовать партнёров в консорциуме.

3.3. Микробный биосинтез стимуляторов роста растений

Способность к образованию фитогормонов микроорганизмами, вступающими во взаимоотношения с растениями, является одним из основных путей прямого взаимодействия, по сути, коммуникации между растением-хозяином и его микробными партнёрами. Низкомолекулярные соединения, представляющие собой вторичные метаболиты, которые синтезируются микроорганизмами, входящими в фитобиом, оказывают прямое и точечное воздействие на рост и развитие растения. Среди стимуляторов роста растений особую роль играет ауксин, без которого практически невозможно представить ризогенез. Способность к биосинтезу именно этого соединения считается характерным для RGPB штаммов свойством. С целью определения способности микроорганизмов, вступающими в ассоциативные взаимоотношения с эпифитными орхидеями, к биосинтезу стимуляторов роста, таких как аускины и гиббереллины, нами были изучены различные группы микроорганизмов, входящие в этот микробно-растительный консорциум.

3.3.1. Биосинтез ауксинов цианобактериями

Некоторые из выделенных нами азотфиксирующих нитчатых цианобактерий были очищены в чистую культуру путём нескольких пересевов и изолирования отдельных колоний на безазотистой полужидкой среде BG₀. Несколько штаммов, принадлежащих к родам *Nostoc* sp., *Anabaena* sp. и *Calothrix* sp., были исследованы с помощью колориметрического теста с реактивом Сальковского на их способность к образованию ауксина (ИУК). Без добавления триптофана (индуктор биосинтеза ИУК) уровень биосинтеза едва достигал 1,4 мкг/мл. Добавление триптофана позволило увеличить образование ИУК: на среде BG-11 *Nostoc* sp. №1 (изолят, выделенный с корней *Dendrobium bigibbum*) образовывал 5,8 мкг/мл ИУК (или 3,3 мкг ИУК в пересчете на мг биомассы), *Anabaena* sp. №3 (изолят с корней *Phalaenopsis amabilis*) – 12,8 мкг/мл ИУК (9,7 мкг ИУК/мг), а *Calothrix* sp. (также выделенный с корней *P. amabilis*) – 7,6 мкг/мл ИУК (4,3 мкг ИУК/мг; Tsavkelova, 2011). На безазотистой среде BG₀ штаммы *Anabaena* sp. и *Calothrix* sp. оказались более продуктивными и образовывали по 20 мкг/мл, в то время как штамм *Nostoc* sp. не показал какой-либо заметной разницы в биосинтезе.

Триптофан-зависимый биосинтез ИУК ранее был отмечен как у свободноживущих, так и у симбиотических цианобактерий (Sergeeva et al., 2002). Симбиотические цианобактерии могут использовать способность образовывать ауксины в своей стратегии взаимодействия с растением-хозяином, особенно когда цианобактериальные партнеры локализуются внутри тканей растений (Sergeeva et al., 2002). Для некоторых изолятов *Anabaena* (CW1, RP9) показана возможность использования триптофан-независимого пути образования ИУК. При этом максимальные концентрации (6-11 мкг/мл) были достигнуты культурами к 14-21 сут в условиях фотопериодизма (день-ночь), тогда как при постоянном освещении уровень биосинтеза ИУК заметно снижался (Prasanna et al., 2010).

Помимо выявленной нами ранее высокой diaзотрофной активности ассоциативных цианобактерий (Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003 а,б), что позволяет успешно развиваться и процветать всему консорциуму микроорганизмов в ризоплане воздушных корней эпифитных орхидей, данные о потенциальном вкладе цианобактериального сообщества в изменение фона экзогенного пула ауксинов также позволяют предполагать их влияние на ризогенез воздушных корней эпифитов, учитывая чрезвычайно высокую плотность клеток и наращиваемую ими на корнях биомассу, которая в отдельных случаях приводит к появлению массивной биоплёнки и чехол-подобных обрастаний.

3.3.2. Биосинтез фитогормонов ассоциативными микромицетами

При изучении изолятов микромицетов, принадлежащих преимущественно к родам *Fusarium* и *Trichoderma*, и выделенных из ризопланы и эндофитно из корней оранжерейных орхидей *D. moschatum* и *A. praemorsa*, ранее (Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003в) нами была показана их способность к биосинтезу ауксинов. При добавлении экзогенного триптофана в среду (100 мкг/мл) практически все исследованные штаммы образовывали ИУК в достаточно высоких количествах, около 20 мкг/мл. Некоторые изоляты, например, выделенный представитель базидимицетов и эндофитный вид *Fusarium proliferatum* ET1 образовывали 115 и 39 мкг/мл ИУК, соответственно. При этом базовый уровень биосинтеза ИУК у эндофитных микромицетов практически отсутствовал (≤ 1 мкг/мл), в то время как другие представители рода *Fusarium* образовывали в пределах 5-10 мкг/мл ИУК. При добавлении экзогенного триптофана у представителей рода *Fusarium* была отмечена его эффективная конверсия в ИУК, что способствовало увеличению выхода ИУК до 20-50 мкг/мл (у видов *F. solani* и *F. proliferatum*) и выше (70-130 мкг/мл – у *F. oxysporum* и *F. ventricosum*).

Исследованные нами изоляты триходермы показали, что уровень биосинтеза ИУК у них не превышал 15-20 мкг/мл даже после добавления триптофана. Таким образом, влияние триптофана на конечный выход продукта значительно различается не только между представителями различных родов, но и между различными видами и изолятами, что делает взаимодействие между растением-хозяином и его ассоциативными, а тем более эндофитными партнёрами очень индивидуальным. Известно, что чрезмерный биосинтез ИУК характерен для патогенов, тогда как ростостимулирующие микроорганизмы синтезируют ИУК в средних количествах, что позволяет растению оптимально реагировать на эти внешние сигналы и ризогенез проходит наиболее эффективным образом, создавая оптимальные условия для развития и взаимодействия обоих партнёров.

Анализ образуемых грибами ауксинов с помощью тонкослойной хроматографии выявил наличие у них соединения, идентичного индолил-3-уксусной кислоте (Цавкелова и др., 2003г), а её биологическая активность, была подтверждена в биотестах с растениями на ауксин-зависимое растяжение клеток с колеоптилями пшеницы, а также на стимуляцию ризогенеза (формирование и рост корней) черенков фасоли обыкновенной (табл. 23, рис. 69).

Таблица 23. Влияние ауксинов, содержащихся в культуральной жидкости ассоциативных микромицетов - представителей рода *Fusarium* на длину coleoptилей *Triticum aestivum* L. (с изменениями по Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003г).

Микромицеты	среднее значение длины coleoptилей, мм
<i>Fusarium oxysporum</i> ^a	5.6 ± 0.55
<i>F. solani</i>	5.8 ± 0.45
<i>F. proliferatum</i> ET1 ^a	5.8 ± 0.40
<i>F. ventricosum</i>	6.0 ± 0.55
ИУК (50 мкг/мл)	6.4 ± 0.55
Среда (контроль)	5.4 ± 0.55

Примечание: В таблице приведены объединённые экспериментальные данные с учётом полученных ранее (Цавкелова, 2003) и результатов этого исследования (^a).



Рисунок 69. Биологическая активность ауксинов, содержащихся в культуральной жидкости некоторых ассоциативных микромицетов, на увеличение высоты закладки корней и их количества у черенков фасоли *Phaseolus vulgaris* L.: 1 — *F. proliferatum* ET1, 2 — *F. solani*, 3 — базидиомицет, 4 — *F. oxysporum*, 5 — *F. ventricosum*, "-" — стерильная среда Чапека-Докса, "ИУК" — раствор ИУК (50 мкг/мл; с изменениями по Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003г).

При изучении способности выделенных представителей рода *Fusarium* к биосинтезу других стимуляторов роста, таких как гиббереллины и цитокинины, было выявлено, что ни один из изученных грибов не образовывал ключевой гиббереллин — гибберелловую кислоту (ГК₃), что подтвердили результаты тонкослойной хроматографии (ТСХ), в результате проведения которой не было найдено соответствия по значению R_f с метчиком, а также в биотестах с листовым салатом (сорт "Берлинский жёлтый"): культуральная жидкость исследованных микромицетов, также как и негативный контроль (среда) не способствовала увеличению гипокотилей прорастающих семян этого растения, тогда как аутентичное вещество (ГК₃) в концентрации 10 мг/л увеличивало их длину в два раза (данные не представлены).

Несмотря на то что ранее (Цавкелова, 2003) при анализе с помощью ТСХ соединения, наиболее близкие по значению R_f к цитокининам, в особенности, зеатину, были выявлены у базидиомицета, *T. viride* и *F. culmorum*, их биологическая активность не подтвердилась в биотестах, основанных на сохранении хлорофилла во фрагментах листовых пластин пшеницы. При анализе культуральной жидкости *F. proliferatum* ET1 были получены сходные данные: несмотря на то, что показатели R_f опытного (0,64) и контрольного (аутентичное соединение зеатина; 0,63) вариантов были достаточно близкими, в биотесте сохранение хлорофилла в листовых пластинах не наблюдали.

Таким образом, основным стимулятором роста растений, который наиболее широко образуют ассоциативные микромицеты орхидей, проявляющим непосредственную биологическую активность, являются ауксины (ИУК), причём у всех изученных изолятов образование ИУК оказалось триптофан-зависимым. Для исследования механизмов биосинтеза ИУК и других фитогормонов нами был отобран эндофитный штамм *F. proliferatum* ET1, проявивший целый ряд индивидуальных особенностей, отличающийся от других изолятов рода *Fusarium*, в том числе по разнообразию биосинтеза фитогормонов и умеренному количеству образования ИУК. В отличие от фитопатогенных грибов этот микромицет проявил нейтральную стратегию взаимодействия с генеративно-зрелыми растениями орхидей (раздел 3.2.2.3.).

3.3.2.1. Биосинтез ауксинов *Fusarium proliferatum* ET1

С целью более подробной функциональной характеристики биосинтеза ИУК у *F. proliferatum* ET1 было проведено исследование механизмов биосинтеза ауксинов в сравнении с известными патогенными представителями рода *Fusarium*: *F. fujikuroi*, *F. verticillioides* и *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 42-87. Для некоторых патогенных микроорганизмов, в том числе бактерий *Pseudomonas syringae*, *P. savastanoi* и *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) известно, что биосинтез ИУК у них осуществляется по ИАМ (индолил-3-ацетамид) пути (Spaepen and Vanderleyden, 2011; Cerboneschi et al., 2016). С целью определения функциональной активности этого пути у представителей рода *Fusarium* был проведен поиск гомологов белковых молекул внутри базы данных геномов BLASTP по аминокислотным последовательностям, соответствующим ферменту бактериальной триптофан-2-монооксигеназы (*IaaM*) и ИАМ (индолил-3-ацетамидгидролазы (амидаза, *IaaH*) из *Agrobacterium tumefaciens* (AJ237588.1, NP_059675.1) и *Pseudomonas syringae* (AAR06971.2, NC_007005.1). Последовательности с

высокой гомологией к бактериальному гену *IaaM* были обнаружены только у *F. verticillioides* и *F. oxysporum*, тогда как амидазы с высокой гомологией с бактериальными генами *IaaH* были идентифицированы во всех исследованных грибных геномах (рис. 70А).

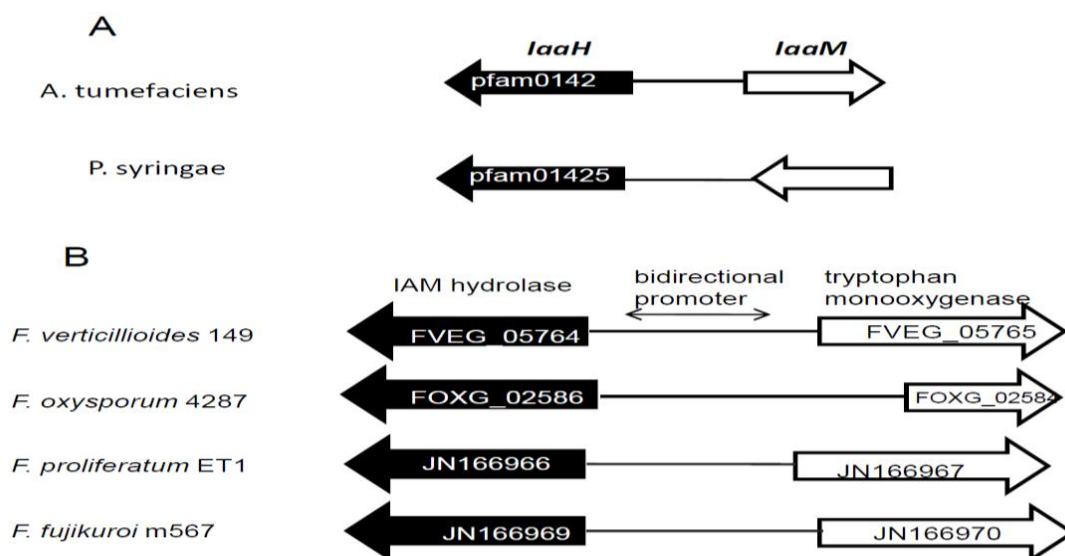


Рисунок 70. Организация локуса IAM генов у четырех видов *Fusarium*. Последовательности *F. verticillioides* и *F. oxysporum* были получены из базы данных BROD. Локусы IAM из *F. proliferatum* и *F. fujikuroi* были получены и секвенированы в этом исследовании (с изменениями по Tsavkelova et al., 2012).

Было показано, что и у *F. verticillioides* и у *F. oxysporum* оба гена расположены друг за другом и имеют характерную некодирующую область между ними; такая же существуют и у бактерий, у которых оба гена расположены последовательно в одном генетическом локусе (Spraeren et al., 2007, 2015). Оба гена у *F. verticillioides* расположены в противоположной друг другу ориентации относительно направления транскрипции и разделены участком в 1854 п.о. (рис 70 В). Этот предполагаемый локус ИАМ-пути биосинтеза ИУК отсутствует у *Fusarium graminearum* и *F. solani*, не принадлежащим к комплексу видов *G. fujikuroi*, но удалось амплифицировать сходный участок у выделенного с орхидей штамма *F. proliferatum* ET1 и *F. fujikuroi* IMI58289, принадлежащих к группе видов комплекса *G. fujikuroi* (Leslie and Summerell, 2006). Геномные участки, соответствующие кластеру IAM гена из *F. proliferatum* ET1 и *F. fujikuroi* IMI58289 были клонированы и затем секвенированы (accession numbers JN166965 и JN166968, соответственно). При анализе содержания ИУК в фильтратах (культуральной жидкости) микромицетов с помощью колориметрического анализа было показано, что все изученные виды образовывали индольные вещества (ауксины) при добавлении триптофана к среде (табл. 24, рис. 71), при этом *F. proliferatum* ET1 образовывал большее количество ИУК, чем другие микромицеты.

Таблица 24. Динамика образования ИУК представителями рода *Fusarium* (с изменениями по Tsavkelova et al., 2012).

Species	Indoles (OD ₅₄₀ , µg/ml)							
	24h		32h		48h		72h	
	-Trp	+Trp	-Trp	+Trp	-Trp	+Trp	-Trp	+Trp
<i>F. oxysporum</i> 4287	0.09 ±0.01	4.15 ±0.31	0.42 ±0.06	6.30 ±0.81	1.37 ±0.39	7.85 ±1.01	0.46 ±0.08	10.54 ±1.32
<i>F. proliferatum</i> ET1	0.36 ±0.05	8.26 ±0.27	0.60 ±0.10	15.83 ±2.77	1.23 ±0.15	29.47 ±2.24	1.05 ±0.32	46.95 ±3.61
<i>F. fujikuroi</i> m567	0.23 ±0.05	2.46 ±0.11	0.45 ±0.03	4.70 ±0.42	1.60 ±0.30	6.89 ±0.19	2.06 ±1.03	6.84 ±0.92
<i>F. verticillioides</i> 149	0.14 ±0.08	5.57 ±0.20	0.47 ±0.06	8.62 ±0.96	1.96 ±0.28	10.72 ±0.80	1.32 ±0.15	8.90 ±0.58

Содержание индольных веществ (ИУК) определяли колориметрически с реактивом Сальковского в динамике (24 ч, 32 ч, 48 ч, 72 ч); поглощение измеряли при длине волны 540 нм. Значения представлены средним из трёх повторностей ± стандартное отклонение.

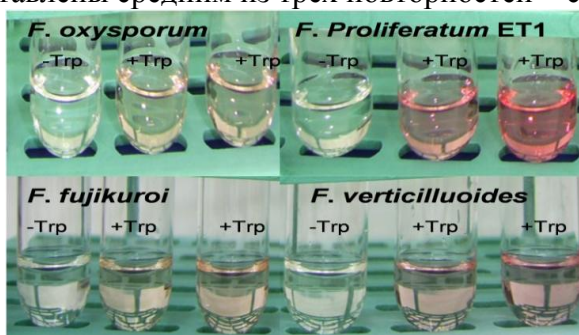
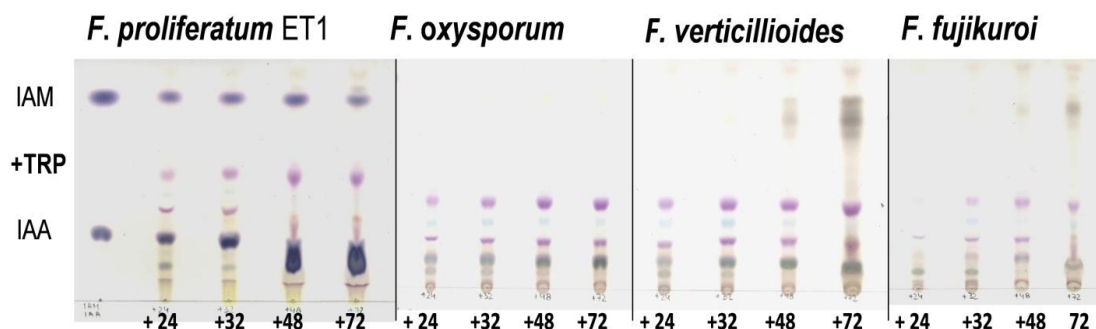


Рис. 71. Образование ИУК на жидкой среде Чапека-Докса без (-Trp) и с добавлением (+Trp) 4мМ триптофана после 24 и 32 ч культивирования. КЖ грибов после инкубации с реактивом Сальковского; содержащиеся в ней индольные вещества приобретают розовую окраску, интенсивность окрашенности пропорциональна количеству индольных веществ в пробе.

При проведении ТСХ анализа основной интермедиат ИАМ-пути, индолил-3-ацетамид (ИАМ) был обнаружен только в КЖ *F. proliferatum* ET1, некоторый слабый сигнал был получен от *F. verticillioides*, а у двух других фитопатогенных видов *F. oxysporum* и *F. fujikuroi* образование ИАМ отмечено не было (рис. 72). Без добавления экзогенного триптофана в среду исследованные грибы образовывали только следовые количества ИУК, либо индольные соединения вообще не детектировались (как, например, в КЖ *F. oxysporum*). В экспериментах, где добавляли экзогенно ИАМ с целью определения его конверсии в ИУК за счет активности амидазы, только штамм *F. proliferatum* ET1 утилизировал его, полностью превращая в ИУК (рис. 70). Некоторая активность этого фермента была обнаружена у *F. verticillioides*, тогда как у представителей *F. oxysporum* и *F. fujikuroi* она полностью отсутствовала, и добавленный в среду ИАМ оставался неиспользованным. Таким образом, эти результаты впервые показали наличие и активность обоих ферментов (триптофан-2-монооксигеназы и ИАМ-гидролазы) у *F. proliferatum* (штамм ET1). Образование ИУК у *F. verticillioides* в среде с экзогенным ИАМ является индикатором активности ИАМ-гидролазы, тогда как активность триптофанмонооксигеназы значительно снижена, фермент нефункционален.

A



B

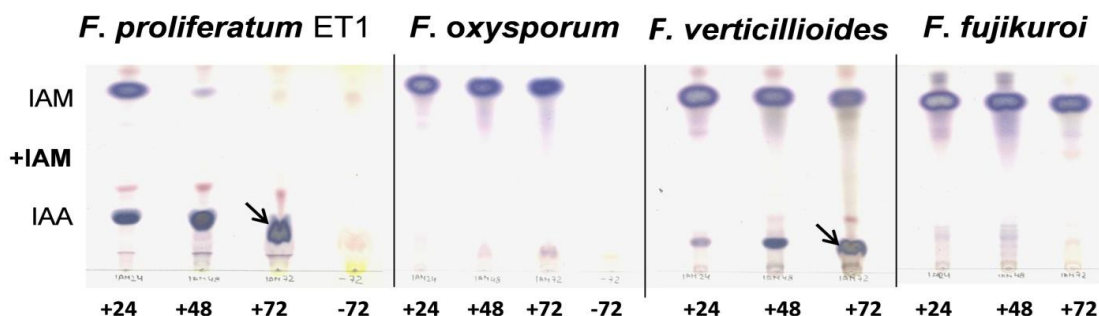


Рисунок 72. Образование ИУК (IAA) из триптофана и ИАМ (IAM) четырьмя видами *Fusarium* на среде Чапека-Докса без (-) и с добавлением (+) в среду культивирования 4 мМ триптофана (+TRP) (A) или 0,5 мМ ИАМ (+IAM) (B). Экстракцию и определение содержания индольных веществ проводили в динамике роста микроорганизмов через 24, 32, 48 и 72 часа культивирования.

Для того чтобы оценить активность ферментов ИАМ-пути у *F. proliferatum* ET1 был проведен *in vitro* анализ конверсии триптофана и ИАМ клеточными экстрактами, содержащими ферменты, полученные в неденатурирующих белок условиях из мицелия этого микромицета, выращенного на трёх типах сред (Чапек-Докс, EMS, PDB). Биосинтез ИУК был отмечен на всех типах сред: значительно более высокие количества ИУК были получены с использованием экзогенного ИАМ по сравнению с более низким её уровнем, когда в качестве предшественника биосинтеза ИУК использовали триптофан (рис. 73).

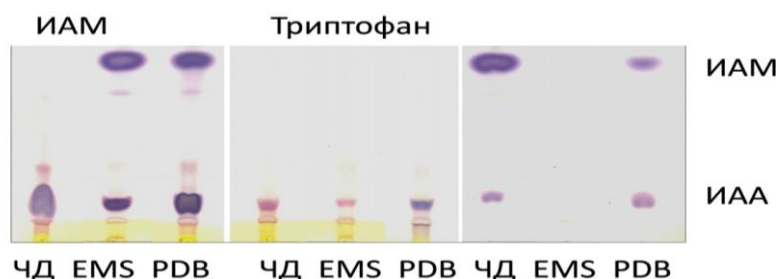


Рисунок 73. Ферментативная активность бесклеточных экстрактов *Fusarium proliferatum* ET1 на средах Чапека-Докса (ЧД), среде Ehmer's YPSs (EMS), картофельно-декстрозном бульоне (PDB) в течение 72 ч. Полученные экстракты белков инкубировали с триптофаном или ИАМ, а затем индольные соединения экстрагировали и анализировали с помощью ТСХ.

Слабая полоса, соответствующая ИАМ, была отмечена на хроматограмме через 6 ч инкубации (результаты не представлены), когда триптофан использовали в качестве предшественника, однако, эта полоса исчезала и ИАМ не был обнаружен в реакционной среде после 20 ч инкубации с триптофаном. Эти результаты подтверждают активность ИАМ-пути у *F. proliferatum* ET1 и указывают на более сильную активность ИАМ-гидролазы, второго фермента, превращающего ИАМ в ИУК, в отличие от первого фермента, триптофан-2-монооксигеназы, которая катализирует превращение триптофана в ИАМ. Таким образом, первая стадия конверсии триптофана в ИАМ может быть лимитирующей в этом пути биосинтеза ИУК.

Для того, чтобы убедиться, что именно определенные локусы кодируют ферменты ИАМ пути, мы удалили путём делеции весь участок (открытые рамки считывания для обоих генов и межгенный участок) у дикого типа *F. proliferatum* ET. Дикий тип и делеционные мутанты $\Delta iaam/\Delta iaah$ культивировали в среде с экзогенными триптофаном или ИАМ, а количество образуемых ИАМ и ИУК измеряли с помощью ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография, табл. 25). Делеционные мутанты показали значительное сокращение уровня ИУК в среде с индуктором-триптофаном по сравнению с диким типом.

Таблица 25. HPLC (ВЭЖХ) анализ содержания ИУК и ИАМ в диких типах *Fusarium* и мутантных штаммах (с изменениями по Tsavkelova et al., 2012).

Вид/штамм	Предшественник Триптофан (4 мМ)		Предшественник ИАМ (0.5 мМ)
	ИАМ (мМ)	ИУК (мМ)	ИУК (мМ)
<i>F. proliferatum</i> ET1	23.0	78.7	105.1
<i>F. verticillioides</i>	7.6	10.2	76.3
<i>F. oxysporum</i>	15.2	15.7	18.9
<i>F. fujikuroi</i>	9.0	9.3	14.1
<i>F. proliferatum</i> ET1 № 612	6.5	12.3	11.8
<i>F. fujikuroi</i> T1	9.5	10.4	150.6
<i>F. fujikuroi</i> T2	224.2	1459.4	225.4

Примечания: количественное содержание ИАМ и ИУК определяли с помощью ВЭЖХ путем сравнения площади пиков с областью известных количеств аутентичных (стандартных) соединений ИАМ и ИУК. *F. proliferatum* №612 представляет собой двойной делеционный мутант $\Delta iaam/\Delta iaah$. *F. fujikuroi* T1 представляет собой трансгенный штамм, экспрессирующий ген *F. proliferatum* ET1 *IAH1*, *F. fujikuroi* T2 представляет собой трансгенный штамм (overexpression mutant), экспрессирующий оба гена *F. proliferatum* ET1 – *IAM1* и *IAH1*. Представленные значения являются средними из трех повторностей.

Несмотря на то, что результаты анализа с помощью ВЭЖХ показали присутствие небольшого пика, соответствующего времени удержания ИАМ в КЖ делеционного мутанта, но ТСХ анализ не выявил пятен, соответствующих ИАМ, при культивировании с триптофаном в качестве предшественника, в отличие от дикого типа (рис. 74).

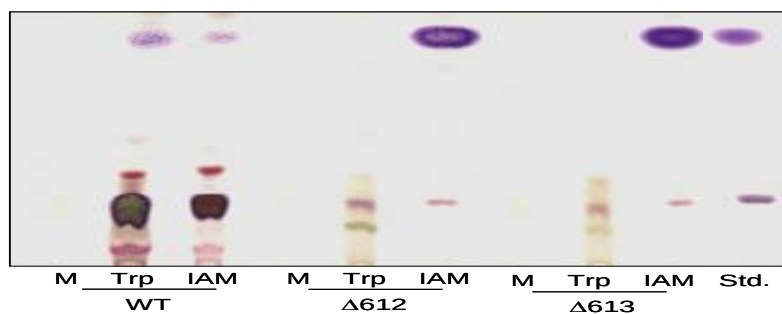


Рисунок 74. Образование и конверсия индолил-3-ацетамида (ИАМ) в ИУК с экзогенным триптофаном (Trp) и ИАМ (IAM) диким типом *Fusarium proliferatum* ET1 и двумя делеционными мутантами ($\Delta 612$ и $\Delta 613$). STD - стандартные метчики ИУК и ИАМ (Tsavkelova et al., 2012).

У делеционных мутантов в случае, когда ИАМ добавляли к среде культивирования, он сохранялся в среде и практически не конвертировался в ИУК, в отличие от его полной конверсии в ИУК у дикого типа *F. proliferatum* ET1. Эти результаты подтверждают, что идентифицированный нами локус кодирует гены ИАМ-пути биосинтеза ИУК у *F. proliferatum*. Соответствующие гены были обозначены и зарегистрированы как *IAM1* (JN166967) и *IAM1* (JN166966) для генов *F. proliferatum* *IaaM* и *IaaH*, соответственно.

Для дальнейшего исследования мы провели трансформацию *F. fujikuroi* для получения мутантов с избыточной экспрессией по этим генам. Дикий тип *F. fujikuroi* образует лишь следовые количества ИУК и не образует ИАМ. Мы получили трансформантов, экспрессирующих один ген *IAM1* (7 изолятов, представленных штаммом T1, рис. 75, 77; табл. 26), или оба гена *IAM1* и *IAM1* (три изолята, представленных штаммом T2).

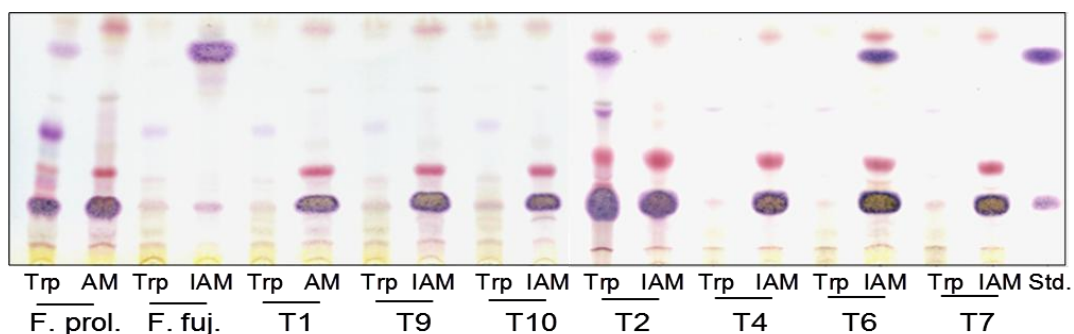


Рисунок 75. Образование ИАМ и ИУК дикими типами *F. fujikuroi* и *F. proliferatum* ET1 и трансгенными overexpressing-штаммами (T) при дополнительном внесении в среду триптофана (Trp) и ИАМ (IAM).

Таблица 26. Образование индольных соединений дикими типами *F. fujikuroi* и *F. proliferatum* и трансгенными overexpressing штаммами T1 и T2 (по Tsavkelova et al., 2012)

Species	Indoles (µg/ml)					
	24 h		48 h		72 h	
	+Trp	+IAM	+Trp	+IAM	+Trp	+IAM
<i>F. proliferatum</i> ET1	35.10 ± 2.15	44.46 ± 4.10	47.70 ± 2.82	63.84 ± 3.86	53.81 ± 4.10	58.97 ± 4.19
<i>F. fujikuroi</i> m567	4.79 ± 0.37	17.14 ± 0.93	5.15 ± 0.53	26.99 ± 2.13	4.56 ± 0.33	14.59 ± 0.09
<i>F. fujikuroi</i> #T1	4.88 ± 0.19	47.20 ± 2.30	5.47 ± 0.55	58.09 ± 4.27	5.02 ± 0.27	64.75 ± 3.27
<i>F. fujikuroi</i> #T2	65.98 ± 3.80	56.91 ± 4.72	118.01 ± 7.80	99.13 ± 2.86	154.86 ± 8.76	129.82 ± 6.77

Примечания: грибы культивировали в среде с 4 мМ триптофана (+ Trp) или 0,5 мМ ИАМ (+ IAM). Содержание индольных веществ измеряли колориметрически с реактивом Сальковского при длине волны 540 нм. *F. fujikuroi* T1 и T2 представляют два типа трансгенных штаммов: один из них вырабатывает большое количество индолов в среде с экзогенным ИАМ (штаммом T1), а второй – на обеих средах с экзогенными ИАМ или триптофаном (штамм T2). Значения представлены средними из трех повторностей ± стандартное отклонение.

Трансгенные штаммы культивировали в среде с экзогенными триптофаном или ИАМ, а содержание индольных веществ определяли колориметрически, а также с помощью ТСХ и ВЭЖХ анализа. В средах с ИАМ все полученные трансгенные штаммы увеличили количество индолов, по сравнению с диким типом *F. fujikuroi*. Напротив, когда триптофан использовали в качестве предшественника, только три штамма, содержащие оба гена (представленные штаммом T2), образовывали повышенные уровни биосинтеза индольных соединений. Трансформанты, содержащие только ген *IAH1* (представленные штаммом T1), вырабатывали их на уровне дикого типа (табл. 26).

В соответствии с полученными результатами ТСХ анализа, показано что штамм T2 превосходил всех по количествам образуемого ИУК не только в среде с экзогенным ИАМ, но и триптофаном (рис. 75). Нозерн-блот-анализ, а также ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) подтвердили, что уровни экспрессии обоих генов в трёх видах *Fusarium* отсутствовали или были крайне низкими (рис. 76).

Наиболее отчетливо полосы гибридизации, соответствующие обоим генам, были обнаружены у дикого типа *F. proliferatum* ET1, хотя уровень экспрессии амидазы был выше, чем другого фермента – триптофанмонооксигеназы. Трансгенный штамм (overexpressing T2) показал значительную экспрессию *IaaM* наряду с достаточной экспрессией гена амидазы, который экспрессировался на том же уровне и у другого трансгенного штамма T1. Сравнение уровней экспрессии обоих генов у *F. proliferatum* ET1 штамм дикого типа показал, что транскрипт *IAH1* присутствует в большем

количестве, чем в *IAM1*, что указывает на то, что межгенная промоторная область имеет более сильную транскрипционную активность в направлении гена *IAN1*, что и было подтверждено в экспериментах по созданию трансгенных штаммов, в которых была клонирована промоторная область в каждом из двух направлений, соединённая в плазмиде с маркерными YFP и dsRED генами, интенсивность флуоресценции которых детектировали и измеряли при прорастании спор трансгенных штаммов исследованных микромицетов (Tsavkelova et al., 2012). Результаты показали, что активность промотора в направление гена *IAN1* в три раза сильнее, чем в направлении гена *IAM1*.

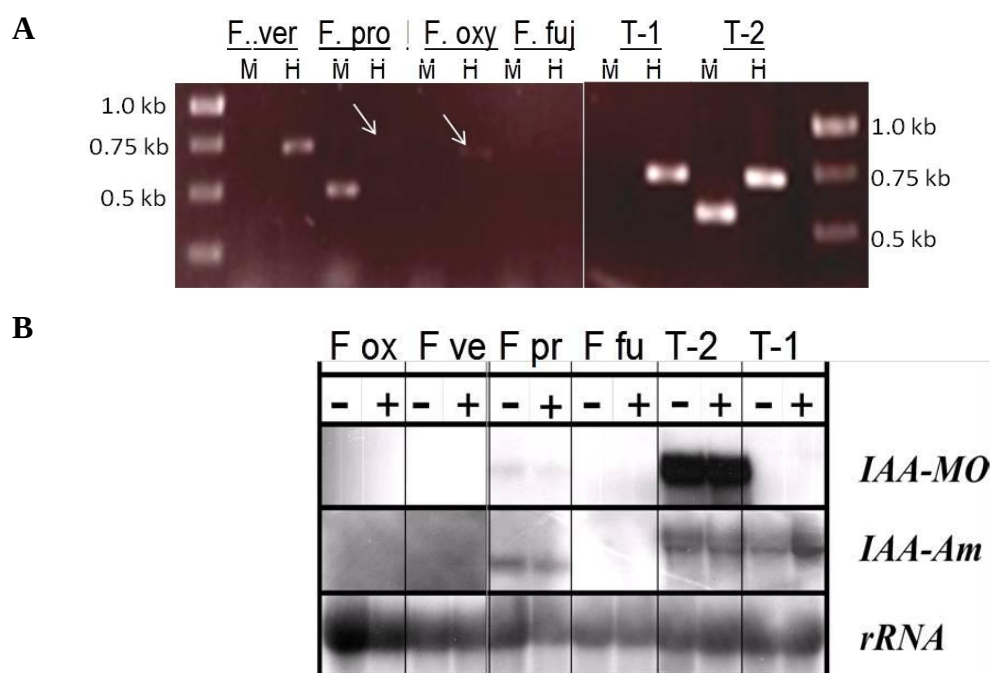


Рисунок 76. Анализ генной экспрессии у дикого типа и трансгенных штаммов *Fusarium*: (A) qRT-PCR. Грибы культивировали в среде Чапека-Докса с 4 мМ триптофана, мицелий собирали фильтрованием через 48 часов, проводили выделение РНК, затем QT-ПЦР. Образцы анализировали после 35 циклов амплификации. Стрелками указано расположение слабых полос. М - *IaaM*, Н - *IaaH*. (B) Нозерн-блот анализ. РНК образцы разделяли на геле, проводили блоттинг на мембране и гибридизацию с ДНК-зондом, помеченным ^{32}P на фрагменты *IaaH*, *IaaM* и рибосомную РНК. F.v - *F. verticillioides* 149, F.p - *F. proliferatum* ET1, F.o - *F. oxysporum* 4287, Ff - *F. fujikuroi* m567, T1 - трансгенный штамм *F. fujikuroi* m567, экспрессирующий ген *IAN1*, T2 - трансгенный штамм *F. fujikuroi* m567, экспрессирующий оба гена *F. proliferatum* *IAM1* и *IAN1* (по Tsavkelova et al., 2012).

Наиболее отчетливо полосы гибридизации, соответствующие обоим генам, были обнаружены у дикого типа *F. proliferatum* ET1, хотя уровень экспрессии амидазы был выше, чем другого фермента – триптофанмонооксигеназы. Трансгенный штамм (overexpressing T2) показал значительную экспрессию *IaaM* наряду с достаточной экспрессией гена амидазы, который экспрессировался на том же уровне и у другого

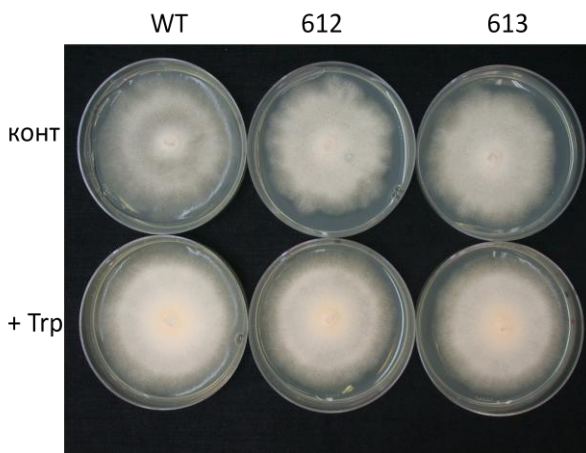
трансгенного штамма T1. Сравнение уровней экспрессии обоих генов у *F. proliferatum* ET1 штамм дикого типа показал, что транскрипт *IAN1* присутствует в большем количестве, чем в *IAM1*, что указывает на то, что межгенная промоторная область имеет более сильную транскрипционную активность в направлении гена *IAN1*, что и было подтверждено в экспериментах по созданию трансгенных штаммов, в которых была клонирована промоторная область в каждом из двух направлений, соединённая в плазмиде с маркерными YFP и dsRED генами, интенсивность флуоресценции которых детектировали и измеряли при прорастании спор трансгенных штаммов исследованных микромицетов (Tsavkelova et al., 2012). Результаты показали, что активность промотора в направление гена *IAN1* в три раза сильнее, чем в направлении гена *IAM1*.

Таким образом, из четырех видов *Fusarium*, в которых были обнаружены гены ИАМ пути, только *F. proliferatum* ET1 имел функционально-активный путь, тогда как *F. verticillioides* обнаруживал активность одного гена – ИАМ-гидролазы, а у *F. fujikuroi* и *F. oxysporum* этот путь неактивен. Анализ транскрипции генов выявил значительные различия в их экспрессии, где у *F. proliferatum* ген *IAN1* экспрессируется намного сильнее, чем *IAM1*, а межгенный участок имеет асимметричную промоторную активность. Между тем, именно такой транскрипционный уровень в состоянии поддерживать биосинтез ИУК у *F. proliferatum* ET1 с эффективной конверсией экзогенного триптофана в ИУК. Примечательно, что именно у изученных фитопатогенных видов (*F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*), которые были выделены как возбудители болезней ряда сельскохозяйственных растений, ИАМ путь биосинтеза оказался неактивным, в отличие от ассоциативного эндофита орхидей, *F. proliferatum* ET1. Интересным фактом является то, что ослабленный уровень транскрипции гена *IAM1*, являющийся лимитирующим шагом в биосинтезе ИУК, позволяет этому микромицету образовывать оптимальное количество ИУК для проявления биологической активности ауксина в отношении стимуляции ризогенеза, но при этом не осуществлять "перепроизводство" ИУК, что может привести к гипертрофии развития тканей растения в процессе ризогенеза и спровоцировать развитие заболеваний. Среди фитопатогенных грибов, синтез ИУК *in planta* по ИАМ пути отмечен у фитопатогенного гриба *Colletotrichum gloeosporioides* (Maor et al., 2004), который синтезирует значительные количества ИАМ в тканях растения.

Также необходимо учитывать возможность функционирования других путей биосинтеза ИУК у *F. proliferatum* ET1, однако, их доля невелика, что показано на примере делеционных по ИАМ генам мутантам *F. proliferatum* ET1, у которых общий синтез ИУК

был резко снижен. На самого продуцента удаление локуса генов, ответственных за синтез ИУК, видимо, не оказывает влияния, так как фенотипы дикого типа и делеционных мутантов значительно не различались при культивировании на средах Чапека-Докса и EMS, средах с добавлением экзогенных триптофана, ИАМ или ИУК (рис. 77).

А



В

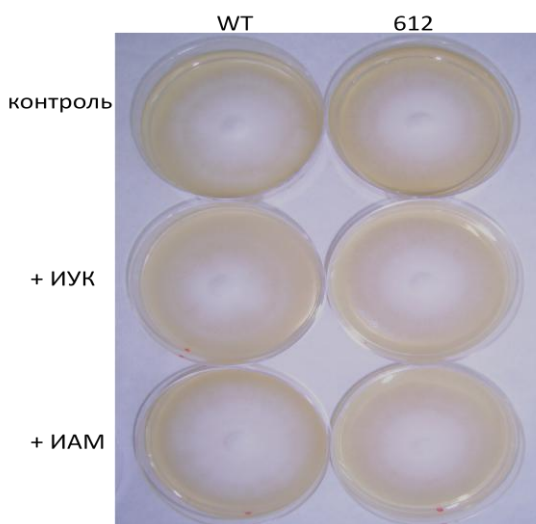


Рисунок 77. Фенотип колоний дикого типа *F. proliferatum* ET1 и делеционных мутантов $\Delta iaam/\Delta iaah$ (№ 612 и 613), выращенных на агаризованных средах Чапека-Докса (А) и EMS (В) с добавлением 4мМ триптофана (А), а также 0,5 мМ ИУК и ИАМ (В).

Таким образом, образование ИУК (как и других гормонов растений) может иметь значимую роль на этапах колонизации растения, однако, стратегия взаимодействия между представителями рода *Fusarium* может зависеть и от растения-хозяина, и от уровней и особенностей биосинтеза фитогормонов у индивидуального гриба, отличаясь не только между микроорганизмами, принадлежащими к одному роду, но и между штаммами одного вида. Так, при анализе способности к образованию ИУК по ИАМ-пути у другого фитопатогенного штамма *F. proliferatum* NRRL 62905, который также ингибировал рост

орхидей в проведённом нами биотесте (см. раздел 3.2.2.3), оказалось, что он не образует интермедиатов ИАМ-пути (рис. 78). Анализ экспрессии гена *IaaM* также подтвердил отсутствие его транскрипции у фитопатогенного штамма (Niehaus et al., 2016).

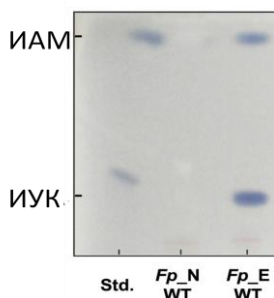


Рисунок 78. ТСХ анализ КЖ диких типов (WT) *Fusarium proliferatum* 62905 (*Fp_N*) и *Fusarium proliferatum* ET1 (*Fp_E*). Экстракцию индольных веществ проводили из 5 мл КЖ грибов, выращенных на среде Чапека-Докса с добавлением 5 мМ триптофана. Std - стандарты ИУК и ИАМ (с изменениями по: Niehaus et al., 2016).

Анализ с помощью ВЭЖХ наличия метаболитов, характерных для других путей биосинтеза ИУК у исследованных представителей *Fusarium*, показал, что индолил-3-пировиноградная кислота (ИПВК) и индолил-3-уксусный альдегид (ИААлд, IAAld) также обнаруживаются в КЖ *F. fujikuroi*, *F. verticillioides* и *F. oxysorum* (табл. 27).

Таблица 27. ВЭЖХ анализ содержания индолил-3-пировиноградной кислоты (ИПВК) и индолил-3-уксусного альдегида (ИУАлд) в КЖ грибов.

Микромицет	ИПВК (пмоль/л)	ИуАлд (пмоль/л)
<i>Fusarium proliferatum</i> 62905	6350 ± 3348	331131 ± 117879
<i>Fusarium proliferatum</i> ET1	1824 ± 273,9	52640 ± 1370
<i>Fusarium fujikuroi</i> IMI58289	7338 ± 741,8	577269 ± 58099
<i>Fusarium verticillioides</i> M-3125	6127 ± 1820	94287 ± 27766
<i>Fusarium oxysporum</i> 4287	6324 ± 1104	49094 ± 1439

Примечания: микромицеты культивировали в среде Чапека-Докса без добавления триптофана в течение 7 сут. Результаты представлены в виде трёх повторностей (с изменениями по: Niehaus et al., 2016).

Примечательно, что ассоциативный эндофит орхидеи, *F. proliferatum* ET1, имел самые низкие значения содержания метаболитов других путей (ИПВК и ИУАлд) среди изученных микромицетов, в то время как содержание ИУАлд было наиболее высоким у фитопатогенных штаммов *F. proliferatum* 62905 и *F. verticillioides*. Таким образом, для штамма ET1 было подтверждено, что именно ИАМ путь биосинтеза ИУК является основным функциональным путем образования ИУК, в то время как фитопатогенные

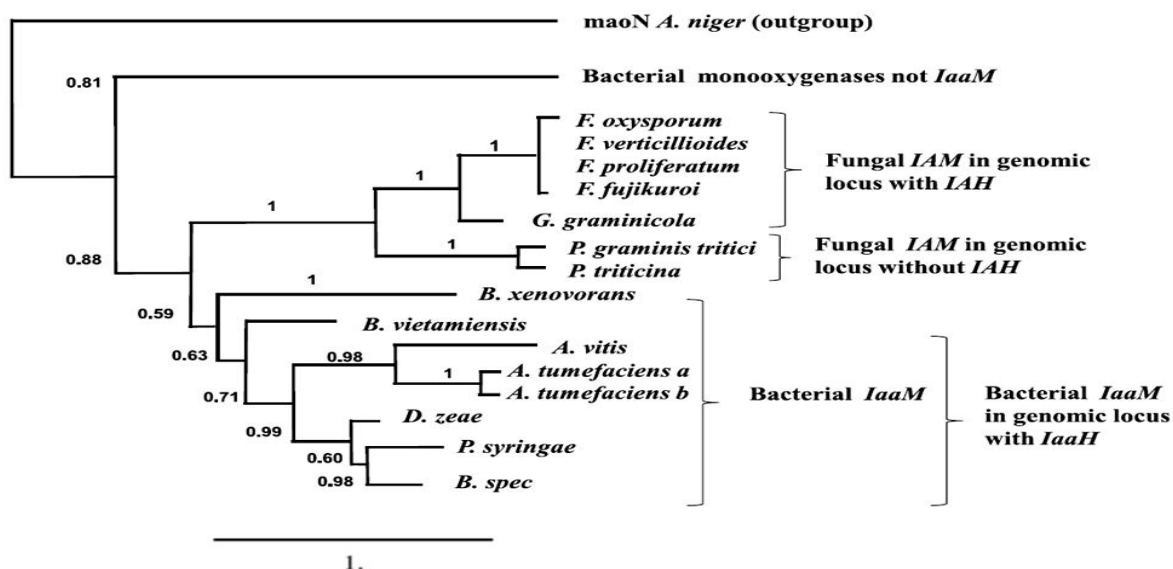


Рисунок 80. Филогенетический анализ триптофан-2-монооксигеназы, обнаруженной среди грибов и бактерий. Множественное выравнивание последовательностей проведено с помощью программы MUSCLE, филогенетическое дерево построено при помощи программ PhyML и TreeDyn (использовали алгоритм присоединения соседей (neighbor joining, bootstrap 500). Подробная информация по анализируемым объектам представлена в таблице 28 (Tsavkelova et al., 2012).

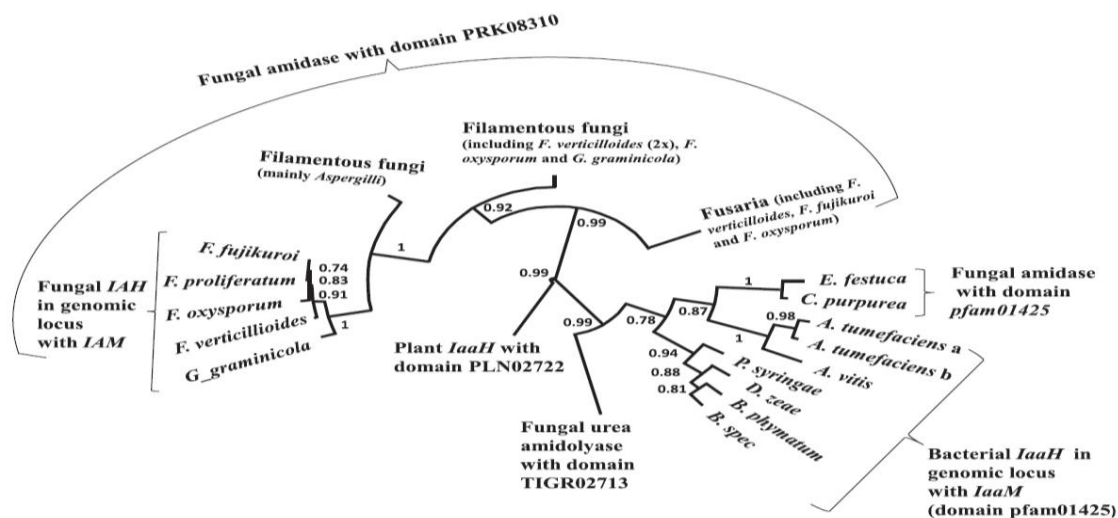


Рисунок 81. Филогенетический анализ встречаемости гена ИАМ-гидролазы и амидаз среди грибов и бактерий. Значения достоверности ветвления указаны рядом с точками ветвления. Множественное выравнивание последовательностей проведено с помощью программы MUSCLE, филогенетическое дерево построено при помощи программ PhyML и TreeDyn. Подробная информация по анализируемым объектам представлена в таблице 28 (Tsavkelova et al., 2012).

Таблица 28. Последовательности, использованные для построения филогенетических деревьев, представленных на рисунках 80 и 81 (с изменениями по Tsavkelova et al., 2012, данные получены и биоинформатический анализ проведён Dr. B. Oeser).

Рисунки 80	Accession №	Рисунки 81	Accession №
Название на дереве		Название на дереве	
maoN <i>Aspergillus niger</i>	CAK_46102	<i>F. fujikuroi</i>	JN166969
		<i>F. proliferatum</i>	JN166966
bacterial monooxygenases not IaaM:	Бактериальные монооксигеназы, отличающиеся от IaaM	<i>F. oxysporum</i>	FOXG_02586 (modified)
<i>Pseudomonas syringae</i> B728a	YP_237732	<i>F. verticillioide</i>	FVEG_05764
<i>P. syringae</i> DC3000	NP_790366	<i>Glomerella graminicola</i>	GLRG_00818
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	YP_703492	<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_749177
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> a	ZP_07293407	<i>A. oryzae</i>	BAE62321
<i>S. hygroscopicus</i> b	ZP_07297682	<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	C_20038
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	YP_002764026	<i>A. brassicola</i>	AB10113
<i>S. lividans</i>	ZP_05527375	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	XP_001937169
<i>Streptomyces</i> sp. SPB74	ZP_06826903	<i>A. terreus</i>	ATEG_08392
<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	YP_002487266	<i>A. flavus</i>	XP_001823454
<i>G. obscures</i>	YP_003408817	<i>A. clavatus</i>	ACLA_093730
<i>A. spec</i>	YP_830604	<i>Fusarium verticillioide _a</i>	FVEG_12471
<i>C. acidiphila</i>	YP_03118821	<i>F. verticillioide _b</i>	FVEG_04369
<i>Kineococcus radiotolerance</i>	YP_001361184	<i>F. oxysporum a</i>	FOXG_13070
<i>Nocardiosis dassonvillei</i>	YP_003681524	<i>F. oxysporum b</i>	FOXG_07444
<i>alpha proteobacterium</i> BAL199	ZP_02189967	<i>F. graminearum a</i>	FGSG_02228
<i>Roseobacter denitrificans</i>	YP_681814	<i>G. graminicola</i>	GLRG_02159
<i>Acidiphilium cryptum</i>	YP_001235780	<i>Nectria haematococca a</i>	XP_003051051
<i>Burkholderia cenocepacia</i> PC184	ZP_04942663	<i>N. haematococca b</i>	XP_003039762
<i>B. cenocepacia</i> MC0-3	YP_001777940	<i>N. haematococca c</i>	XP_003043859
<i>P. fluorescens</i> SBW25	YP_002875149	<i>Magnaporthe grisea</i>	MGG_10599

Таблица 28 (продолжение). Последовательности, использованные для построения филогенетических деревьев, представленных на рисунках 80 и 81 (с изменениями по Tsavkelova et al., 2012, данные получены и биоинформатический анализ проведён Dr. B. Oeser).

<i>P. entomophila</i>	YP_606177	<i>Verticillium albo-atrum</i>	XP_003006517
<i>P. putida</i>	YP_001666658	<i>Aspergillus fumigates a</i>	EDP48521
<i>P. syringae pv oryzae</i>	ZP_04590895	<i>A. fumigatus b</i>	XP_74883
<i>P. syringae pv tomato</i>	ZP_03395865	<i>F. graminearum b</i>	FGSG_09046
<i>P. syringae pv aesculi</i>	ZP_06457719	<i>F. fujikuroi</i>	B.Tudzynski unpublished data
<i>P. syringae pv tabaci</i>	ZP_05637118	<i>F. verticillioides c</i>	FVEG_06580
<i>P. syringae pv phaseolicola</i>	YP_276803	<i>N. haematococca d</i>	XP_003051051
<i>P. syringae pv syringae</i>	ZP_06496995	<i>F. oxysporum c</i>	FOXG_08966
<i>P. aeruginosa</i>	YP_001348551	<i>Claviceps purpurea</i>	P. Tudzynski unpublished data
		<i>Agrobacterium tumefaciens a</i>	NP_396527
<i>Fusarium oxysporum</i>	FOXG_02584*	<i>A. tumefaciens b</i>	NP_059675
<i>F. verticillioides</i>	FVEG_05765*	<i>A. vitis</i>	YP_002540147
<i>F. proliferatum</i>	JN166967 ^{ns}	<i>P. syringae</i>	YP_234624
<i>F. fujikuroi</i>	JN166970 ^{ns}	<i>D. zeae</i>	YP_003006020
<i>Glomerella graminicola</i>	GLRG_00819*	<i>B. phymatum</i>	YP_001863702
<i>P. graminis tritici</i>	EFP85902	<i>F. graminearum</i>	FGSG_10913
<i>P. tritici</i>	PTTG_06071*	<i>F. oxysporum</i>	FOXG_12848
<i>Burkholderia xenovorans</i>	YP_556455	<i>F. verticillioides</i>	FVEG_11593
<i>B. vietnamiensis</i>	YP_001116856	<i>F. fujikuroi</i>	B.Tudzynski unpublished data
<i>Agrobacterium vitis</i>	YP_002540148	<i>G. graminicola</i>	GLRG_06946
<i>A. tumefaciens a</i>	NP_396528	<i>N. haematococca</i>	XP_003047952.1
<i>A. tumefaciens b</i>	NP_059676	<i>M. grisea</i>	XP_361941
<i>Dickeya zeae</i>	YP_003006021	<i>V. albo-atrum</i>	XP_003004160
<i>P. syringae</i>	YP_234623		
<i>Burkholderia phymatum</i>	YP_001863703	Растительные <i>IaaH</i>	
		<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_563831
		<i>Vitis vinifera</i>	CAN77023
		<i>G. max</i>	Glyma20g37660
		<i>Nicotiana tabacum</i>	BAG84637
		<i>Solanum lycopersicum</i>	SL1.00sc01435_58.1.1
		<i>Oryza sativa</i>	EAY92845
		<i>Zea mays</i>	GRMZM2G169087
		<i>Physcomitrella patens</i>	Pp1s167_52V6

Гомологи обоих генов были обнаружены в нескольких видах, отличных от представителей микромицетов из родов *Fusarium* или *Glomerella graminicola*, однако, в этих видах *IAM* ген не кластеризован с геном *IaH* в единый локус (рис. 80). ИАМ-гидролазы, кодируемые геном *IaH*, принадлежат к обширному семейству ферментов амидаз, которые широко распространены среди грибов. В отличие от триптофан-2-

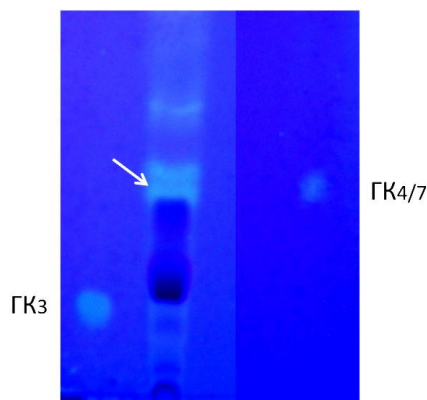
монооксигеназы, которая отличается от других монооксигеназ, ИАМ-гидролазы высоко гомологичны нескольким амидазам, не относящимся к ИУК (рис. 81). Тем не менее, *IAN* ген формирует отдельную кладу с теми видами, у которых также кластеризован ген *IAM*.

3.3.2.2. Биосинтез гиббереллинов *Fusarium proliferatum* ET1

С целью изучить способность *Fusarium proliferatum* ET1 образовывать другие фитогормоны, – гиббереллины, биосинтез которых также характерен для некоторых представителей рода *Fusarium*, был проведён сравнительный анализ механизмов их образования у этого гриба и наиболее известного продуцента – *F. fujikuroi*. Проведённые нами ранее биотесты и ТСХ анализ (раздел 3.3.2.) не выявили присутствия гибберелловой кислоты ГК₃ (gibberellic acids, GA; Цавкелова, 2003). Известно, что высокие концентрации ГК₃, образуемые *F. fujikuroi*, вызывают чрезмерное удлинение побегов риса, ведущее к развитию заболевания "дурных побегов" (bakanae disease), при этом биосинтез ГК у этого микромицета отличается от растений на химическом (по путям биосинтеза), биохимическом (по используемым ферментам) и генетическом (участвующих в биосинтезе генах и их организации в геноме) уровнях. При этом все известные продуценты ГК относятся к комплексу видов *G. fujikuroi*.

Для определения уровня биосинтеза ГК микромицеты культивировали на двух типах сред: синтетической ICI и органической ОРМ (см. "Материалы и методы"), оптимизированных для биосинтеза гиббереллинов грибами (Tudzynski et al., 2001, 2002, 2003), а экстракты КЖ изучали с помощью ТСХ. По результатам проведённого анализа было обнаружено, что исследуемый нами штамм действительно не образует ГК₃, но была получена полоса, соответствующая аутентичным метчикам ГК₄ и ГК₇ (рис. 82А). Такие результаты были удивительны, так как ранее было известно, что фитопатогенные штаммы этого вида не способны к биосинтезу каких-либо ГК, что было продемонстрировано на примере *F. proliferatum* (штаммы D-02945 и D-00502; Malonek et al., 2005a). Тем не менее, при проведении ГХ-МС анализа, было подтверждено, что в КЖ штамма *F. proliferatum* ET1 содержатся различные гиббереллины и относящиеся к их биосинтезу метаболиты, такие как энт-каурен, ГК₉, ГК₂₄, ГК₁₄, ГК₁₃, ГК₃₆, ГК₁₆, 7β,18-дигидроксикауренолид (рис. 82В). Основными ГК были ГК₄ и ГК₇, – предшественники в биосинтезе ГК₃, однако сама ГК₃ обнаруживалась в крайне незначительных количествах.

A



B

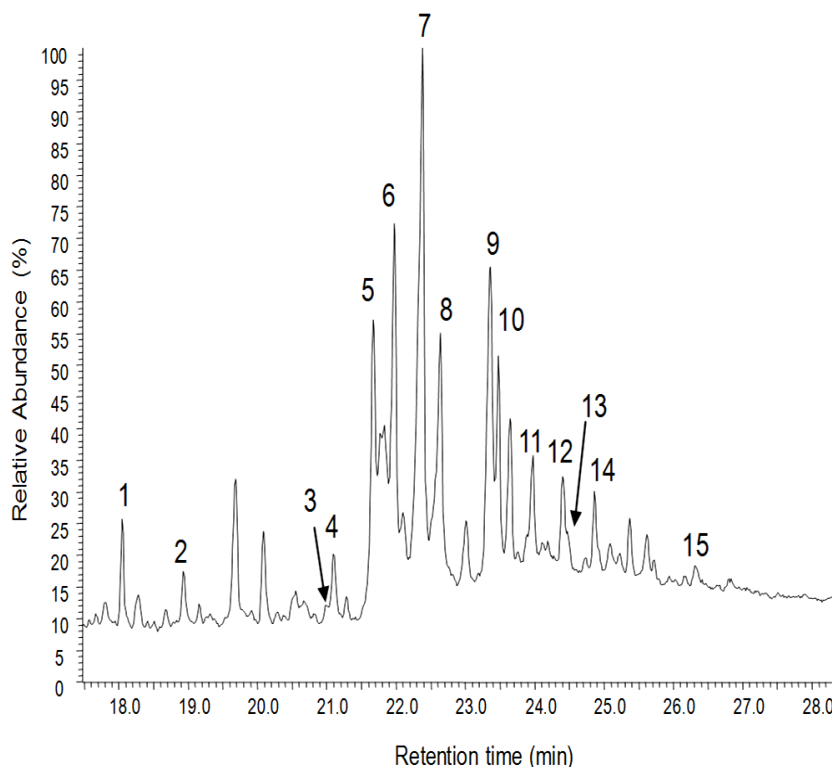


Рисунок 82: А – ТСХ анализ экстрактов КЖ *F. proliferatum* ET1. Регистрация хроматограммы в УФ свете. Смеси метчиков (гибберелловых кислот) ГК₃ и ГК_{4/7}. Стрелкой обозначена полоса, соответствующая уровню ГК_{4/7}. В – ГХ-МС анализ фильтратов *F. proliferatum* ET1. Были проанализированы этилацетатные экстракты после их дериватизации (methyl esters trimethylsilyl ethers). Идентификацию пиков проводили в соответствии со стандартами (Gaskin and MacMillan, 1992): (1) *ent*-Kaurene; (2) GA₉; (3) GA₂₅; (4) GA₂₄; (5) GA₁₄; (6) GA₄; (7) GA₇; (8) Fujenoic acid; (9) GA₁₃; (10) GA₃₆; (11) GA₁₆; (12) 7β,18-diOHkaurenolide; (13) GA₁; (14) GA₃; (15) GA₃₇. (по Tsavkelova et al., 2008).

Поскольку выбранный нами штамм отличала его способность к биосинтезу гибберелловых кислот, для более детального изучения был проведён молекулярно-генетический анализ активности генов, ответственных за биосинтез этих соединений. Более ранние данные (Tudzynski and Höltér, 1998; Malonek et al., 2005a, b) относительно

структуры кластера ГК генов *F. proliferatum* указывали на то, что оба исследованных фитопатогенных штамма этого вида содержали весь кластер генов биосинтеза ГК с тем же порядком и ориентацией семи генов, как и у основного продуцента, *F. fujikuroi*, однако, ни один из них не образовывал ни ГК₃ или ГК₁, ни предшествующих им ГК₄ или ГК₇. Используя праймеры, полученные на основе последовательности генов у *F. fujikuroi*, охватывающих межгенные участки, был проведён ряд ПЦР. Размер полученных фрагментов и последующее секвенирование показали, что штамм *F. proliferatum* ET1 имеет все семь генов кластера ГК, расположенных в том же порядке и ориентации как у *F. fujikuroi*, а также ГК необразующих штаммов *F. proliferatum* D-00502 и D-02945 (Malonek et al., 2005b) (рис. 83).

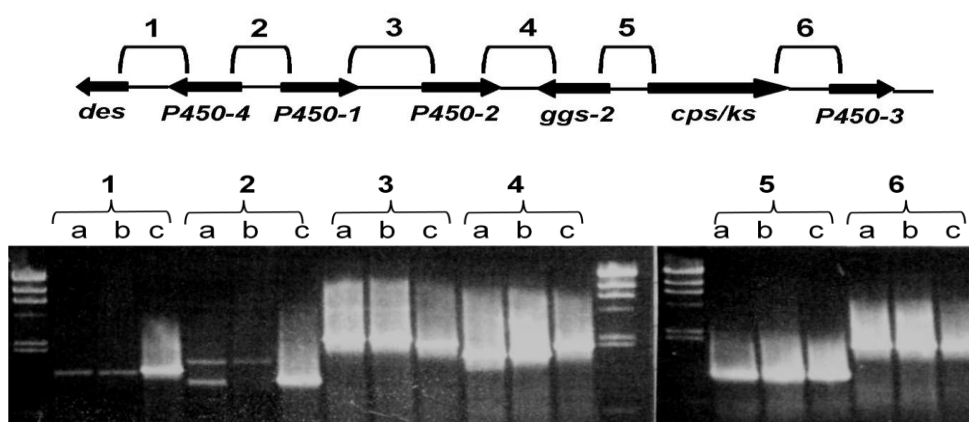


Рисунок 83. Организация кластера генов, ответственных за биосинтез ГК у *F. proliferatum* ET1. Обозначены все 7 генов и направление их транскрипции (указано стрелками). Линии 1-6 соответствуют ПЦР-продуктам, амплифицированным с использованием следующих пар праймеров: orf3-Fus2/P450-4-Fus3 (1F/1R); P450-4-Fus1/P450-1-Fus3 (2F/2R); P450-1-Fus3/ P450-2-Fus4 (3F/3R); P450-2-Fus5/ ggs2-Fus6 (4F/4R); ggs2-Fus9/ cps-Fus5 (5F/5R); cps-Fus7/ P450-3-Fus8 (6F/6R). а – *F. proliferatum* D02945 (MP-D); б – *F. proliferatum* ET1; в – *F. fujikuroi*

Для одного из ранее изученных фитопатогенных штаммов *F. proliferatum* D-02945 было показано, что причины потери возможности образования ГК на молекулярном уровне связаны с наличием нескольких мутаций, идентифицированных в кодирующих областях генов *ggs2* и *cps/ks*, ответственных за образование специфических для этого пути ферментов: геранилгеранилдифосфат-синтазы и бифункциональной энт-копалил дифосфат/энт-каурен синтазы, соответственно. Поскольку эти два фермента катализируют первые стадии в биосинтезе ГК, обнаружение промежуточных продуктов и каких-либо ГК было невозможно в культуральных жидкостях исследованных ранее фитопатогенных штаммов (Malonek et al., 2005a, b).

Чтобы выяснить причину этих различий, мы клонировали и секвенировали гены *ggs2* и *cps/ks* из *F. proliferatum* ET1 и сравнили их нуклеотидные последовательности с таковыми из необразующих ГК штаммом *F. proliferatum* D-02945 и продуцентом *F. fujikuroi* m567. Ген *ggs2* (GenBank No. AM939934) был на 90% и 91% идентичен на уровне нуклеотидной последовательности аналогичным генам *ggs2* штаммов *F. fujikuroi* (Y15280.1) и *F. proliferatum* D-02945 (AJ810803.1), соответственно. Множественное выравнивание последовательностей промоторных областей *ggs2* из штаммов *F. proliferatum* ET1 и *F. fujikuroi* также показало высокий уровень сходства: 5' нетранслируемые области (5' UTR) всех штаммов содержат восемь GATA элементов, которые являются предполагаемыми сайтами связывания для общего фактора транскрипции AreA (Kudla et al., 1990; Mihlan et al., 2003), что указывает на сходную систему азотной регуляции экспрессии этих генов и биосинтеза ГК. Положения интронов (данные не показаны) и пяти характерных доменов, представляющих каталитический центр фермента GGS оказались высококонсервативными у *F. fujikuroi* и трех штаммов *F. proliferatum* (рис. 84A), хотя *F. proliferatum* ET1 имеет единственную аминокислотную замену в первом домене.

A											
		domain I									
Fp-ET1	MAEQQISNLL	SMFDAFHNTQ	KLEISVQVTD	SFQYRDTPPD	SSSSEGGSL	RYEERRVSLP					60
Fp-D-02945	MAEQQISNLL	SMFDAFHNTQ	KLEITVQVMD	TFHYRDTPT	LFLFGRC SL	RYDERRVSLP					60
Fp-KGL0401	MAEQQISNLL	SMFDASHASQ	KLEITVQVMD	TYHYRETTPD	SSSSEGGSL	RYDERRVSLP					60
Ff-m567	MAEQQISNLL	SMFDASHASQ	KLEITVQVMD	TYHYRETTPD	SSSSEGGSL	RYDERRVSLP					60
Fp-ET1	LARNSPSPDI	VFQLCFSTAT	ISELNHRWKS	QRLKVADSPY	NYILTLP	PSKG	IRGAFIDSLN				120
Fp-D-02945	LSHNAASPDI	VSQLCFLTAM	SSELNHRWKS	QRLKVADSPY	NYILTLP	PSKG	IRGAFIDSLN				120
Fp-KGL0401	LSHNAASPDI	VSQLCFSTAM	SSELNHRWKS	QRLKVADSPY	NYILTLP	PSKG	IRGAFIDSLN				120
Ff-m567	LSHNAASPDI	VSQLCFSTAM	SSELNHRWKS	QRLKVADSPY	NYILTLP	PSKG	IRGAFIDSLN				120
		domain II									
Fp-ET1	VWLDVPEDKA	QVIKVIDML	HNSSLIIIDF	QDGSPLRRGK	PSTHTVFGPA	QAINATYII					180
Fp-D-02945	VWLEVPEDKT	SVIKEVIGML	HNSSLIIIDF	QDNSPLRRGK	PSTHTVFGPA	QAINATYVI					180
Fp-KGL0401	VWLEVPEDET	SVIKEVIGML	HNSSLIIIDF	QDNSPLRRGK	PSTHTVFGPA	QAINATYVI					179
Ff-m567	VWLEVPEDET	SVIKEVIGML	HNSSLIIIDF	QDNSPLRRGK	PSTHTVFGPA	QAINATYVI					180
		domain III					domain IV				
Fp ET1	VKAIERIQEI	VSHDALADIT	GTITTIFQGG	AMDLWWTANT	ILQSIQYLL	MVNDKTGALF					240
Fp D-02945	VKAIEKIQDI	VSHDALADVT	GMITSIFQGG	AMDLWWTANG	IVPSIQYLL	MVNDKTGALF					240
Fp KGL0401	VKAIEKIQDI	VGHDALADVT	GTITTIFQGG	AMDLWWTANA	IVPSIQYLL	MVNDKTGALF					239
Ff m567	VKAIEKIQDI	VGHDALADVT	GTITTIFQGG	AMDLWWTANA	IVPSIQYLL	MVNDKTGALF					240
		domain V									
Fp-ET1	RLSLELLALN	SEAPISDSTL	ESLSSVSL	GQYFQIRDDY	MNLIDNKYTD	QKGFCEDLDE					300
Fp-D-02945	RLSLELLALN	SEASISDSTL	ESLSSVSL	GQYFQIRDDY	MNLIDNKYTD	QKGFCEDLDE					300
Fp-KGL0401	RLSLELLALN	SEASISDSAL	ESLSSVSL	GQYFQIRDDY	MNLIDNKYTD	QKGFCEDLDE					299
Ff-m567	RLSLELLALN	SEASISDSAL	ESLSSVSL	GQYFQIRDDY	MNLIDNKYTD	QKGFCEDLDE					300
Fp-ET1	GKYSLTLIHA	LQTDSSDLLI	NVLSMRRVQG	KLTTQOKMLV	LEVMTKNGSL	DWTSKLLGML					360
Fp-D-02945	GKYSLTLIHA	LQTDSSDLLT	NILSMRRVQG	KLTAQOKMLI	LEVMTKNGSL	DWTSKLLGML					360
Fp-KGL0401	GKYSLTLIHA	LQTDSSDLLT	NILSMRRVQG	KLTAQOKMLV	LEVMTKNGSL	DWTSKLLGML					359
Ff-m567	GKYSLTLIHA	LQTDSSDLLT	NILSMRRVQG	KLTAQKRCWF	WK*						342
Fp-ET1	HTRVVAEIDS	LEISMKRDNP	ALRALVERLK	PET*							393
Fp-D-02945	HTRVVAEIES	LEVSTKRDNH	GLRALVERLK	LET*							393
Fp-KGL0401	HTRVVAEIES	LEVSTKRDNH	ALRALVERLK	LET*							393

Рисунок 84. Множественное выравнивание аминокислотных (белковых) последовательностей для генов GGS2 (A) и CPS/KS (B) штаммов видов *F. fujikuroi* m567 и *F. proliferatum*. A: представлены аминокислотные последовательности *F. fujikuroi* m567 (Y15280) и трёх штаммов вида *F. proliferatum*: D-02945 (Malonek et al., 2005a,b), KGL0401 (ABC46412) и ET1. Консервативные домены (Chen et al., 1994) обозначены жирным шрифтом. (B) Выравнивание CPS/KS аминокислотных последовательностей *F. fujikuroi* m567 (Y15280), *F. proliferatum* D-02945 (Malonek et al., 2005a,b) и *F. proliferatum* ET1. Консервативные мотивы обозначены жирным шрифтом; аминокислотные замены у *F. fujikuroi* и *F. proliferatum* D-02945 обозначены красным шрифтом (Tsavkelova et al., 2008).

Интересно отметить, что предполагаемый белок GGS2 *F. proliferatum* ET1 выявляет больше сходства с *F. fujikuroi* GGS2, чем с одновидовым *F. proliferatum* D-02945. Длина участка девяти аминокислотных остатков в N-конце GGS2 идентична у *F. proliferatum* ET1 и *F. fujikuroi*, но различается между *F. proliferatum* ET1 и *F. proliferatum* D-02945. С другой стороны, *F. proliferatum* ET1 имеет терминацию трансляции, отличающуюся от GGS2 у *F. fujikuroi* из-за инсерции дополнительного цитозина в 3' кодирующей области гена. Подобная мутация, ведущая к сдвигу рамки считывания и увеличению белка на 50 аминокислот, однако, также была раньше обнаружена и у необразующего гиббереллины *F. proliferatum*, что и предполагалось причиной неспособности этого штамма к биосинтезу ГК (Malonek et al., 2005b).

B	Fp-ET1	MPGKIENGTF	KYLKTGGDLV	SAAKSLLDRA	FKSHHSYYGL	CSTSCQVYDT	ANVAMIRKTT	60
	Fp-D-02945	MPGKIENGTF	KDLKTGNDFV	SAAKSLLDRA	FKSHHSYYGL	CSTSCQVYDT	ANVAMIPKTT	60
	Ff-m567	MPGKIENGTF	KDLKTGNDFV	SAAKSLLDRA	FKSHHSYYGL	CSTSCQVYDT	ANVAMIPKTR	60
	Fp-ET1	ENVKHWLFPE	CFHYLLKTQA	ADGSGWALPT	TQTAGILDTA	SAVLALLSHV	RKPLQLDVS	120
	Fp-D-02945	DNVKQWLFPE	CFHYLLKTQA	ADGSGWYLP	TQTAGILDTA	SALLALLCHV	QEPLQLDVS	120
	Ff-m567	DNVKQWLFPE	CFHYLLKTQA	ADGSGWSLPT	TQTAGILDTA	SAVLALLCHA	QEPLQLDVS	120
	Fp-ET1	PDEIGPRIEH	GVASLKRQLA	VWKDVEETNH	IGVELIVPAL	LSTLEKELGE	SSFEFPCKGI	180
	Fp-D-02945	PDEMGFRIEH	GVASLKRQLA	VWVDVDDTNH	IGVELIIPAL	LSMLEKELDV	PSFEFFCRDV	180
	Ff-m567	PDEMGFRIEH	GVTSLKRQLA	VWVDVEDTNH	IGVEFTIPAL	LSMLEKELDV	PSFEFFCRSI	180
	Fp-ET1	LEKMYEEKLG	NFDLKKVYVG	PSSLLHSLEA	FLGQIDFDRL	SHHLYRGSM	ASPSSTAAYL	240
	Fp-D-02945	LERMHEEKLG	RFDLEKVVYVG	PSSLLHSLEA	FLGKLDFFDL	SRHLYRGSM	ASPSSTAAYL	240
	Ff-m567	LERMHEEKLG	HFDLEQVYVG	PSSLLHSLEA	FLGKLDFFDL	SHHLYRGSM	ASPSSTAAYL	240
	Fp-ET1	IGATKWDEEA	EDYLRHVNRN	GAGHGDDGGIS	GTFPTTHFEC	SWILATLLQG	GFTMKQIDSN	300
	Fp-D-02945	IGATKWDEEA	EDYLRHVNRN	GAGHGDDGGIS	GTFPTTHFEC	SWILATLLQG	GFTLKQIDGD	300
	Ff-m567	IGATKWDEEA	EDYLRHVNRN	GAGHGDDGGIS	GTFPTTHFEC	SWIIATLLKV	GFTLKQIDGD	300
	Fp-ET1	GLRGLATILA	DALRDENGVI	GFAPRTADV	DTAKALLALS	LINQPVSPDI	MIKVFEKGKH	360
	Fp-D-02945	GLRGLSTILV	DALRDENGVI	GFAPRTADV	DTAKALLALS	LINQPVSPDI	MIKVFEKGKH	360
	Ff-m567	GLRGLSTILV	DALRDENGVI	GFAPRTADV	DTAKALLALS	LINQPVSPDI	MIKVFEKGKH	360
	Fp-ET1	FTTFGSEDERP	SLTSLNLHVL	CLLKQPNVSO	YHPQILKTTL	FTCRWWNGSD	HCVKDKWNLS	420
	Fp-D-02945	FTTFGSEDERP	SLTSLNLHVL	CLLKQPNVSO	YHPQILKTTL	FTCRWWNGSD	HCVKDKWNLS	420
	Ff-m567	FTTFGSEDERP	SLTSLNLHVL	CLLKQPNVSO	YHPQILKTTL	FTCRWWNGSD	HCVKDKWNLS	420
	Fp-ET1	HLYPMTLLVE	AFTEVLHLID	AGELSSSLFDK	SLKCKIGLSI	FQAVLRIILT	QNDGSGWRAY	480
	Fp-D-02945	HLYPMTLLVE	AFTEVLHLID	AGELSSSLFDK	SLKCKIGLSI	FQAVLRIILT	QNDGSGWRAY	480
	Ff-m567	HLYPMTLLVE	AFTEVLHLID	AGELSSSLFDK	SLKCKIGLSI	FQAVLRIILT	QNDGSGWRAY	480
	Fp-ET1	REQTCYAILA	LVQARHVCFF	THMVDRLQSC	IDRGVSWLKS	CRFHSQDLTW	TSKTAYEVGF	540
	Fp-D-02945	REQTCYAILA	LVQARHVCFF	THMVDRLQSC	IDRGVSWLKS	CRFHSQDLTW	TSKTAYEVGF	540
	Ff-m567	REQTCYAILA	LVQARHVCFF	THMVDRLQSC	IDRGVSWLKS	CRFHSQDLTW	TSKTAYEVGF	540
	Fp-ET1	VAEAYKLAAL	QSASLEVPA	TIGHSVTS	PSSDLEKYM	LVRKTALFSP	LEWGLRASV	600
	Fp-D-02945	VAEAYKLAAL	QSASLEVPA	TIGHSVTS	PSSDLEKYM	LVRKTALFSP	LEWGLRASV	600
	Ff-m567	VAEAYKLAAL	QSASLEVPA	TIGHSVTS	PSSDLEKYM	LVRKTALFSP	LEWGLMASI	600
	Fp-ET1	IESFFVPL	QAQRVEIYPR	DNIKIDEDKY	LSIIPFTWVG	CNNRSRTFAS	NRWLYDMMYL	660
	Fp-D-02945	IESFFVPL	QAQRVEIYPR	DNIKIDEDKY	LSIIPFTWVG	CNNRSRTFAS	NRWLYDMMYL	660
	Ff-m567	IESFFVPL	QAQRVEIYPR	DNIKIDEDKY	LSIIPFTWVG	CNNRSRTFAS	NRWLYDMMYL	660
	Fp-ET1	SLLGYQTD	MEAVAGPVFS	DVSLRLAID	KVIDNTRVNL	AGTNGTVHNG	NGHQHESFNI	720
	Fp-D-02945	SLLGYQTD	MEAVAGPVFS	DVSLRLAID	KVIDNTRVNL	AGTNGTVHNG	NGHQHESFNI	720
	Ff-m567	SLLGYQTD	MEAVAGPVFS	DVSLRLAID	KVIDNTRVNL	AGTNGTVHNG	NGHQHESFNI	720
	Fp-ET1	QVQEDTLTRF	ANSVLNHHKDV	LNSSSSDQDT	LRREFRAFMH	AHTTQIEDNS	RFSKQASGDV	780
	Fp-D-02945	QVQEDTLTRF	ANSVLNHHKDV	LNSSSSDQDT	LRREFRAFMH	AHTTQIEDNS	RFSKQASGDV	780
	Ff-m567	QVQEDTLTRF	ANSVLNHHKDV	LNSSSSDQDT	LRREFRAFMH	AHTTQIEDNS	RFSKQASGDV	780
	Fp-ET1	FSSPEQSYFQ	WVNSTGGSHV	ACAYSFASF	CLMSANLPQG	KEAFFSATQK	YLISVVMRHA	840
	Fp-D-02945	FSSPEQSYFQ	WVNSTGGSHV	ACAYSFASF	CLMSANLPQG	KEAFFSATQK	YLISVVMRHA	840
	Ff-m567	FSSPEQSYFQ	WVNSTGGSHV	ACAYSFASF	CLMSANLPQG	KEAFFSATQK	YLISVVMRHA	840
	Fp-ET1	TNMCRCMYNDF	GSIAARDNVR	NVNSMHFPEF	ALCKGISQTI	DDRKKRLSQI	AMEYQGCGLDR	900
	Fp-D-02945	TNMCRCMYNDF	GSIAARDNVR	NVNSMHFPEF	ALCKGISQTI	DDRKKRLSQI	AMEYQGCGLDR	900
	Ff-m567	TNMCRCMYNDF	GSIAARDNVR	NVNSMHFPEF	ALCKGISQTI	DDRKKRLSQI	AMEYQGCGLDR	900
	Fp-ET1	ALEALERQSR	DDAGDSFTAG	SKDVRKIKIV	KLFCVETDLY	DQLYVIKDL	SSMK*	954
	Fp-D-02945	ALEALERQSR	DDAGDSFTAG	SKDVRKIKIV	KLFCVETDLY	DQLYVIKDL	SSMK*	954
	Ff-m567	ALEALERQSR	DDAGDSFTAG	SKDVRKIKIV	KLFCVETDLY	DQLYVIKDL	SSMK*	954

Рисунок 84 (продолжение). Множественное выравнивание аминокислотных (белковых) последовательностей для генов GGS2 (A) и CPS/KS (B) штаммов видов *F. fujikuroi* m567 и *F. proliferatum*. Представлены аминокислотные последовательности *F. fujikuroi* m567 (Y15280) и трёх штаммов вида *F. proliferatum*: D-02945 (Malonek et al., 2005a,b), KGL0401 (ABC46412) и ET1. Консервативные домены (Chen et al., 1994) обозначены жирным шрифтом. (B) Элаймент CPS/KS аминокислотных последовательностей *F. fujikuroi* m567 (Y15280), *F. proliferatum* D-02945 (Malonek et al., 2005a,b) и *F. proliferatum* ET1. Консервативные мотивы обозначены жирным шрифтом; аминокислотные замены у *F. fujikuroi* и *F. proliferatum* D-02945 - красным шрифтом (Tsavkelova et al., 2008).

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей фрагмента *F. proliferatum* ET1 *cps/ks* (№ AM939935) выявил 93% идентичности с *cps/ks* *F. proliferatum* D-02945 (AJ810802.1) и 89% с одноименным геном *F. fujikuroi* *cps/ks* (Y15013.1). Сходство на уровне аминокислот составило 92% и 91% с соответствующими генами *F. proliferatum* D-02945 и *F. fujikuroi* (рис. 84B). Сравнение аминокислотных последовательностей CPS/KS *F. proliferatum* D-02945, *F. proliferatum* ET-1 и *F. fujikuroi* показывает, что многие различия между последовательностями штамма D-02945 и *F. fujikuroi* CPS/KS отсутствуют у *F. proliferatum* ET1. Типичные домены бифункциональной энт-копалил дифосфат/энт-каурен-синтазы сохраняются между аминокислотными последовательностями CPS/KS у всех трех штаммов.

Для оценки уровня экспрессии этих ключевых генов (*ggs2* и *cps/ks*) у *F. proliferatum* ET1, был проведен анализ с помощью Нозерн-блоттинга. Ранее подобное исследование не выявило экспрессии ни одного из 7 генов кластера у фитопатогенных штаммов *F. proliferatum* (Malonek et al., 2005a,b,c). Для проведения анализа микромицеты выращивали в течение 3 дней в синтетической среде ICI. Фильтрат мицелия промывали и помещали на 2 ч либо в безазотную среду ICI (0%) или среды ICI с избыточным содержанием азота (5,0 г/л NH_4NO_3 , 100% ICI) для установления влияния азотной регуляции на биосинтез ГК. Для этого фильтр гибридизовали с генами *ggs2*, *cps/ks* и цитохром оксидазы *P450-4*, экспрессия которых у основного продуцента (*F. fujikuroi*) находится под контролем AreA-опосредованной метаболитной (азотной) регуляции (Tudzynski et al., 1999; Mihlan et al., 2003). Было продемонстрировано, что все три гена экспрессируются у *F. fujikuroi* и *F. proliferatum* ET1 в условиях азотного голодания, но не в условиях, когда азот присутствует в среде, тем более в высоких концентрациях (рис. 85). Ни один из генов не выявлял экспрессии в фитопатогенных штаммах D-02945 и D-00502.

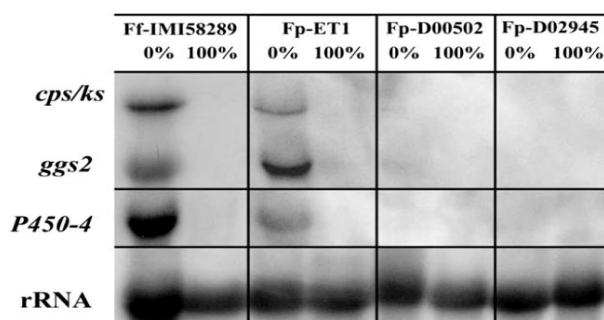


Рисунок 85. Нозерн-блот анализ *F. fujikuroi* IMI58289 (Ff), *F. proliferatum* ET1 (Fp-ET1) и двух фитопатогенных, не образующих ГК штаммов (D00502 и D02945), выращенных в течение 3 сут на среде ICI 10%, а затем инкубированных 2 ч на средах 0% ICI и 100% ICI. Анализ проводили по генам *cps/ks*, *ggs2* и *P450-4* (на основании последовательностей *F. fujikuroi* IMI58289; Tsavkelova et al., 2008).

Таким образом, нозерн-блотт анализ подтвердил не только экспрессию ключевых генов у штамма ET1, но и регуляцию активности этих генов, сходную с *F. fujikuroi*, обусловленную транскрипционным фактором AreA. При дальнейшем геномном анализе обнаружилось, что в отличие от других штаммов *F. proliferatum* ET1 имеет два гомолога кластера генов ГК, а не один, как у всех остальных микромицетов, в том числе и у *F. proliferatum* 62905 (Niehaus et al., 2016).

Известно, что большинство видов, принадлежащих в комплексу видов *G. fujikuroi*, не способны образовывать ГК, несмотря на наличие в их геномах генов, ответственных за биосинтез гиббереллинов. Лишь только *F. fujikuroi* (MP-C) и *F. konzum* (MP-I; Malonek et al., 2005a) были описаны, как продуценты ГК, в то время как у остальных представителей этого комплекса экспрессии всего кластера генов не наблюдается, и они не образуют ГК. В то же время другими исследователями (Rim et al., 2005) был также выделен штамм *F. proliferatum* KGL0401, который образовывал ряд ГК, в том числе ГК₃, ГК₁, ГК₄, ГК₇, ГК₉, ГК₂₀, ГК₂₄. Эти результаты подтверждают, что состав и количество образуемых фитогормонов, в том числе и гибберелловых кислот, могут разительно отличаться между штаммами одного вида микромицетов, что может в значительной степени обуславливать различную стратегию поведения представителей *Fusarium* при их взаимодействии с растениями.

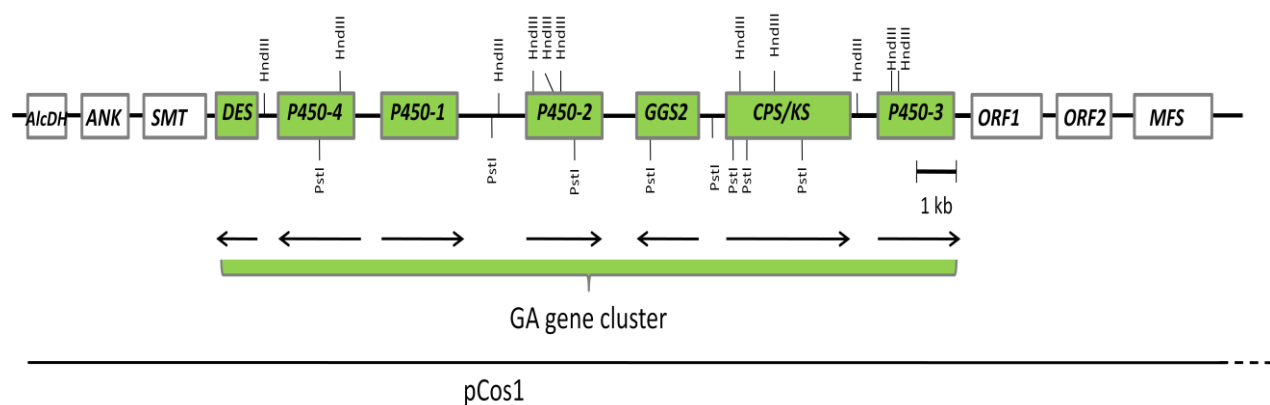
3.3.2.3. Биосинтез гиббереллинов трансформантами *Fusarium oxysporum*

Идентификация и функциональная характеристика генов биосинтеза ГК у основного продуцента – *F. fujikuroi* выявили фундаментальные различия в механизмах биосинтеза у растений и грибов, что указывает на независимую эволюцию этого процесса у растений и микроорганизмов (Hedden et al., 2002; Tudzynski, 2005; Bömke and Tudzynski, 2009). Для биосинтеза ГК₃ микромицеты должны иметь кластер, состоящий из семи генов, кодирующих специфические для биосинтеза ГК геранилгеранилдифосфат-синтазу (GGS2), бифункциональный энт-копалилдифосфат/энт-каурен-синтазу (CPS/KS), четыре монооксигеназы цитохрома P450 (от P450-1 до P450-4), и десатуразу ГК₄ (DES) (Rojas et al., 2001; Tudzynski et al., 2003; Bömke and Tudzynski, 2009). Кластер генов или его части обнаружены у некоторых видов, входящих в комплекс видов *G. fujikuroi* (GFC), а также у некоторых близкородственных видов, например, *F. foetens*, *F. napiforme*, *F. miscanthi* и *F. nisikadoi* (Malonek et al., 2005a). Образование ГК было обнаружено также у некоторых штаммов *F. sacchari* (MP-B), *F. konzum* (MP-I) и *F. proliferatum* (Malonek et al., 2005a;

Tsavkelova et al., 2008; Rim et al., 2013). Различия в качественном составе и количественном содержании ГК в пределах одного вида подтверждает широкую вариативность среди представителей рода *Fusarium*, которую можно объяснить как накоплением мутаций, так и эволюционными процессами в стратегиях микробно-растительных взаимодействий.

Fusarium oxysporum не относится к комплексу видов *Gibberella fujikuroi* (GFC) и не образуют ГК. *Fusarium oxysporum* штамм №I был выделен нами как один из ассоциативных микромицетов оранжевой орхидеи *A. praemorsa* и не проявил способности к биосинтезу ГК (Tsavkelova et al., 2008). У изолята *F. oxysporum* 4287, чей геном был полностью секвенирован, также не было обнаружено генов, необходимых для биосинтеза ГК (Wiemann et al., 2013). Из 11 других изолятов, у которых был проведён скрининг наличия генов, ответственных за биосинтез ГК (<http://www.broadinstitute.org/scientificcommunity/science/projects/fungal-genome-initiative>), у пяти штаммов был обнаружен полный кластер генов ГК в их геномах, однако, эти штаммы также не образовывали гиббереллины (Wiemann et al., 2013). Основная причина заключается во множественных мутациях и/или потере одного или нескольких генов в составе кластера, а также в дефектах в регуляции генной экспрессии (Bömke and Tudzynski, 2009). С целью изучить, являются ли факторы транскрипции, участвующие в регуляции экспрессии генов биосинтеза ГК функционально-активными у *F. oxysporum*, который не входит в GFC, была проведена трансформация дикого типа *F. oxysporum* №I, выделенного с орхидеи, с помощью космиды pCos1, содержащей весь кластер генов *F. fujikuroi*.

Результат диагностической ПЦР после проведения трансформации показал интеграцию всего кластера генов в нескольких трансформантах pCos1 (T1-T3, T6-T8, T11, T13 и T14; рис. 86), тогда как трансформанты T4 и T15 не содержали гена P450-3, а T5 и T12 не содержали ни одного из семи необходимых генов кластера. Частичная инсерция кластера обнаруживалась в трансформантах T9 и T10. Большинство трансформантов, содержащих космиду, были проанализированы на их способность к биосинтезу ГК, а именно, ГК₄, ГК₇ и ГК₃ с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и ВЭЖХ (рис. 87, табл. 29). Как и ожидалось, T9 не образовывал ГК, в то время как следовые количества ГК_{4,7} были обнаружены в трансформанте T13 (Tsavkelova, 2016).



	<i>DES</i>	<i>P450-4</i>	<i>P450-3</i>
<i>Fo</i>	-	-	-
T1	+	+	+
T2	+	+	+
T3	+	+	+
T4	±	+	-
T5	-	-	-
T6	+	+	+
T7	+	+	+
T8	+	+	+
T9	+	+	-
T10	+	-	±
T11	+	±	+
T12	-	-	-
T13	+	+	+
T14	+	+	+
T15	+	+	-

Рисунок 86. Организация кластера генов, ответственных за биосинтез ГК у *F. fujikuroi* (Bömke et al., 2008; Bömke and Tudzynski, 2009) с обозначенными сайтами рестрикции для рестриктаз HindIII и PstI и расположением космиды pCos1 (с разрешения проф. В. Tudzynski, University of Münster, Germany), несущей полностью кластер ГК генов *F. fujikuroi* (P. Linnemannstöns and B. Tudzynski, неопубликованные данные). Стрелками указана ориентация направления транскрипции генов.

ГК гены отмечены зелёным цветом, а гены, не принадлежащие к ГК кластеру - белым. Наличие (+) и отсутствие (-) фланкирующих генов кластера (*DES* и *P450-3*), а также *P450-4* были проанализированы с помощью диагностической ПЦР после трансформации *F. oxysporum* №I дикого типа (WT) космидой pCos1 с помощью праймеров: P450-4GDxGD2 (для идентификации *P450-4*), P450-3-3GDxP3GD3 (для *P450-3*) и orf3 (для *DES*). T1-T15 – трансформанты, пронумерованные от №1 до № 15. Полосы, плохо визуализировавшиеся по результатам ПЦР, обозначены как ± (Источник: Tsavkelova, 2016).

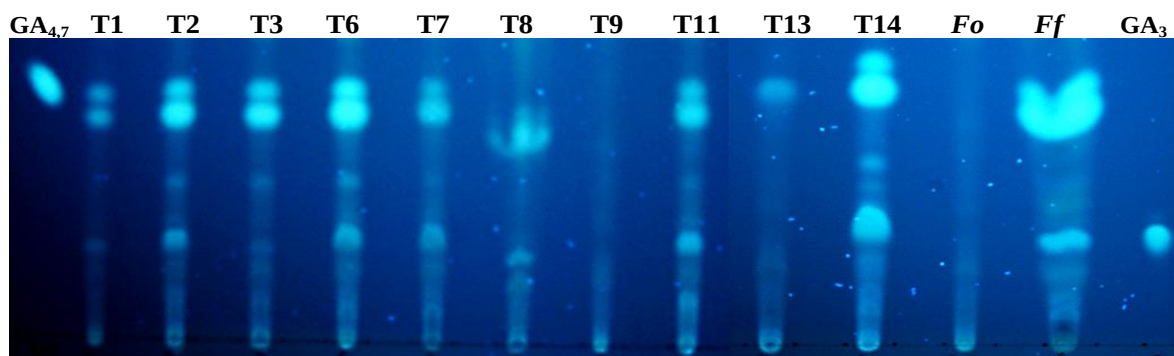


Рисунок 87. ТСХ анализ ГК, выделенных экстракцией из КЖ дикого типа *F. fujikuroi* IMI 58289 (*Ff*), дикого типа *F. oxysporum* №I (*Fo*) и трансформантов (Т), комплементированных с помощью космиды pCos1. ГК₃ и ГК_{4,7} использованы в качестве стандартов. Штаммы культивировали в течение 7 суток в среде ОРМ.

Наибольшее количество ГК_{4,7}, но низкое количество ГК₃, были обнаружены у трансформантов Т1 и Т3. Трансформант Т14 оказался наиболее активным в биосинтезе ГК₃, хотя трансформанты Т2, Т6-Т8 и Т11 оказались также способны образовывать все исследованные ГК. Чтобы количественно оценить содержание ГК₃, несколько трансформантов вместе с дикими типами *F. fujikuroi* и *F. oxysporum* были проанализированы с помощью ВЭЖХ. В то время как *F. oxysporum* не образовывал каких-либо ГК, содержание ГК₃, образованной трансформантом Т14, было даже выше, чем у исходного продуцента – дикого типа *F. fujikuroi* (табл. 29).

Таблица 29. ВЭЖХ анализ КЖ диких типов *F. fujikuroi* IMI58289 и *F. oxysporum* #I, а также трансформантов (Т) *F. oxysporum* (Tsavkelova, 2016).

Штамм исследованных микромицетов	ГК ₃ мг/л
<i>F. fujikuroi</i> IMI58289	337±27 ^a
<i>F. oxysporum</i> №I	0
<i>F. oxysporum</i> T1	277±23
<i>F. oxysporum</i> T2	310±20
<i>F. oxysporum</i> T3	448±42
<i>F. oxysporum</i> T6	233±25
<i>F. oxysporum</i> T7	283±15
<i>F. oxysporum</i> T14	517±30

^a - Результаты представлены средним арифметическим из трёх повторностей ± стандартное отклонение.

Чтобы подтвердить наличие интегрированного кластера генов в геноме трансформантов pCos1 был проведен Саузерн-блот анализ (рис. 88). Все пять трансформантов (Т2, Т6, Т7, Т11 и Т14) показали наличие генов *GGs2*, *DES* и *P450-3*, хотя трансформант Т11 имел достаточно низкий сигнал для гена *DES*; для штамма дикого типа

F. oxysporum гибридизационных полос обнаружено не было. Результаты Саузерн-блоттинга показали, что анализируемые гены были представлены в более чем одной копии.

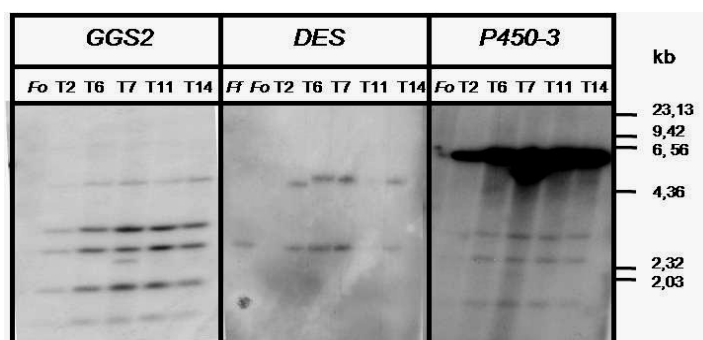


Рисунок 88. Саузерн-блоттинг дикого типа *F. oxysporum* #1 (Fo) и нескольких трансформантов (T), несущих космиду pCos1. Геномную ДНК разрезали с помощью рестриктаз PstI (для зондов *GGS2* и *P450-3*) и HindIII (для *DES*-зонда) и гибридизовали с 1: 2 смесью зондов, полученных на основе *F. fujikuroi* IMI 58289 (*Ff*, по Tsavkelova, 2016).

Чтобы исследовать экспрессию генов, необходимых для биосинтеза ГК, в частности, *CPS/KS*, *DES*, и гена *P450-3* был проведен нозерн-блот анализ, результаты которого приведены на рис. 89. Известно, что экспрессия этих генов подавляется высоким содержанием азота в среде, – шесть из семи кластерных генов, за исключением *P450-3* регулируются фактором транскрипции AreA GATA участка (Mihlan et al., 2003; Bömke and Tudzynski 2009; Tudzynski, 2014). В условиях 100% ICI с 0,5% NH_4NO_3 не было обнаружено экспрессии *CPS/KS* и *DES*-генов (данные не представлены), поэтому штаммы культивировали в синтетической среде ICI, лимитированной по азоту. Дикий тип *F. oxysporum* (не обнаружено экспрессии ГК генов) и *F. fujikuroi* (источник кластера функциональных ГК генов) были использованы как отрицательный и положительный контроли, соответственно. Трансформант T9 показал очень слабую экспрессию *DES*, и отсутствие экспрессии *GGS2* и генов *CPS/KS*. Самый высокий уровень экспрессии трех исследованных генов был обнаружен в трансформантах T7, T11 и T14, что также соответствует высокому содержанию образованных ими количеств ГК. Другие трансформанты, демонстрирующие менее интенсивную генную экспрессию, также не были активны в биосинтезе ГК. Самая слабая экспрессия среди исследованных генов обнаружена для гена *P450-3*. Хотя проведение диагностической ПЦР показало наличие этого гена, – его не удалось обнаружить в трансформанте T1. В отличие от дикого типа *F. fujikuroi*, у дикого типа *F. oxysporum*, не было обнаружено экспрессии для *DES* и *P450* фланкирующих генов кластера, однако, слабая и едва заметная полоса соответствовала гену *CPS/KS*, что предполагает наличие остатков этого гена в геноме *F. oxysporum*.

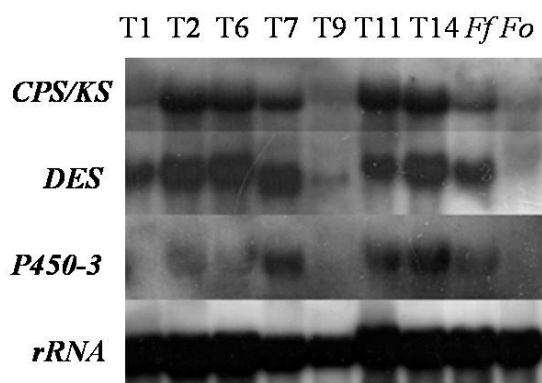


Рисунок 89. Результаты нозерн-блот анализа экспрессии генов *DES*, *CPS/KS* и *P450-3*. Выделенная из микромицетов РНК была гибридизована с зондами генов из *F. fujikuroi* IMI 58289. Штаммы выращивали в течение трех дней в 20% среде ICI и переносили в условия, лимитированные по азоту. В качестве контроля использовали рРНК *Ff* - *Fusarium fujikuroi* (MP-C) штамм IMI 58289 дикого типа; *Fo* - *Fusarium oxysporum* #1, дикий тип. T1-T14 - трансформанты *F. oxysporum*, несущие полностью или частично космиду (pCos1; Tsavkelova, 2016).

В отличие от дикого типа *F. oxysporum*, который неспособен к биосинтезу ГК, трансформанты (T7, T11, T14) показали высокий уровень экспрессии генов кластера, подтверждая их полное включение и активность. Восстановление биосинтеза ГК подтверждает, что все регулирующие механизмы являются функциональными у *F. oxysporum*, и регуляторные механизмы транскрипции этих генов действуют одинаково, как и у продуцента *F. fujikuroi*.

Род *Fusarium* включает большое разнообразие видов, демонстрирующих различные возможные стратегии взаимодействия с растениями (Forsyth et al., 2006). *Fusarium solani*, *F. oxysporum* и *F. semitectum*, например, известны как агрессивные к орхидеям патогены, вызывающие увядания и полную гибель растений (Pinaria et al., 2010), тогда как *Fusarium* sp., изолированный из корней эпифитного *Dendrobium desiflorum*, проявлял себя как микобионт (Wu et al., 2002). Штамм *Fusarium* sp., стимулирующий рост семян другой орхидеи, *Cypripedium reginae*, также был выделен и описан ранее (Vujanovic et al., 2000). В наших же исследованиях был выделен и изучен штамм *F. proliferatum* ET1, кардинально отличающийся от других фитопатогенных штаммов этого вида по способности к биосинтезу фитогормонов, в том числе, ауксинов и ГК. Комплементация необразующего ГК₃ дикого типа *F. proliferatum* ET1 генами *GGS2* и *CPS/KS* восстановила полностью биосинтез этой гибберелловой кислоты, также демонстрируя единую систему регуляторных механизмов экспрессии этих генов у исследованных микромицетов. Ранее на примере другого вида *F. verticillioides*, фитопатогенного для растений кукурузы, было также показано, что этот вид, потерявший способность к биосинтезу ГК из-за

значительной делеции генов кластера (отсутствие пяти биосинтетических генов) восстановил способность к образованию ГК после введения космиды pCos1 (Bömke et al., 2008a,b).

Ни один из ранее исследованных штаммов *F. oxysporum* не содержит генов из кластера ГК (Malonek et al., 2005b). Однако полногеномное секвенирование ряда представителей *Fusarium* выявило присутствие гомологов кластера ГК *F. fujikuroi* у *F. circinatum*, *F. mangiferae* и пяти из 11 различных изолятов *F. oxysporum* (Wiemann et al., 2013). В этих пяти штаммах *F. oxysporum* все гены имеют тот же порядок и ориентацию транскрипции, что и в кластере ГК *F. fujikuroi*, однако, кодирующие области генов *P450-2* и *P450-3*, например, в штаммах *F. oxysporum* PHW815 и FO SC 3-а, соответственно, прерваны из-за наличия преждевременных стоп-кодона (Wiemann et al., 2013). Другие штаммы *F. oxysporum* имели только частичный кластер ГК генов, состоящий лишь из одного или трех неповрежденных кластерных генов, но во всех этих случаях не хватало генов *P450-2*, *GGs2*, *P450-3*, или *CPK/KS*. У исследуемого нами штамма *F. oxysporum* #1 также не было выявлено присутствия и активности генов *DES*, *P450-3*, *P450-4* и *GGs2*, подтверждая, что этот штамм не обладает целым кластером ГК генов; слабая экспрессия гена *CPK/KS*, подтвержденная нозерн блотт анализом, отличает этот штамм от исследованных ранее.

Согласно филогенетическому анализу, предполагается, что существовал древний кластер ГК предкового генома *Fusarium* до расхождения видов *F. oxysporum* и представителей комплекса *G. fujikuroi*, и этот кластер генов во всех видах *Fusarium*, скорее всего, наследовался вертикально (Wiemann et al., 2013). Еще одно возможное объяснение приобретения вторичных кластеров между некоторыми мицелиальными грибами является возможность горизонтального переноса генов (Khaldi et al., 2008; Slot and Rokas, 2011). Тем не менее, наши результаты наглядно демонстрируют, что трансформанты ассоциированного с орхидеей *F. oxysporum* №1 способны к экспрессии всего кластера генов из *F. fujikuroi* и к биосинтезу высоких количеств ГК, что указывает на то, что регуляторные механизмы, такие как наличие ключевого GATA фактора транскрипции - AreA, все еще функционируют в *F. oxysporum*, также как и у некоторых других представителей рода *Fusarium*: *F. proliferatum* и *F. verticillioides* (Malonek et al., 2005a; Bömke et al., 2008; Tsavkelova et al., 2008). Хотя несколько мутаций, делеции и даже перегруппировки генов в геномах их обладателей имели место, общий регуляторный механизм транскрипции с помощью AreA был функционален у всех этих микромицетов.

Известно, что источник азота существенно влияет на образование разнообразных вторичных метаболитов у грибов (Tudzynski, 2014). Биосинтез ГК у представителей *Fusarium* подвергается метаболитной (азотной) репрессии, где в дополнение к двум основным факторам транскрипции, связывающимися с областями GATA, а именно AreA и AreB, существуют и действуют некоторые другие регуляторы, такие как, например, аммоний-пермеаза, MeaB, протеинкиназа серин-треониновой специфичности (TOR - target of rapamycin kinase, мишень рапамицина), глутаминсинтетаза (Teichert et al., 2008; Michielse et al., 2014; Tudzynski, 2014). Поскольку нет отдельных генов, кодирующих факторы транскрипции, расположенных внутри кластера ГК генов, экспрессия всех генов кластера обеспечивается скоординировано с помощью универсальных факторов транскрипции (Tudzynski, 2014). На примере фитопатогенных штаммов *F. oxysporum* было показано, что AreA способствует экспрессии так называемых velvet-regulated кластеров генов, регулирующих биосинтез микотоксина боверицина и сидерофора феррикроцина (López-Berges et al., 2014). Источник азота и сигнальный TOR каскад также контролируют связанные с вирулентностью свойства штаммов, например, таких как вегетативное слияние гиф мицелия или адгезия на корнях растений во время развития фитопатогенеза, вызванного фитопатогенными штаммами *F. oxysporum* (López-Berges et al., 2010). Доступность в среде азота значительно влияет на экспрессию генов вторичного метаболизма и, следовательно, на количество образуемых метаболитов, включая гиббереллины. Нами было также показано, что все исследованные гены кластера ГК лучше всего экспрессировались именно в условиях дефицита азота, подтверждая функциональность всех необходимых элементов азотной регуляторной сети, а способность к биосинтезу фитогормонов у разных представителей рода *Fusarium* может быть соотнесена со специализацией изолятов и выбором их стратегии взаимодействия с растением-хозяином, определяя их патогенный или, наоборот, фитосимбионтный образ жизни.

3.3.3. Биосинтез ауксинов ассоциативными бактериями орхидей

Культуры ассоциативных бактерий, выделенных с оранжерейных и дикорастущих орхидей, были проанализированы на способность образовывать ИУК, поскольку именно профиль ауксинов служит одним из критериев взаимодействия между растением-хозяином и микроорганизмами-партнёрами. Нами было показано (Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2004; Tsavkelova et al., 2007a; Pavlova et al., 2017), что уровень биосинтеза индольных соединений может значительно различаться в зависимости от состава

питательной среды, концентраций экзогенного индуктора биосинтеза ИУК - триптофана, а также внутри видов, принадлежащих к одному роду. Все продуценты образуют ИУК как и другие вторичные метаболиты, в начальной или поздней стационарной фазе роста, что также отмечено другими авторами (Tien et al., 1979; Cacciari et al., 1989; Leveau and Lindow, 2005; Ahemad and Khan, 2010). Динамика образования ИУК для некоторых наиболее активных продуцентов представлена на рисунке 90.

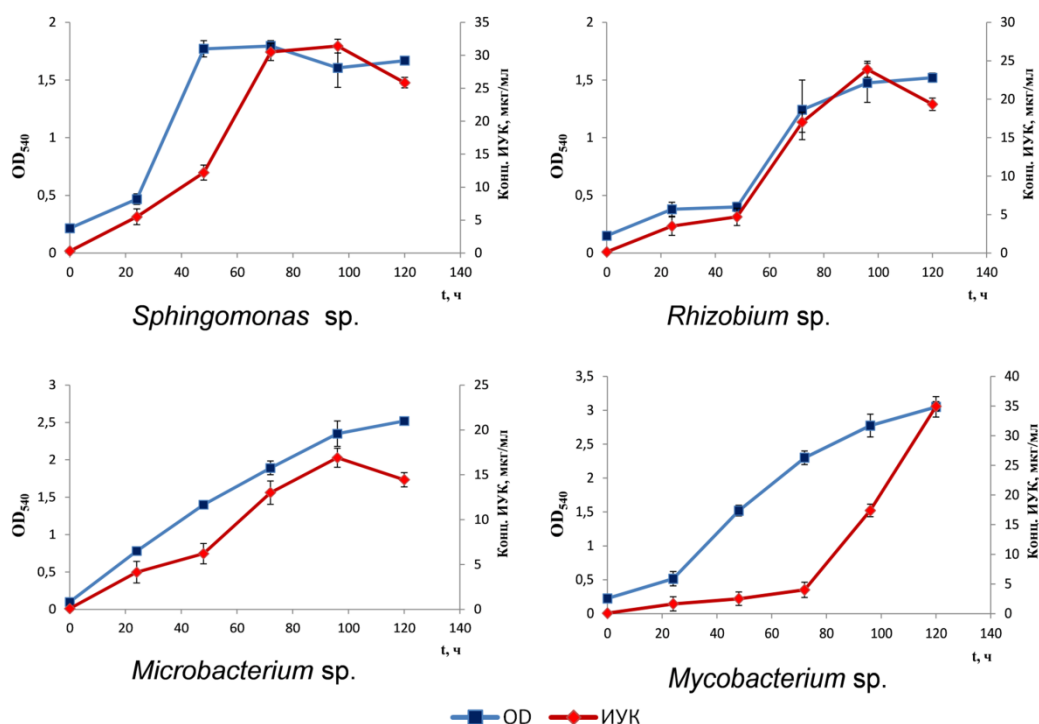


Рисунок 90. Динамика роста и образования ауксинов (ИУК) для некоторых активных продуцентов на среде с экзогенным триптофаном (50 мкг/мл). Определение содержания ИУК проводили колориметрически с использованием реактива Сальковского при $\lambda=530$ нм. Результаты представлены средним арифметическим.

На органической среде МПБ, исходно богатой пептидами и аминокислотами, штаммы, ассоциированные с *D. moschatum* и *A. praemorsa*, такие как *Sphingomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Microbacterium* sp. или некоторые представители псевдомонад синтезировали 10-20 мкг/мл ИУК, тогда как у большинства изолятов, также принадлежащим к псевдомонадам, бациллам или флавобактериям, биосинтез ауксинов не превышал 1,5-5 мкг/мл без добавления триптофана (Цавкелова и др., 2004). Триптофан, как и у микромицетов, является индуктором и основным предшественником биосинтеза ИУК у бактерий (Costacurta and Vanderleyden, 1995; Patten and Glick, 1996; Spaepen, 2011).

Таблица 30. Образование ИУК ассоциативными бактериями оранжевых эпифитных орхидей на модифицированной среде Чапека и влияние экзогенного триптофана на уровень синтеза ИУК (с изменениями по Цавкелова и др., 2004).

Орхидея	Бактерии	Триптофан (мкг/мл среды)	ИУК (мкг/мл)	Макс. увелич. синтеза ИУК (в раз)	ИУК (мкг/ед ОП)	Макс. увелич. синтеза ИУК (в раз)
<i>Dendrobium moschatum</i>	<i>Sphingomonas</i> sp.18	0	1.8 *	28	0.7	31
		50	17.4		7.1	
		100	38.4		14.6	
		200	50.2		21.4	
	<i>Microbacterium</i> sp.23	0	2.5	21	0.3	60
		50	3.1		0.9	
		100	14.6		5.7	
		200	53.1		18.0	
	<i>Mycobacterium</i> sp.1	0	3.1	30	0.8	29
		50	34.0		8.1	
		100	86.1		21.0	
		200	92.9		23.2	
	<i>Bacillus</i> sp.3	0	6.6	6	4.5	8
		50	13.2		11.6	
		100	28.4		24.3	
		200	37.6		36.3	
	<i>Rhizobium</i> sp.5	0	1.5	34	0.7	31
		50	2.8		1.2	
		100	16.3		6.8	
		200	60.4		21.6	
<i>Acampe praemorsa</i>	<i>Sphingomonas</i> sp.42	0	1.1	63	0.5	75
		50	17.5		7.0	
		100	43.4		20.4	
		200	69.4		37.3	
	<i>Rhodococcus</i> sp.37	0	0.4	124	1.1	52
		50	6.2		25.7	
		100	22.7		36.0	
		200	49.6		57.7	
	<i>Cellulomonas</i> sp.23	0	1.0	54	0.7	29
		50	19.9		8.3	
		100	35.6		12.8	
		200	53.9		20.6	
	<i>Haloanella</i> sp.24	0	0.3	103	1.0	172
		50	14.2		78.7	
		100	21.2		109.9	
		200	31.0		172.4	
	<i>Bacillus</i> sp.12	0	1.9	4	2.4	3
		50	1.9		2.7	
		100	3.7		3.1	
		200	8.4		7.3	

При культивировании на минеральной среде без добавления триптофана образование ИУК бактериями не превышало 0,3–6,6 мкг/мл, тогда как при добавлении 200 мкг/мл L-триптофана уровень синтеза ИУК повышался в 30-170 раз. Выделенные с корней *D. moschatum* *Sphingomonas* sp. 18, *Microbacterium* sp. 23, *Mycobacterium* sp. 1, *Bacillus* sp.

3 и *Rhizobium* sp. 5 синтезировали соответственно 50,2; 53,1; 92,9; 37,6 и 60,4 мкг ИУК/мл, а бактерии, изолированные с корней *Acampe praemorsa* (*Sphingomonas* sp. 42, *Rhodococcus* sp. 37, *Cellulomonas* sp. 23, *Pseudomonas* sp. 24), – 69,4; 49,6; 53,9 и 31,0 мкг ИУК/мл (Цавкелова и др., 2004). Известно, что добавление экзогенного триптофана в количестве 200-500 мкг/мл способствует образованию у различных штаммов *Arthrobacter* и *Pseudomonas* ауксинов в пределах 5-15, 20-25 и 90-120 мкг ИУК/мл (Мордухова и др., 1991; Иванова и др., 2001; Белимов и др., 1999).

Без добавления триптофана базовый уровень синтеза ИУК бактериальными культурами на МПБ был обычно выше, чем на синтетической среде Чапека за счет большего содержания питательных веществ, позволяющих нарастить большую биомассу, но также и за счет исходного наличия триптофана в среде. В то же время нами было показано, что эффект индукции биосинтеза ИУК более отчетливо прослеживается именно на синтетической среде, тогда как добавление триптофана к богатой пептидами и аминокислотами среде может не вызывать стимуляции биосинтеза ИУК (Pavlova et al., 2017).

Известно, что триптофан существенно стимулирует микробный биосинтез ИУК у RGPB штаммов (Иванова и др., 2001; Halda-Alija, 2003; Khalid et al., 2004). Корневые экссудаты содержат триптофан и снабжают им ризоплану и ризосферу в составе экзометаболитов, который затем подвергается конверсии в ИУК микроорганизмами, ассоциированными с растениями (Jaeger et al., 1999; Кравченко и др., 2004; Kamilova et al., 2006).

Результаты наших исследований также подтверждают эффективное использование экзогенного триптофана и его биоконверсию в ИУК, что говорит в пользу функционирования, прежде всего, триптофан-зависимых путей биосинтеза ауксинов у исследованных нами ризобактерий. Среди других ризобактерий наиболее активными продуцентами ИУК оказались *Sphingomonas* sp., *Agrococcus* sp. и *Roseomonas* sp., выделенные с воздушных корней *D. moschatum*, а также *Azospirillum* sp., *Enterobacter* sp., *Caulobacter* sp., и *Streptomyces* sp., выделенные с субстратных корней растения (Tsavkelova et al., 2016). Представители *Azospirillum*, *Bacillus*, *Sphingomonas* и *Streptomyces* являются известными PGPR видами, тогда как информация о фитосимбионтных свойствах ризобактерий *Roseomonas* и *Agrococcus* в литературе к настоящему моменту отсутствует. Эти изоляты были также исследованы на способность образовывать ауксины при культивировании на различных средах (полусинтетической среде ЧДЭ и органической – триптон-соевом бульоне) с использованием различных концентраций L- и DL- триптофана (200 и 400 мкг/мл).

Исследование воздействия экзогенного триптофана на образование ауксинов культурами продуцентов ИУК, предполагаемыми для дальнейшего их применения в агробиотехнологии орхидей для бактеризации их семян, необходимо, так как прорастание семян орхидных – крайне длительный процесс и добавление в среду культивирования семян оптимальных количеств триптофана позволит РГРВ штаммам, используя его в процессе культивирования, проводить его биоконверсию в ИУК долгосрочно. Для культур *Roseomonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Bacillus pumillus* и *Mycobacterium* sp. максимальные количества образуемой ИУК были отмечены при добавлении 400 мкг/мл L-триптофана к минеральной среде (табл. 31); они образовывали, соответственно, 31,6; 52,2; 22,4 и 69,8 мкг/мл ауксина. Для *Bacillus* sp. и *Mycobacterium* sp. разница оказалась значительной: на ТСБ содержание ИУК у этих культур не превосходило 3-4 мкг/мл, а на среде ЧДЭ количество ИУК достигало 20 и 70 мкг/мл, соответственно. Культуры *Caulobacter* sp. и *Enterobacter* sp., наоборот, показали противоположный эффект с образованием около 20 мкг/мл ауксина в ЧДЭ и 60 и 70 мкг/мл ИУК в среде ТСБ (при добавлении 400 мкг/мл L-Трп). Однако накопление биомассы для *Caulobacter* sp. было значительно выше в минеральной среде. Стимулирующий эффект L-триптофана на увеличение образования ИУК в культуре *Streptomyces* sp. наблюдали только в среде ЧДЭ, а в среде ТСБ, наличие органических веществ и пептидов (аминокислот, полипептидов) сглаживали эффект стимуляции биосинтеза ИУК триптофаном (табл. 31). Несмотря на общеизвестный факт, что естественная L-форма триптофана лучше усваивается и, таким образом, стимулирует биосинтез ИУК с большей эффективностью, наши результаты показывают, что разница концентраций и изомерных форм менее очевидна и оказывает меньше влияния, чем состав среды. Количество ИУК, образуемое с 200 и 400 мкг/мл L-Трп в ТСБ отличались немного, в то время как разница в уровне образуемого ауксина в минеральной среде была значительной, при сходном количестве биомассы. Стимулирующий эффект экзогенного триптофана на биосинтез ауксина подтверждает триптофан-зависимый способ биосинтеза ИУК у всех исследованных бактерий. При добавлении в среду ЧДЭ 200 мкг/мл L-Трп, *Azospirillum* sp. и *Agrococcus* sp. образовывали $31,8 \pm 1,3$ и $12,4 \pm 1,8$ мкг ИУК/мл, соответственно.

Таблица 31. Образование ИУК ассоциативными бактериями *D. moschatum* в зависимости от типа питательной среды и экзогенного триптофана (с изменениями по Tsavkelova et al., 2016).

Бактерии	Среда культивирования триптофан (L-, DL-форма)/ концентрация мкг/млb	ИУК (мкг/мл)	OD600c
<i>Roseomonas</i> sp. БК	ЧДЭ-L200	1.3 ± 0.08	0.5 ± 0.04
	ЧДЭ-L400	31.6 ± 1.60	0.4 ± 0.08
	ЧДЭ-DL200	0.8 ± 0.10	0.4 ± 0.00
	ЧДЭ-DL400	20.3 ± 0.94	0.8 ± 0.02
	ТСБ-L200	12.5 ± 0.20	0.7 ± 0.06
	ТСБ-L400	19.7 ± 1.02	0.7 ± 0.00
	ТСБ-DL200	10.3 ± 0.40	0.7 ± 0.10
	ТСБ-DL400	19.9 ± 0.30	0.6 ± 0.13
<i>Sphingomonas</i> sp. БК	ЧДЭ-L 200	29.4 ± 1.30	1.6 ± 0.00
	ЧДЭ-L400	52.2 ± 2.84	1.0 ± 0.00
	ЧДЭ-DL200	12.0 ± 0.38	1.3 ± 0.04
	ЧДЭ-DL400	26.1 ± 0.81	1.8 ± 0.08
	ТСБ-L200	6.8 ± 0.14	0.9 ± 0.04
	ТСБ-L400	11.3 ± 0.12	1.6 ± 0.02
	ТСБ-DL200	10.3 ± 0.36	1.2 ± 0.05
	ТСБ-DL400	14.5 ± 0.70	1.1 ± 0.00
<i>Caulobacter</i> sp. СК	ЧДЭ-L200	18.8 ± 0.90	5.6 ± 0.33
	ЧДЭ-L400	23.6 ± 0.95	5.1 ± 0.18
	ЧДЭ-DL200	5.1 ± 0.07	3.3 ± 0.08
	ЧДЭ-DL400	8.5 ± 0.38	3.5 ± 0.24
	ТСБ-L200	46.4 ± 2.16	0.5 ± 0.00
	ТСБ-L400	60.9 ± 2.64	0.6 ± 0.06
	ТСБ-DL200	23.3 ± 1.05	0.6 ± 0.10
	ТСБ-DL400	34.8 ± 1.50	0.7 ± 0.00
<i>Enterobacter</i> sp. СК	ЧДЭ-L200	4.2 ± 0.12	0.6 ± 0.00
	ЧДЭ-L400	20.7 ± 1.12	0.5 ± 0.20
	ЧДЭ-DL200	2.4 ± 0.09	0.6 ± 0.03
	ЧДЭ-DL400	14.5 ± 0.87	0.2 ± 0.00
	ТСБ-L200	59.4 ± 3.50	1.1 ± 0.04
	ТСБ-L400	71.5 ± 3.82	1.2 ± 0.02
	ТСБ-DL200	47.0 ± 2.28	1.2 ± 0.05
	ТСБ-DL400	56.7 ± 1.13	0.6 ± 0.08
<i>Streptomyces</i> sp. СК	ЧДЭ-L200	7.7 ± 0.07	2.8 ± 0.05
	ЧДЭ-L400	14.3 ± 0.54	3.0 ± 0.05
	ЧДЭ-DL200	4.3 ± 0.15	3.0 ± 0.02
	ЧДЭ-DL400	10.6 ± 0.64	3.0 ± 0.06
	ТСБ-L200	14.5 ± 1.20	3.5 ± 0.02
	ТСБ-L400	19.7 ± 0.02	3.8 ± 0.33
	ТСБ-DL200	20.3 ± 1.05	3.8 ± 0.08
	ТСБ-DL400	22.6 ± 0.85	3.9 ± 0.24

<i>Bacillus pumilus</i>	ЧДЭ-L200	7.5 ± 0.34	0.9 ± 0.03
	ЧДЭ-L400	20.4 ± 0.05	0.9 ± 0.07
	ЧДЭ-DL200	6.8 ± 0.05	0.8 ± 0.00
	ЧДЭ-DL400	18.2 ± 0.73	0.9 ± 0.12
	ТСБ-L200	3.3 ± 0.18	1.2 ± 0.02
	ТСБ-L400	2.6 ± 0.06	1.4 ± 0.29
	ТСБ-DL200	2.4 ± 0.04	1.4 ± 0.31
	ТСБ-DL400	2.5 ± 0.16	0.9 ± 0.23
<i>Mycobacterium</i> sp. СК	ЧДЭ-L200	47.7 ± 2.47	2.9 ± 0.35
	ЧДЭ-L400	69.8 ± 3.20	3.5 ± 0.22
	ЧДЭ-DL200	14.3 ± 0.36	3.4 ± 0.08
	ЧДЭ-DL400	39.1 ± 1.55	3.3 ± 0.26
	ТСБ-L200	4.0 ± 0.22	1.8 ± 0.04
	ТСБ-L400	3.9 ± 0.08	1.2 ± 0.00
	ТСБ-DL200	1.8 ± 0.10	1.5 ± 0.02
	ТСБ-DL400	2.7 ± 0.06	1.2 ± 0.03

Примечания: значения представлены средним из трёх повторностей из трёх независимых экспериментов ± стандартное отклонение.

^a - Бактериальные штаммы обозначены как: СК – изолированы с субстратных корней *Dendrobium moschatum*, ВК – изолированы с воздушных корней *D. moschatum*; *Bacillus pumilus* был выделен ранее (Коломейцева и др., 2002) и идентифицирован с помощью молекулярно-генетических методов в этой работе.

^b - Для определения количеств ауксина, бактерии культивировали в течение 72-96 ч. Содержание ИУК определяли колориметрически с реактивом Сальковского. ЧДЭ - среда Чапека с дрожжевым экстрактом (ЧДЭ); ТСБ - трижды разведённый триптон-соевый бульон.

^c - b OD₆₀₀ оптическая плотность культуры, соответствующая максимальному содержанию ИУК в КЖ

При работе с изолятами, выделенными из дикорастущих орхидей (эпифитная *Pholidota articulata* и наземная *Paphiopedillum appletonianum*), у них был также показан триптофанзависимый биосинтез ИУК; добавление 200 мкг/мл экзогенного триптофана способствует значительному повышению уровня ИУК (Tsavkelova et al., 2007b). Наиболее активными в этом отношении оказались представители *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Agrobacterium* (*Rhizobium*), которые также накапливали максимальное количество ауксинов в течение стационарной фазы роста, в целом, образуя от 3 до 55 мкг/мл ИУК (табл. 32).

Таблица 32. Биосинтез ИУК ризобактериями дикорастущих эпифитных орхидей на среде ЧДЭ с триптофаном (200 мкг/мл⁻¹; с изменениями по Tsavkelova et al., 2007a).

Растение	Тип	Ассоциативные бактерии	max ИУК ^a мкг/мл	
			Исходный уровень биосинтеза	После хранения в течение 6 мес
<i>Raphiopedilum appletonianum</i>	Ризоплана	<i>Burkholderia</i> sp. 1	31 ± 1.5	н.и. ^b
		<i>Burkholderia</i> sp. 2	3 ± 0.3	5 ± 0.2
		<i>Bacillus</i> sp. 3	55 ± 3.2	н.и.
		<i>Bacillus</i> sp. 4	4 ± 0.4	6 ± 0.5
		<i>Erwinia</i> sp. 5	3 ± 0.2	н.и.
		<i>Pseudomonas</i> sp. 6	24 ± 2.7	н.и.
	Эндофиты	<i>Erwinia</i> sp. 7	28 ± 2.5	10 ± 1.2
		<i>Bacillus</i> sp. 8	55 ± 3.2	н.и.
		<i>Bacillus</i> sp. 9	5 ± 0.6	н.и.
<i>Pholidota articulata</i>	Ризоплана	<i>Pseudomonas</i> sp. 10	54 ± 4.3	46 ± 2.6
		<i>Flavobacterium</i> sp. 11	30 ± 2.2	36 ± 2.2
		<i>Flavobacterium</i> sp. 12	18 ± 3.2	н.и.
		<i>Stenotrophomonas</i> sp. 13	31 ± 2.5	2 ± 0.2
		<i>Pantoea</i> sp. 14	21 ± 2.0	0
		<i>Chryseobacterium</i> sp.15	32 ± 3.2	0
		<i>Agrobacterium (Rhizobium)</i> sp. 16	38 ± 1.4	23 ± 2.0
		<i>Erwinia</i> sp. 17	10 ± 0.5	2 ± 0.1
		<i>Paracoccus</i> sp. 18	14 ± 3.0	5 ± 0.2
		<i>Burkholderia</i> sp. 19	6 ± 0.2	7 ± 0.8
	Эндофиты	<i>Pseudomonas</i> sp. 20	28 ± 2.8	32 ± 2.0
		<i>Bacillus</i> sp. 21	58 ± 4.2	35 ± 3.8
		<i>Flavobacterium</i> sp. 22	33 ± 3.2	10 ± 2.2

Примечания: ^aМаксимальное количество ИУК отмечено в стационарной фазе роста.

^b н.и. - не исследовали. Значения представлены средним из пяти повторностей ± стандартное отклонение.

При сравнении уровня биосинтеза ИУК изолятами сразу же после их выделения в чистые культуры и после хранения под маслом в течение 6 месяцев, было обнаружено, что данный тип хранения по-разному сказывается на продуцентах: так, *Pantoea* и *Chryseobacterium* утратили способность к биосинтезу ИУК, штаммы *Erwinia*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Agrobacterium*, *Bacillus* sp. 21, *Flavobacterium* sp. 22 и *Pseudomonas* sp. 10 сократили в разной степени выход ауксинов, но хранение никак не повлияло на продуктивность штаммов *Burkholderia* sp. 2 и 19, *Bacillus* sp. 4, *Flavobacterium* sp. 11 и *Pseudomonas* sp. 20.

Анализ влияния условий хранения был также проведен с культурами, выделенными с оранжерейных орхидей, которые находились на хранение в течение года. Оказалось, что некоторые из ранее исследованных штаммов также снизили выход образуемых ауксинов: без добавления триптофана к среде LB базовый синтез ИУК составил $4,5 \pm 0,02$ и $10,1 \pm 0,08$ мкг ИУК/мл для *Rhizobium* sp. (№5) и *Sphingomonas* sp. (№18), соответственно, и только $1,7 \pm 0,1$ и $1,5 \pm 0,06$ мкг ИУК/мл для *Mycobacterium* sp. (№1) и *Microbacterium* sp. (№23), соответственно. На полусинтетической среде ЧДЭ эти штаммы перестали образовывать ИУК, а *Rhizobium* sp. и *Sphingomonas* sp. образовывали незначительные количества ($0,9 \pm 0,05$ и $0,5 \pm 0,02$; мкг ИУК/мл, соответственно). Экзогенный триптофан, тем не менее, значительно повысил выход ИУК (табл. 33). *Sphingomonas* sp. сохранил уровень образуемой ИУК (46,8 мкг/мл), аналогичный исходному (50,2 мкг/мл), тогда как другие исследованные культуры сократили количество ИУК в 1,3 (*Mycobacterium* sp.), 1,6 (*Rhizobium* sp.) и 5,5 (*Microbacterium* sp.) раза. Культуры *Mycobacterium* sp.1 и *Bacillus pumilus* KP7946010 (Tsavkelova et al., 2016) незначительно сократили свою способность к биосинтезу ауксинов, по сравнению с исходным уровнем (Коломейцева и др., 2002; Цавкелова, 2003). *Mycobacterium* sp. сохранил его на уровне 47,7 и 69,8 мкг ИУК/мл на средах ЧДЭ-L200 и ЧДЭ-L400, соответственно, а *B. pumilus* – 7,5 (ЧДЭ-L200) и 20,4 (ЧДЭ-L400) мкг ИУК/мл (табл. 33).

Таблица 33. Микробный биосинтез ИУК и влияние экзогенного триптофана на культуры после хранения под маслом в течение года (с изменениями Tsavkelova et al., 2007b).

Ризобактерии	Среда	Трп, мкг/мл	Максимальные значения ИУК, мкг/мл ^a	OD ₆₀₀ (ед)	Максимальные значения ИУК (мкг/мл × OD ₆₀₀) ^b
<i>Sphingomonas</i> sp.	LB	0	$15,7 \pm 0,90$	1,55	10,1
		200	$67,4 \pm 2,30$	1,54	43,8
	ЧДЭ	0	$1,8 \pm 0,02$	3,60	0,5
		200	$46,8 \pm 1,20$	2,60	17,9
<i>Rhizobium</i> sp.	LB	0	$2,3 \pm 0,09$	0,52	4,5
		200	$24,2 \pm 0,60$	1,04	23,2
	ЧДЭ	0	$2,4 \pm 0,15$	2,25	0,9
		200	$36,5 \pm 2,80$	2,15	16,9
<i>Mycobacterium</i> sp.	LB	0	$1,0 \pm 0,10$	0,72	1,5
		200	$26,8 \pm 0,90$	1,14	23,5
	GCM	0	$0,4 \pm 0,09$	6,00	0,1
		200	$69,2 \pm 0,40$	7,60	9,1
<i>Microbacterium</i> sp.	LB	0	$0,6 \pm 0,05$	0,34	1,7
		200	$8,4 \pm 0,40$	0,35	24,1
	GCM	0	0	0,19	0
		200	$9,7 \pm 0,90$	0,23	42,0

Примечания: ^a Результаты представлены средним ± стандартная ошибка (эксперимент проводили в 3-х повторностях); ^b OD₆₀₀ - пересчет на оптическую плотность культуры в максимальной точке образования ИУК

3.3.3.1. Идентификация индольных соединений

Анализ с помощью тонкослойной хроматографии (с использованием одного или двух последовательных систем растворителей) индольных соединений, экстрагированных из КЖ изолятов бактерий (представителей родов *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*) подтвердил соответствие полученных полос метчику – индолил-3-уксусной кислоте, показатель R_f которой был идентичен показателю R_f опытных образцов (данные не представлены).

Для идентификации индольных соединений, которые образуют наиболее активные продуценты (*Sphingomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Microbacterium* sp., *Mycobacterium* sp.), был проведен ВЭЖХ анализ экстрактов индолов из культуральной жидкости, результаты которого представлены на рисунке 91. Известно, что бактерии способны синтезировать ауксины, используя несколько метаболических путей, однако, образование ИУК через индолил-3-пировиноградную кислоту (ИПвК), которая затем превращается в индолил-3-ацетальдегид (ИУАлд) и ИУК, является основным путем биосинтеза ауксина у растений, а также многих других микроорганизмов, в том числе PGPB (Costacurta and Vanderleyden, 1995; Brandl and Lindow, 1996; Sergeeva et al., 2002; Woodward and Bartel, 2005; Ona et al., 2005; Spaepen, 2011).

Индолил-3-ацетальдегид (ИУАлд, IAAld), прямой предшественник ИУК, был обнаружен во всех изученных бактериальных культурах. Его содержание у *Microbacterium* sp. было значительно выше конечного продукта, ИУК. Пики со временем удерживания и УФ-спектром, идентичные индолил-3-пировиноградной кислоте (ИПвК, IPA) и/или индолил-3-молочной кислоте (индолил-3-лактат, ИМК, ILA), были обнаружены в этилацетатных экстрактах культур *Sphingomonas* sp., *Rhizobium* sp. и *Microbacterium* sp. (Tsavkelova et al., 2007b).

Значительный уровень другого метаболита, индолил-3-ацетамида (ИАМ, IAM), был обнаружен у *Mycobacterium* sp., что указывает на активность индол-ацетамидного пути биосинтеза ИУК. У других исследованных штаммов ИАМ, а также индолил-ацетонитрил (IAN) среди метаболитов обнаружены не было.

Некоторое время назад считалось, что биосинтез ИУК по индолил-ацетамидному пути происходит главным образом у фитопатогенных представителей *Agrobacterium*, *Pseudomonas* и *Erwinia* (Weiler and Schröder, 1987; Costacurta and Vanderleyden, 1995; Manulis et al., 1998; Patten and Glick, 2002). В то же время ИАМ обнаружен и у известного PGPR вида *Azospirillum brasilense* и некоторых представителей фитосимбиотных стрептомицетов и метиловобактерий (Bar and Okon, 1993; Иванова и др., 2001; Manulis et al.,

1994, 1998). Наличие генов, ответственных за ИАМ путь, также обнаружено у симбионтных *Rhizobium* sp. и *Bradyrhizobium* sp., хотя активность соответствующих ферментов была невысокой или даже не промерялась (Costacurta and Vanderleyden 1995).

Процесс экстракции индольных соединений не влиял на количество ИУК в образце, что было продемонстрировано при проведении экстракции с добавлением аутентичного ИУК в качестве внутреннего стандарта в минеральную питательную среду ЧДЭ и последующей экстракции по той же методике. Различия в показателях количественного содержания ИУК, однако, были нами отмечены в зависимости от того, каким методом, ВЭЖХ или колориметрическим, проводили анализ содержания ИУК. Так, уровень ИУК в культурах *Rhizobium* sp., *Mycobacterium* sp. и *Sphingomonas* sp., определяемый с использованием реактива Сальковского, был примерно в полтора-два раза выше, чем методом ВЭЖХ. В случае исследованных культур, наиболее драматичную разницу (почти в 20 раз) между содержанием ИУК наблюдали в культуре *Microbacterium* sp. Этот факт также отмечен и другими авторами (Мордухова и др., 1991; Glickmann and Dessaux 1995; Иванова и др., 2001), что связано с содержанием других индольных веществ, содержащихся в КЖ и окрашивающихся при взаимодействии с реактивом Сальковского. Известно, что этот реактив также взаимодействует с ИПвК и ИАМ (Glickmann and Dessaux, 1995; Patten and Glick, 2002).

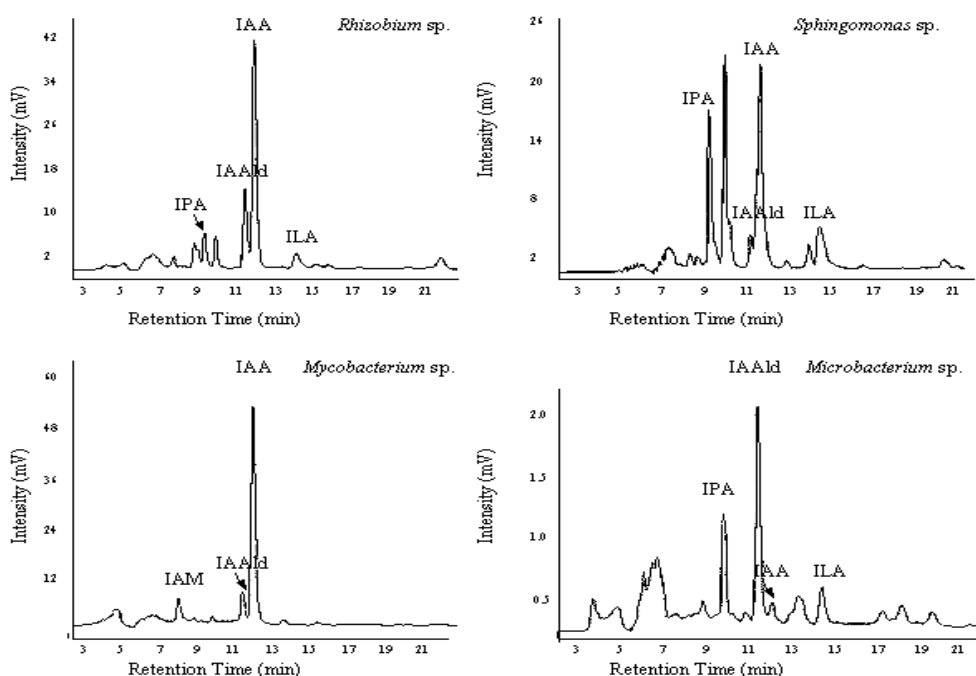


Рисунок 91. ВЭЖХ анализ индольных веществ в культуральной жидкости бактерий-продуцентов ИУК, выращенных в среде ЧДЭ. IAA – индолил-3-уксусная кислота, IAAld – индолил-3-ацетальдегид, IPA – индолил-3-пировиноградная кислота, ILA – индолил-3-молочная кислота (Tsavkelova et al., 2007b).

Таким образом, нами была подтверждена способность ассоциативных ризобактерий к биосинтезу ауксинов, впервые получены данные ВЭЖХ анализа по механизму биосинтеза ИУК у представителей родов *Sphingomonas*, *Microbacterium* и *Mycobacterium* (Tsavkelova et al., 2007b); показана активность двух основных путей образования ИУК через ИПВК и ИАМ.

3.3.3.2. Биосинтез индольных соединений ассоциативными микроорганизмами филлопланы

Филлобактерии, заселяющих листовую поверхность *Dendrobium moschatum*, также являются продуцентами ИУК, максимальные количества которой были обнаружены среди метиловых бактерий и сфингомонад, а также у дрожжей *Naganishia* sp. (табл. 34).

Таблица 34. Биосинтез ауксинов филлобактериями и дрожжами *Dendrobium moschatum*.

Название (^a)	ИУК max (мкг/мл) ^b	ОП ^c	ИУК (мкг/ед ОП)
<i>Microbacterium</i> sp. 1	19,3 ± 0,57	7,7 ± 0,63	2,5
<i>Microbacterium</i> sp. 2	7,1 ± 0,68	3,8 ± 0,50	1,8
<i>Acinetobacter</i> sp.4	18,6 ± 0,5	2,6 ± 0,40	7,1
<i>Rathayibacter</i> sp. 5	17,9 ± 0,63	2,1 ± 0,31	8,5
<i>Deinococcus</i> sp. 6	29,6 ± 0,77	2,2 ± 0,35	13,4
<i>Brevibacillus</i> sp. 9	17,6 ± 0,70	14,7 ± 0,90	1,2
<i>Methylobacterium</i> sp. 13	31,5 ± 0,40	0,2 ± 0,60	157,5
<i>Kocuria</i> sp. 14	30,3 ± 0,60	1,7 ± 0,50	17,8
<i>Deinococcus</i> sp. 15	19,5 ± 0,80	1,8 ± 0,37	10,8
<i>Janibacter</i> sp.18	25,0 ± 0,70	0,3 ± 0,03	83,3
<i>Micrococcus</i> sp. 19	37,5 ± 0,90	5,4 ± 0,43	6,9
<i>Marmoricola</i> sp. 27	26,0 ± 0,23	3,5 ± 0,40	7,4
<i>Rathayibacter</i> sp. 29	22,0 ± 0,50	10,0 ± 0,50	2,2
<i>Sphingomonas</i> sp. 34	34,8 ± 0,55	0,2 ± 0,05	174
<i>Sphingomonas</i> sp. 41	39,1 ± 0,67	1,2 ± 0,30	32,6
<i>Cryptococcus</i> sp. 39 ^a	24,6 ± 0,54	0,3 ± 0,05	82,0
<i>Naganishia</i> sp. 42 ^a	47,6 ± 1,20	12,4 ± 1,30	3,8

Обозначения: ^a – дрожжи, ^b – максимальное содержание ИУК за время культивирования, определённое колориметрически; ОП – оптическая плотность культуры, измеренная при длине волны 540 нм, на момент максимального выхода по ИУК. Среда культивирования - ЧДЭ (+300 мкг/мл L-Trp).

У других микроорганизмов уровень выхода ИУК не превышал 20-30 мкг/мл ИУК (с добавлением 300 мкг/мл экзогенного L-триптофана). Также как и для ризобактерий, для выделенных изолятов филлопланы было отмечено, что биосинтез ауксинов происходит в стационарной фазе роста, а уровень выхода среди одноимённых видов, принадлежащих к одному роду, может значительно отличаться.

Максимальное содержание ИУК в среде у культур *Janibacter* sp. №18 и *Marmoricola* sp. №27 достигается через 24-48 часов культивирования, тогда как у представителей *Rathayibacter* sp. №29, *Sphingomonas* sp. №41 и дрожжей *Naganishia* sp. №42 – это может происходить позже, к 6-м-10-м суткам. Подобная стратегия образования ауксинов в микробном сообществе и продуктивности отдельных популяций, составляющих консорциум микроорганизмов, позволяет поддерживать общий фон ИУК в разные временные промежутки, на оптимальном для микробно-растительных взаимодействий уровне. Принимая во внимание тот факт, что филлоплана (поверхность листа) является скорее лимитированной по содержанию питательных веществ средой для микроорганизмов, а неблагоприятные условия и наличие экзогенного триптофана способствуют биосинтезу микробного ИУК, среди филлобактерий (а также дрожжей) обнаруживается значительное количество продуцентов ауксинов.

Известно, что в основном механизме воздействия ауксина на растительную клетку лежит растяжение клеточной стенки за счёт ряда последовательных событий, в том числе, активации протонной помпы плазмалеммы, вытеснения кальция и ослабления водородных связей, оптимизации pH клетки для действия кислых гидролаз и др. Причём подобное влияние происходит при достаточно низких концентрациях ауксина (45 мкМ; Lindow and Brandl, 2003), а экзогенно добавленный ауксин может способствовать таким образом выделению углеводов через клеточную стенку (Fry, 1989). Существует предположение, что одним из преимуществ бактерий, образующих ИУК, является то, что так микроорганизмы могут получать доступ к питательным веществам за счёт поступления углеводов из растительных клеток (Lindow and Brandl, 2003).

В нашем исследовании мы показали способность к биосинтезу ИУК не только у уже известных RGPB штаммов, таких как метиловобактерии, микробактерии или сфингомонады, но и у ряда бактерий, например, представителей родов *Rathayibacter*, *Deinococcus*, *Marmoricola*, которые не освещались широко в литературе как фитосимбионтные партнёры растений. В некоторых работах (Poonguzhali et al., 2006) авторы не выявили способности к биосинтезу ИУК у *Rathayibacter tritici*. Также

противоречивы мнения об образовании ауксинов видами, принадлежащими к *Janibacter*: в некоторых исследованиях (Yadav et al., 2015; Marques et al., 2015) отсутствовал синтез ИУК у этих бактерий, тогда как в другой работе (Liu et al., 2017) было показано, что *Janibacter* sp. способен к образованию ИУК на достаточно высоком уровне.

Биосинтез ИУК у бревибацилл был неоднократно подтвержден, при этом, как и для других микроорганизмов, её образование является видоспецифичным: например, *B. choshinensis* и *B. brevis* образуют ИУК на уровне 4-5 мкг/мл ИУК, в то время как у *B. reuszeri* биосинтез этого фитогормона не обнаруживается (Vivas et al., 2005; Kukla et al., 2014; Marques et al., 2015). На примере метиловых бактерий, зачастую встречающихся эпито- и эндофитно в качестве фитосимбионтных микроорганизмов, проведено достаточно много исследований, которые показывают, что выход ИУК является видо- и штаммоспецифичным, а также зависит от ряда внешних условий (состав среды, количество используемого экзогенного триптофана). Так, различные виды из рода *Methylobacterium* синтезируют ИУК на уровне от 5 мкг/мл (*M. mesophilicum*) до 44,8 мкг/мл (*Methylobacterium* sp.; Иванова и др., 2001; Verma et al., 2014; Yadav et al., 2015). Сходная неоднородность свойственна и другим филло- и ризобактериям: среди представителей рода *Kocuria* наиболее высокоактивным продуцентом считается *K. rosea* (132,0 мкг ИУК/мл), а минимальной продуктивностью обладает *K. varians* (2,9 мкг ИУК/мл; Kukla et al., 2014), тогда как другие виды не способны к биосинтезу ИУК (Yadav et al., 2015). Ранее, этот род как и представители другого рода, *Nesterenkonia*, принадлежали к микрококкам, распространённым в почве, в том числе среди ризобактерий (Li et al., 2012; Soussi et al., 2016), уровень биосинтеза ИУК которых также варьирует от 1,5 до 17,5 мкг/мл (Verma et al., 2014; Liu et al., 2017).

Примечательно, что многие из филлобактерий были нами выделены среди доминирующих популяций микробного сообщества ризопланы эпифитных орхидей, а их активность в биосинтезе ИУК подтверждена не только колориметрически, но и с помощью аналитических методов ТСХ и ВЭЖХ. Среди этих микроорганизмов – микрококки, сфингобактерии и микробактерии. В последнее время стало появляться всё больше исследований о способности к биосинтезу ИУК этими бактериями: так, различные штаммы *Sphingomonas* образуют ауксины в пределах 11 - 28 мкг/мл (Poonguzhali et al., 2006; Khan et al., 2014; Liu et al., 2017). *Sphingomonas paucimobilis* ZJSH1, – эндофит *Dendrobium officinale*, помимо ИУК оказался способным к биосинтезу других стимуляторов роста растений: салициловой кислоты и зеатина (Yang et al., 2014).

Что касается дрожжей, колонизирующих ризосферу, ризоплану и филлоплану, также имеются сведения об их фитосимбионтной роли в развитии растений и способности к образованию ИУК (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006; Deng et al., 2012; Sun et al., 2014), а их положительное влияние за счёт образования витаминов и ауксинов было отмечено еще Н.А. Красильниковым (1958). Среди филлодрожжей обнаружено достаточно много биоконтролирующих штаммов, подавляющих рост фитопатогенов, что также благотворно влияет на выживаемость и устойчивость растения-хозяина (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006). Биосинтез ИУК был обнаружен у представителей родов *Rhodotorula* – эндофитов тополя (Xin et al., 2009), *Candida*, *Rhodosporidium*, *Torulaspora* и *Lodderomyces*, изолированных из филлопланы *Saccharum officinarum* (Limtong et al., 2014). *Cryptococcus flavus* образует ИУК на высоком уровне: 43,2-103,9 мкг/мл (Sun et al., 2014), тогда как другие штаммы рода практически не являются продуцентами (0,74 мкг/мл у *Cryptococcus* sp.; Deng et al., 2012). Недавние исследования в отношении *Naganishia adeliensis* и *Symmetrospora* sp. показали, что они образуют 19,7 мкг/г и 13-15 мкг ИУК/мл, соответственно (Peng et al., 2018), таким образом, еще раз подтверждая, что для различных микроорганизмов, взаимодействующих с растениями, ИУК является эволюционно-консервативной молекулой, необходимой для участия в "разговоре и коммуникации" между растением-хозяином и микробными популяциями, составляющими его фитобиом.

Таким образом, большинство входящих в микробные сообщества ризо- и филлопланы микроорганизмы способны к биосинтезу основного стимулятора роста растений – ИУК. При этом многие исследованные микроорганизмы имеют базовый уровень биосинтеза ИУК (1-5 мкг ИУК/мл), который увеличивается в разы при добавлении экзогенного триптофана, подтверждая его эффективную конверсию и преимущественное использование триптофан-зависимых путей биосинтеза ИУК. При этом, даже при добавлении 200-300 мкг/мл L-триптофана, исследуемые микроорганизмы образуют оптимальное для растений количество ауксинов (не превышая 20-30 мкг/мл в микробных сообществах филлопланы и 50-60 мкг/мл – в микробных сообществах ризопланы). У всех исследованных изолятов отсутствует избыточная продуктивность этого фитогормона, зачастую характерная для болезнетворных микроорганизмов (Hansen and Grossmann, 2000), при этом, различные популяции микроорганизмов, составляющие микробный консорциум (фитобиом), участвуют в "тонкой настройке" уровня экзогенной ИУК, определяя общую насыщенность пула ауксинами.

3.3.4. Определение биологической активности микробной ИУК

Функциональная активность ИУК, образуемой микроорганизмами, колонизирующими орхидеи, была подтверждена нами ранее в биотестах, в которых было показано её стимулирующее ризогенез действие (Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2004; Tsavkelova et al., 2007a). Для наиболее активных продуцентов среди выделенных ризобактерий действие ауксинов было продемонстрировано в биотестах с coleoptilyami пшеницы и с черенками фасоли (рис. 92). Эффекты, направленные на удлинение coleoptiley и увеличение корнеобразования, характеризуют наличие ключевого ауксина, ИУК, в составе образуемых бактериальными культурами индольных веществ. Так, культуры *Rhizobium* sp., *Sphingomonas* sp., *Microbacterium* sp. и *Mycobacterium* sp. способствовали увеличению длины coleoptiley пшеницы на 42,3%; 38,5%; 26,9% и 24,8%, соответственно.

Среди изученных нами микроорганизмов не было таких, чья КЖ ингибировала бы или каким-либо негативным образом сказывалась на развитии черенков фасоли. Более того, культуральная жидкость наиболее активных продуцентов способствовала более высокой закладке корней на черенках, чем стандартное соединение индолил-3-уксусной кислоты в концентрации 50 мкг/мл. Ризобактерии могут образовывать различные индольные соединения, однако, ИУК является наиболее активным ауксином. В среднем, после обработки черенков фасоли культуральной жидкостью продуцентов ИУК, высота закладки корней на них составляла 45-60 мм (против 3-5 мм в контрольных вариантах без ИУК).



Рисунок 92. Ризогенез черенков *Phaseolus vulgaris*, обработанных культуральной жидкостью некоторых изолятов ризобактерий, выращенных с добавлением 200 мкг/мл L-триптофана: 1– среда Чапека без дрожжевого экстракта (контроль); 2 - *Sphingomonas* sp.; 3 - *Rhizobium* sp.; 4 - *Mycobacterium* sp.; 5 - *Bacillus* sp.; 6 - *Flavobacterium* sp.; 7 - *Erwinia* sp.; 8 – *Microbacterium* sp.

Дальнейшее изучение культур ассоциативных бактерий *D. moschatum*, выделенных позже (Tsavkelova et al., 2016) – *Roseomonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Caulobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Streptomyces* sp., а также *Bacillus pumilus*, исходно выделенной из *D. leonis* (Коломейцева, Цавкелова и др., 2002), также подтвердило образование ими функционально-активной ИУК. Обработка черенков фасоли привела к существенному увеличению числа корней и их длины, а также высоты образования корней, которая превышала контрольные образцы в 3-17 раз (табл. 35, рис. 93, 94). Изученные изоляты не подавляли в биотесте рост растений, за исключением культуры *Enterobacter* sp., КЖ которой вызвала загнивание и размягчение тканей в стеблях фасоли.

Таблица 35. Ризогенез черенков *Phaseolus vulgaris* после обработки культуральной жидкостью ассоциативных бактерий (с изменениями по Tsavkelova et al., 2016).

Ризобактерии	Содержание ИУК в культуральной жидкости		Формирование корней	
			Высота закладки, мм	Количество на один черенок
	Среда	(мкг/мл ⁻¹)		
Контроль (вода)	-	0	5 ^a ±1.3	5±2.2
Контроль (среда ЧДЭ)	-	0	4 ^b ±0.7	7 ^b ±4.6
<i>Streptomyces</i> sp.	ТСБ-DL400	22.6	25.0±2.7	38±5.0
<i>Enterobacter</i> sp.	ТСБ-L400	71.5	49.0±1.8	16±3.2
<i>Roseomonas</i> sp.	ЧДЭ-L400	31.6	42,6±2.1	20±5.7
<i>Sphingomonas</i> sp.	ЧДЭ -L400	52.2	47,0±3.3	38±3.2
<i>Caulobacter</i> sp.	ТСБ-DL400	34.8	30.0±2.3	29±4.0
	ЧДЭ -L400	23.6	19.0±2.0	38±6.2
<i>Mycobacterium</i> sp.	ЧДЭ -L400	69.8	60.0±2.8	83±6.0
<i>Bacillus pumilus</i>	ЧДЭ -DL400	18.2	17.0±1.5	21±4.5

Примечания: ^a - Значения представлены средним из 3-5 повторностей трёх независимых экспериментов.

^b - Значения значительно не отличающиеся от контрольных ($p \leq 0.05$); другие значения значимо отличаются ($p \leq 0.05$) от контроля



Рисунок 93. Влияние бактериальных ауксинов на ризогенез черенков *Phaseolus vulgaris*: 1 – контроль (вода); 2 – *Streptomyces* sp.; 3 – *Enterobacter* sp.; 4 – *P. fluorescens*- 32gfp; 5 – *Roseomonas* sp. (DL400); 6 – *Agrococcus* sp. (DL400)

В биотесте с черенками фасоли были также изучены штаммы, выделенные ранее и хранившиеся на протяжении 5-ти лет в лиофильно-высушенном состоянии (культуры

Bacillus pumilus, *Mycobacterium* sp., *Rhizobium* sp.), а также штамм ризобактерии *Pseudomonas fluorescens*-32 gfr. В результате проведённого эксперимента все тестируемые бактериальные культуры проявили высокую активность, а по высоте закладки корней наиболее активными оказались представители *Agrococcus* sp., *Rhizobium* sp., *Mycobacterium* sp. и *Bacillus pumilus*. Но в целом, каждый проверенный штамм, образующий ауксины, проявлял ризогенную активность и способствовал появлению и развитию многочисленных корней на черенках фасоли.



Рисунок 94. Влияние бактериальных ауксинов на ризогенез черенков *Phaseolus vulgaris*: 1 – *Agrococcus* sp. (L200); 2 – *Caulobacter* sp. (L400); 3 – *Rhizobium* sp. (L400); 4 – *Mycobacterium* sp. (L400).

Биотесты, проведённые с культурами ассоциативных бактерий дикорастущих орхидей, также показали биологическую активность синтезируемой ими ИУК, которая способствовала значительному корнеобразованию черенков фасоли (табл. 36).

Таблица 36. Биотест по влиянию ауксинов, образуемых ассоциативными бактериями дикорастущих орхидей (*Paphiopedilum appletonianum* и *Pholidota articulata*) на корнеобразование черенков фасоли (с изменениями по Tsavkelova et al., 2007a)

Вариант опыта	Корнеобразование	
	Высота, мм	Число корней на черенок
Вода	6 ± 1.5	14 ± 5.0
Среда Чапека	4 ± 1.6	11 ± 4.2
ИУК (50 мкг/мл)	57 ± 2.7	65 ± 5.5
<i>Burkholderia</i> sp. 1	48 ± 4.6	56 ± 6.2
<i>Erwinia</i> sp. 7	46 ± 5.8	28 ± 5.2
<i>Bacillus</i> sp. 8	42 ± 2.5	38 ± 5.0
<i>Bacillus</i> sp. 3	51 ± 3.8	56 ± 4.5
<i>Bacillus</i> sp. 21	50 ± 4.2	54 ± 6.2
<i>Chryseobacterium</i> sp.15	41 ± 3.5	40 ± 5.0
<i>Pseudomonas</i> sp. 10	53 ± 2.8	48 ± 6.2
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 13	53 ± 4.2	24 ± 2.8
<i>Erwinia</i> sp. 17	21 ± 2.5	18 ± 3.2
<i>Pseudomonas</i> sp. 20	45 ± 3.0	52 ± 8.0
<i>Flavobacterium</i> sp. 11	51 ± 5.0	33 ± 4.0
<i>Flavobacterium</i> sp. 22	42 ± 3.5	34 ± 3.6
<i>Agrobacterium</i> sp. 16	33 ± 4.7	28 ± 4.7

Все исследованные нами высокоактивные продуценты ИУК, как заселяющие ризоплану, так и эндофиты воздушных и субстратных корней орхидей, синтезируют ауксины, обладающие прямым рост-стимулирующим действием на растения. Образующиеся ими соединения содержатся в КЖ в достаточных и оптимальных количествах для проявления своих ключевых характеристик в отношении клеточного роста и корнеобразования. Таким образом, популяции бактерий, колонизирующие эпифитные растения, в особенности их воздушные корни, способны эффективно конвертировать триптофан в ауксин, который оказывает непосредственное стимулирующее влияние на корневую систему растения-хозяина.

3.4. Потенциальные факторы микробно-растительных взаимодействий

3.4.1. Влияние экзогенной ИУК на развитие популяций ризобактерий

Для того, чтобы оценить возможное влияние ауксинов на самих продуцентов было проанализировано влияние экзогенной ИУК на развитие культур ризобактерий – активных продуцентов ИУК. В качестве питательной среды для роста микроорганизмов использовали синтетическую среду Чапека без дополнительных соединений неопределенного состава (включая дрожжевой экстракт). Наибольший эффект на культуры *Mycobacterium* sp., *Rhizobium* sp. и *Sphingomonas* sp. оказывала ИУК в концентрации 100 мкг/мл, увеличивая в 1,5 -2 раза показатели роста культуры (OD; рис. 95). В то же время рост *Microbacterium* sp. стимулировался 1,0 и 10 мкг/мл экзогенной ИУК: показатели OD₆₀₀ в фазе экспоненциального роста были выше на 29 и 40%, соответственно. Эти результаты показали, что добавление экзогенной ИУК стимулирует рост бактерий и накопление популяцией максимальной биомассы, а оказываемое ИУК влияние – видоспецифично. Ауксин действует на бактерии как гормоноподобное соединение и выступает, по сути, как стимулятор их роста, увеличивая параметры роста бактериальной культуры. Интересно отметить, что ИУК обладает наибольшим стимулирующим эффектом в экспоненциальной фазе роста культуры. Так как концентрация в 10 мкг/мл ИУК оказывала рост-стимулирующее действие на все исследованные нами культуры, то эта концентрация ауксина была также использована при культивировании бактерий на органической (богатой) среде культивирования, чтобы оценить, останется ли этот эффект ИУК. Экзогенная ИУК продолжала оказывать положительное воздействие на рост *Sphingomonas*, *Mycobacterium* и *Microbacterium*, увеличивая примерно в 1,2 раза их OD_{max}.

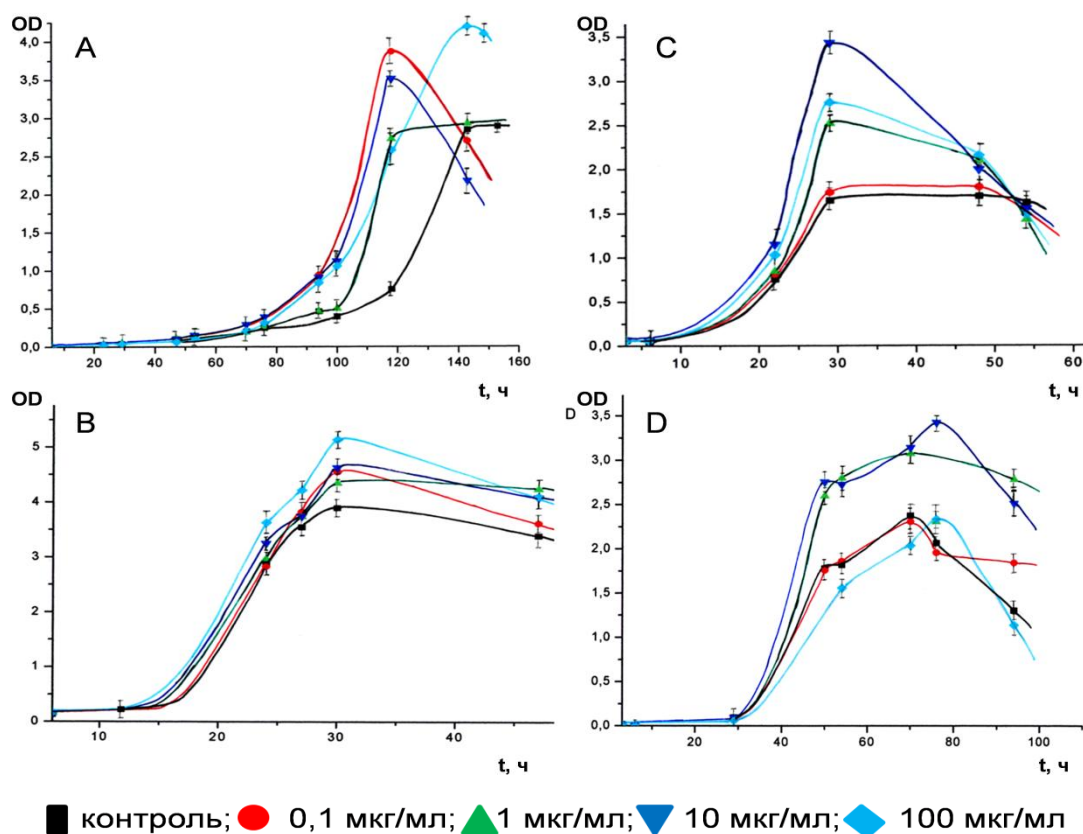


Рисунок 95. Влияние ИУК на показатели OD ризобактерий при их культивировании в среде Чапека: А – *Mycobacterium* sp., В – *Sphingomonas* sp., С – *Rhizobium* sp., D – *Microbacterium* sp. Результаты представлены средним из двух независимых экспериментов с тремя повторностями в каждом (с изменениями по Tsavkelova et al., 2007b).

Ризобактерии могут сочетать способность к биосинтезу ауксинов с их деградацией (Jensen et al., 1995; Leveau and Lindow, 2005). Наиболее эффективное разложение ИУК происходило за сутки при культивировании бактерий на среде с пептоном, при этом в присутствии 0,2% (масса/объем) глюкозы этот процесс подавлялся и полностью прекращался при использовании 5% глюкозы (Libbert and Risch, 1969). Однако другие исследования на примере *Pseudomonas putida* указывают на то, что присутствие фруктозы или глюкозы в питательной среде не влияет на её способность катаболизировать ИУК (Leveau and Lindow, 2005). В наших исследованиях мы также использовали среду LB с пептоном для изучения способности исследуемых бактерий потреблять экзогенную ИУК. Однако ни один из изученных нами изолятов не разлагал ИУК ни за сутки, ни за более длительный период времени (табл. 37). В контрольных условиях (неинокулированная среда с ИУК) содержание ИУК постепенно снижалось (на 18% от изначальной концентрации) за счёт окисления, однако, её количество в бактериальных культурах, наоборот, увеличилось на 9% у *Mycobacterium* sp., на 15% – у *Rhizobium* sp., на 28% – у *Microbacterium* sp. и на 31% – у *Sphingomonas* sp.

Таблица 37. Показатели оптической плотности (OD) бактерий в присутствии экзогенной ИУК в органической среде LB (Tsavkelova et al., 2007b).

Бактерии	t ₀		t ₁ (6 days)		t ₂ (10 days)	
	OD ₆₀₀ unit	ИУК, µg/ml ^a	OD ₆₀₀ unit	ИУК, µg/ml	OD ₆₀₀ unit	ИУК, µg/ml
<i>Rhizobium</i> sp.	0.13	150 ± 1.3	1.12	163 ± 2.1	1.28	178 ± 1.4
<i>Sphingomonas</i> sp.	0.20	147 ± 1.2	1.44	184 ± 1.5	1.68	192 ± 3.5
<i>Microbacterium</i> sp.	0.10	124 ± 0.8	2.00	157 ± 1.4	2.48	159 ± 2.9
<i>Mycobacterium</i> sp.	0.11	151 ± 0.9	1.52	156 ± 2.0	2.00	165 ± 3.0

Примечания: ^a Результаты представлены средним ± стандартная ошибка из трёх повторностей

Дополнительно были проанализированы условия культивирования микроорганизмов в полностью синтетической среде Чапека без и с добавлением глюкозы в среду в количестве 10 и 1,5 г/л (Табл. 38). Бактерии, инкубированные в среде с 1,5 г/л глюкозы показали лишь незначительное уменьшение ИУК в среде через 6 сут культивирования. В среде без каких-либо источников углерода (0 г/л глюкозы) микроорганизмы также не использовали ИУК и её деградации отмечено не было, что свидетельствует о том, что ризобактерии не использует ИУК как источник углерода и энергии.

Таблица 38. Рост бактерий в присутствии экзогенной ИУК в минеральной среде Чапека

Культуры	Глюкоза, 10 g/L ^a				Глюкоза, 1.5 g/L				Глюкоза, 0 g/L			
	t ₀		t ₁ (6 сут)		t ₀		t ₁ (6 сут)		t ₀		t ₁ (6 сут)	
	OD ₆₀₀	ИУК, µg/ml	OD ₆₀₀	ИУК, µg/ml	OD ₆₀₀	ИУК, µg/ml	OD ₆₀₀	ИУК, µg/ml	OD ₆₀₀	ИУК, µg/ml	OD ₆₀₀	ИУК, µg/ml
Контроль		231		190		121		101		205		180
<i>Sphingomonas</i>	0.30	202	2.10	283	0.28	111	1.00	100	0.54	210	0.48	205
<i>Rhizobium</i>	0.28	85	1.10	104	0.40	97	0.73	87	0.46	195	0.39	193
<i>Microbacterium</i>	0.36	92	1.14	98	0.30	111	0.63	96	0.27	207	0.23	214
<i>Mycobacterium</i>	0.32	176	0.20	187	0.30	125	0.65	105	0.29	211	0.20	218

Примечания: ^a Результаты представлены средним из трёх повторностей

Таким образом, не происходило потребления ИУК как потенциального источника углерода ни в богатой органической среде, ни в минеральной среде, даже будучи единственным углерод-содержащим субстратом, подтверждая что рост-стимулирующий эффект ИУК на рост бактериальной популяции связан прежде всего с гормоноподобным действием, а не с использованием этого соединения, как возможного субстрата. Некоторые микроорганизмы даже увеличили содержание ауксинов в среде, что может быть связано с дополнительным синтезом ИУК на пептон-содержащей среде, в которой

содержится триптофан. Известно, что ИУК может выступать аутоиндуктором собственного биосинтеза, что было показано ранее (Sergeeva et al., 2002) на примере цианобактерий *Nostoc* sp. Также сообщается (van de Broek et al., 1999) о том, что добавленная к среде культивирования *Azospirillum brasilense* ИУК индуцирует транскрипцию гена *ipdC*, кодирующего ключевой фермент биосинтеза по ИПвК пути – индолил-3-пируватдекарбоксилазу.

Известно, что у растений наиболее активные концентрации ауксинов, стимулирующие ризогенез, лежат в пределах 10-100 мкг/мл. Те же концентрации ИУК оказывали стимулирующее влияние и в нашем исследовании (это 10 мкг/мл для культур *Microbacterium* и *Rhizobium* и 100 мкг/мл для культур *Sphingomonas* и *Mycobacterium*). В ранних исследованиях Берлинера (Berliner, 1981) было показано, что ИУК сокращала и даже полностью элиминировала начальную лаг- фазу при росте культуры зелёных водорослей *Cosmarium botrytis*. Мы также обнаружили тенденцию к сокращению лаг- и стационарной фаз роста бактерий в культурах с экзогенной ИУК. Вероятно, молекула ИУК, являясь сигнальным соединением в коммуникации между растением-хозяином и микроорганизмами-партнёрами, оказывает гормоноподобное действие на «ауксин-чувствительные» ризобактерии, которые получают преимущество при колонизации ризопланы. В свою очередь, ранее (Liu and Nester, 2006) было показано, что добавление 200 мкМ ИУК, наоборот, подавляло рост некоторых бактерий, таких как *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Sinorhizobium* и *Xanthomonas*, хотя этот эффект зависел от pH и проявлялся, например, при pH 5,5, но не при pH 7,0. Механизмы этих воздействий нуждаются в более глубоком изучении.

3.4.2. Антимикробные свойства *Dendrobium moschatum*

В результате проведённых экспериментов, нами было показано, что ризоплана и филлоплана орхидей активно колонизирована микробными сообществами ризо- и филлобактерий, а собственный фитобиом *D. moschatum* представлен многочисленными и разнообразными популяциями гетеротрофных и фототрофных бактерий, численность которых на надземных органах (воздушные корни, филлоплана) превосходит таковую в ризоплане субстратных корней растения. При этом известно, что листья, стебли и псевдобульбы эпифитных орхидей, в том числе различных видов обширного рода *Dendrobium*, используют в традиционной медицине как противовоспалительное средство с антимикробной активностью. В последнее время стали появляться работы, в которых указывается на свойство экстрактов вегетативных частей эпифитных орхидей подавлять

рост некоторых патогенных и условно-патогенных для человека бактерий (Marasini and Joshi, 2012; Sandrasagaran et al., 2014; Буюн и др., 2016; 2017). Однако нашей целью в рамках изучения механизмов взаимодействия ассоциативных микроорганизмов с растением-хозяином было, прежде всего, исследование антимикробной активности *D. moschatum* в отношении бактерий, составляющих фитобиом растения-хозяина. Поскольку для большинства растений используются их вегетативные части, то были проанализированы именно филло-, а не ризобактерии. Кроме того, также были исследованы типичные тест-микроорганизмы: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus*.

Для изучения антибиотических свойств ряда соединений обычно используют чашечный диффузионный метод, при котором смоченные растворами анализируемых веществ фильтры раскладывают на поверхности агаризованной среды, в которую глубинным посевом засевают тест-культуру. Но при анализе растительных экстрактов зачастую используют поверхностный посев культур микроорганизмов (Costa et al., 2012), что может быть связано с присутствием флавоноидных и некоторых других соединений со слабой диффузией в агар. Поэтому оба способа засева были проанализированы. Листья другой эпифитной орхидеи (*Pholidota chinensis*) были также исследованы в эксперименте, поскольку антимикробные свойства *P. imbricata* и *P. articulata* были продемонстрированы в отношении *Vibrio cholerae* и *Staphylococcus aureus* ранее (Marasini and Joshi, 2012).

В результате проведения предварительных экспериментов (данные не представлены) было показано, что при сравнении различных растворителей (этанол, метанол), их концентраций (50, 70, 90%), а также времени экстрагирования (2 ч, 18 ч, 24 ч) наилучшие результаты были получены при использовании 70%-го этилового спирта, который в соотношении 1:5 (масса к объёму) добавляли к гомогенизированной фитомассе (рис. 96). Также были проанализированы способы внесения экстрактов в лунки и пропитывания им фильтров: последний способ показывает более чёткие результаты.

При анализе нескольких экстрактов известных лекарственных растений: травы тысячелистника (*Millefolii herba*), корня солодки (*Glycyrrhizae radices*) и листьев мяты перечной (*Menthae piperitae folia*), наибольшую зону подавления роста наблюдали при использовании корня солодки, которую затем использовали в качестве положительного контроля антимикробного действия фитоэкстрактов (рис. 97).

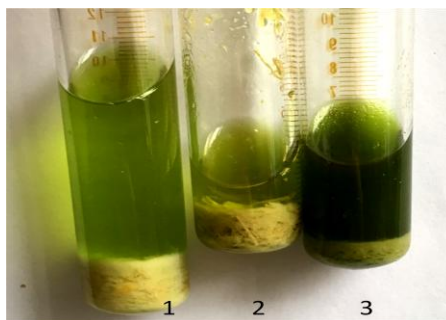


Рисунок 96. Фитоэкстракты (70%-ый этиловый спирт) из вегетативных частей *Dendrobium moschatum*: 1 - стебли, 2 - воздушные корни, 3 - листья

При анализе нескольких экстрактов известных лекарственных растений: травы тысячелистника (*Millefolii herba*), корня солодки (*Glycyrrhizae radices*) и листьев мяты перечной (*Menthae piperitae folia*), наибольшую зону подавления роста наблюдали при использовании корня солодки, которую затем использовали в качестве положительного контроля антимикробного действия фитоэкстрактов (рис. 97).



Рисунок 97. Антибактериальная активность фитоэкстрактов в отношении *Bacillus cereus*: 1 - трава тысячелистника (*Millefolii herba*), 2 - корень солодки (*Glycyrrhizae radices*), 3 - листья мяты перечной (*Menthae piperitae folia*). К - контроль (70% - ный этиловый спирт).

Результаты антибактериального действия экстрактов листьев *D. moschatum* при использовании глубинного посева культур микроорганизмов представлены на рисунке 98, где видно, что наибольшее антимикробное действие показывают фитоэкстракты корней солодки, однако, зоны подавления роста также имеются при использовании экстрактов листьев орхидей – *Pholidota chinensis* и *Dendrobium moschatum* в отношении грамположительной споровой культуры *Brevibacillus* и, в меньшей степени, в отношении микробактерии (№ 3). Минимальная активность была отмечена при тестировании культуры другого актиномицета – *Rathayibacter* sp. На грамотрицательную тест-культуру *E. coli* фитоэкстракты листьев *D. moschatum* ингибирующего роста влияния не оказывали.

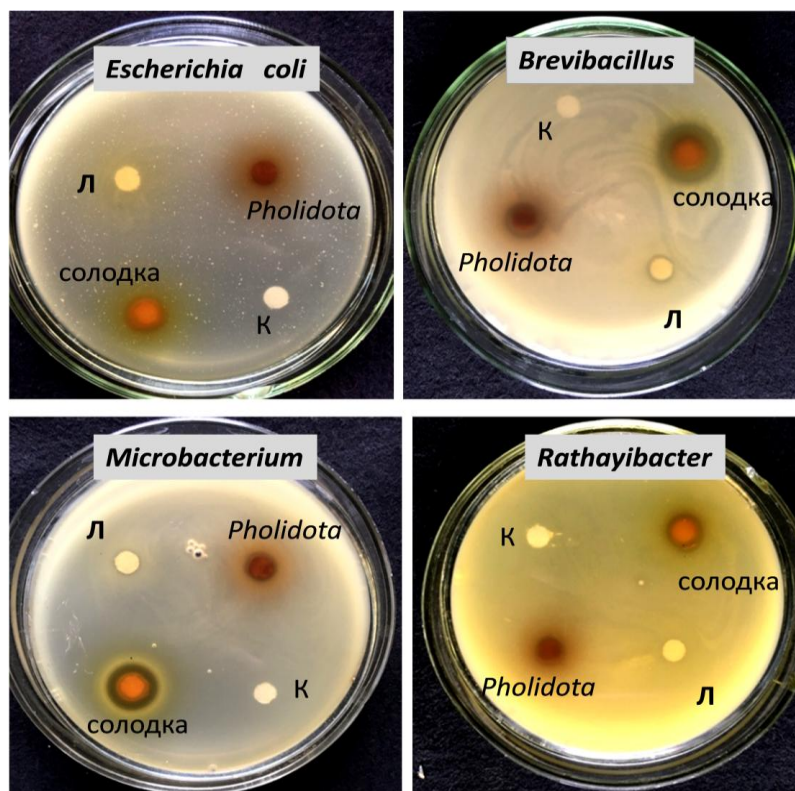


Рисунок 98. Антибактериальное действие фитоэкстрактов – зона подавления роста вокруг фильтров. Обозначения: Л - листья *D. moschatum*, солодка - фитоэкстракт корня солодки (*Glycyrrhizae radices*), *Pholidota* - экстракт листьев эпифитной орхидеи *Pholidota chinensis*; контроль - фильтры, пропитанные 70%-ным этиловым спиртом.

При использовании тест-культуры условно-патогенной бактерии *Staphylococcus aureus* (рис. 99) наблюдали ту же тенденцию: максимальная зона подавления роста культуры – у фитоэкстрактов корней солодки, и зона, лишь несколько превышающая диаметр фильтров, – при использовании фитоэкстрактов листьев *Ph. chinensis* и *D. moschatum*.

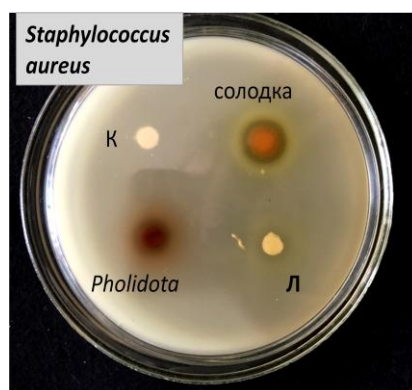


Рисунок 99. Антибактериальное действие фитоэкстрактов - зона подавления роста *Staphylococcus aureus* вокруг фильтров. Обозначения: Л - листья *D. moschatum*, солодка - фитоэкстракт корня солодки (*Glycyrrhizae radices*), *Pholidota* - экстракт листьев эпифитной орхидеи *Pholidota chinensis*; контроль – фильтры, пропитанные 70%-ным этиловым спиртом.

Для некоторых изолятов ассоциативных филлобактерий, прежде всего грамотрицательных бактерий, глубинный посев оказался неподходящим, поэтому их тестировали при поверхностном посеве культур: среди них изоляты метиловых бактерий, сфингомонад, а также культура *Roseomonas* (рис. 100).

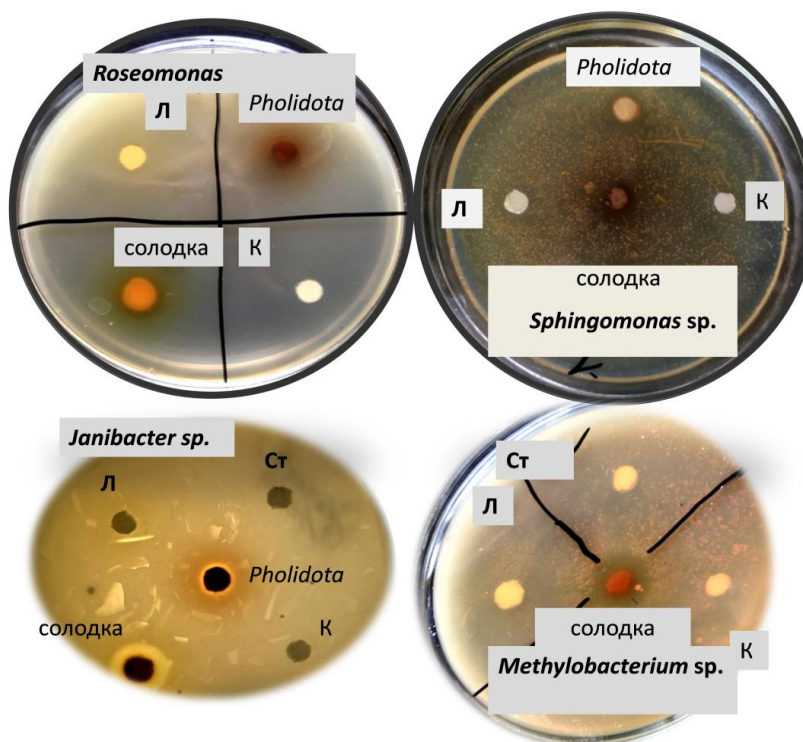


Рисунок 100. Антибактериальное действие фитоэкстрактов. Зона подавления роста изолятов филлобактерий (*Roseomonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Janibacter* sp., *Methylobacterium* sp.) вокруг фильтров. Обозначения: Л - листья и Ст - стебли *D. moschatum*, солодка - фитоэкстракт корня солодки (*Glycyrrhizae radices*), *Pholidota* - экстракт листьев эпифитной орхидеи *Pholidota chinensis*; контроль - фильтры, пропитанные 70%-ным этиловым спиртом.

Фитоэкстракты листьев *D. moschatum* практически не оказывали какого-либо ингибирующего действия на рост *Methylobacterium* sp. и *Roseomonas* sp., а также на представителя актиномицетов – *Janibacter* sp. При этом была отмечена некоторая зона подавления роста сфингомонад. Данные, полученные при измерении зон подавления роста тест-микроорганизмов, представлены в таблице 39. В отличие от контроля, где вообще не наблюдали проявления какой-либо антибактериальной активности, наибольшее антимикробное действие было отмечено в признанном лекарственном растении *Glycyrrhiza* sp., а именно в экстрактах его корней с зоной подавления роста среди филлобактерий около 13-15 мм. Максимальный антимикробный эффект был в отношении грамположительной споровой культуры *Brevibacillus* sp. (18,5 мм).

Таблица 39. Антибактериальная активность фитоэкстрактов

Тест-микроорганизмы	Культура (Грам-принадлежность, способ посева)	Фитоэкстракты	Зона подавления роста бактерий (мм)
Тест-культуры	<i>Bacillus cereus</i> (Г ⁺ , ГП ^b)	Листья <i>D. moschatum</i>	8,0 ± 1,5
		Листья <i>Ph. chinensis</i>	9,5 ± 1,5
		Корни солодки	14,5 ± 1,5
		Контроль ^a	-
	<i>Escherichia coli</i> (Г ⁻ , ГП)	Листья <i>D. moschatum</i>	-
		Листья <i>Ph. chinensis</i>	5,75 ± 0,5
		Корни солодки	8,0
		Контроль	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> (Г ⁺ , ГП)	Листья <i>D. moschatum</i>	8,5 ± 0,5
		Листья <i>Ph. chinensis</i>	12,0 ± 1,0
		Корни солодки	16,0 ± 3,0
		Контроль	-
Ассоциативные филлобактерии <i>D. moschatum</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. №41 (Г ⁻ , ПП ^c)	Листья <i>D. moschatum</i>	8,0 ± 1,5
		Листья <i>Ph. chinensis</i>	10,0 ± 1,0
		Корни солодки	13,6 ± 0,7
		Контроль	-
	<i>Microbacterium</i> sp. №3 (Г ⁺ , ГП)	Листья <i>D. moschatum</i>	7,5 ± 0,5
		Листья <i>Ph. chinensis</i>	8,0 ± 1,0
		Корни солодки	14,0 ± 1,0
		Контроль	-
	<i>Brevibacillus</i> sp. #9 (Г ⁺ , ГП)	Листья <i>D. moschatum</i>	8,0
		Листья <i>Ph. chinensis</i>	10,5 ± 0,5
		Корни солодки	18,5 ± 1,5
		Контроль	-
	<i>Rathayibacter</i> sp. №5 (Г ⁺ , ГП)	Листья <i>D. moschatum</i>	6,0 ± 0,5
		Листья <i>Ph. chinensis</i>	7,5 ± 0,5
		Корни солодки	8,5 ± 0,5
		Контроль	-
	<i>Methylobacterium</i> sp. №21 (Г ⁻ , ПП)	Листья <i>D. moschatum</i>	-
		Листья <i>Ph. chinensis</i>	н/и
		Корни солодки	9,5 ± 1,5
		Контроль	-
	<i>Janibacter</i> sp. №18 (Г ⁺ , ПП)	Листья <i>D. moschatum</i>	6,5 ± 0,5
		Листья <i>Ph. chinensis</i>	8,5 ± 0,5
		Корни солодки	15,0 ± 1,0
		Контроль	-
	<i>Roseomonas</i> sp. №35 (Г ⁻ , ПП)	Листья <i>D. moschatum</i>	7,5 ± 0,5
		Листья <i>Ph. chinensis</i>	8,5 ± 0,5
		Корни солодки	13,0 ± 1,0
		Контроль	-

Обозначения: ^a - контроль: бумажный фильтр диаметром 5 мм, с нанесённым на него раствором 70% этилового спирта, в котором проводили растворение полученных растительных экстрактов. ^b – ГП - глубинный посев культур, ^c - ПП - поверхностный посев культур на питательную среду. Прочерк (-) – отсутствие зоны подавления роста вокруг фильтра; н/и – не исследовали; Г⁻ – Грамотрицательные изоляты филлобактерий, Г⁺ – Грамположительные изоляты филлобактерий. Результаты представлены средним арифметическим из трёх повторностей ± стандартная ошибка.

Антимикробное действие этого растения было отмечено в отношении условнопатогенных тест культур, с наиболее эффективным действием против грамположительных *B. cereus* (14,5 мм) и *S. aureus* (16,0 мм) и менее активным в отношении грамотрицательной *E. coli* (8,0 мм). Интересными оказались данные о высокой антимикробной активности листьев *Pholidota chinensis*, – зона подавления роста более 10 мм при использовании фитоэкстрактов которых проявлялась в отношении *S. aureus*, а среди филлобактерий – в отношении *Brevibacillus* sp.

В отличие от ярко выраженного положительного эффекта фитоэкстрактов корней *Glycyrrhiza* и листьев *Pholidota*, активность экстрактов листьев *D. moschatum* была в 1,5 и более раз меньше, а зоны подавления роста в отношении тестируемых филообактерий и тест-культур не превышала 7-9 мм. Однако отметим, что при использовании стеблей (рис. 97) и корней (данные не представлены), зон подавления роста филлобактерий вообще не наблюдали. Кроме того, следует отметить, что анализируемые филлобактерии являются ассоциативными (были выделены с листьев *D. moschatum*), но не с *Ph. chinensis*, что также может влиять на тот факт, что листья фолидоты оказывают более заметное ингибирующее действие на тестируемые штаммы бактерий, чем листья растения-хозяина.

Таким образом, экстракты, полученные из листьев *D. moschatum*, действительно, проявляют некоторый сдерживающий рост микроорганизмов эффект, однако, его действие не является полностью ингибирующим. Как и в случае других фитоэкстрактов, наибольшая активность при глубинном посеве проявлялась в отношении грамположительных споровых культур *Brevibacillus* sp. и *B. cereus*. При использовании поверхностного посева антимикробную активность также наблюдали в отношении *Sphingomonas* sp., однако, этот эффект нивелировался при глубинном посеве культуры (рис. 101). Возможно, часть антимикробного действия вызвана малорастворимыми или летучими соединениями, входящими в состав экстрактов и необходимы более детальные исследования для понимания этого эффекта.

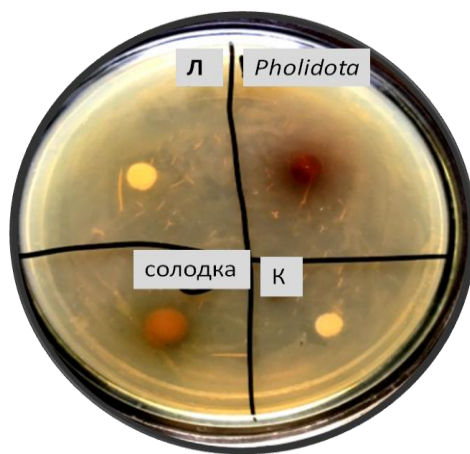


Рисунок 101. Антибактериальное действие фитоэкстрактов в отношении *Sphingomonas* sp. при глубинном посеве культуры. Обозначения: Л - листья *D. moschatum*, солодка - фитоэкстракт корня солодки (*Glycyrrhizae radices*), *Pholidota* - экстракт листьев эпифитной орхидеи *Pholidota chinensis*; контроль - фильтры, пропитанные 70%-ным этиловым спиртом.

В отношении условно патогенных тест-культур наибольшая активность фитоэкстрактов *D. moschatum* была выявлена в отношении грамположительных культур, и практически отсутствовала в отношении *E. coli*. Известно, что экстракты, полученные из эпифитных орхидей, проявляют различную активность. Так, фитоэкстракт листьев эпифитной *Coelogyne assamica* Linden & Rchb. f. имел умеренную активность в отношении *Pseudomonas aeruginosa* (диаметр зоны подавления роста составил 10–15 мм; Buyun et al., 2017), а у листьев и псевдобульб другого вида, *Coelogyne cristata* Lindl., наибольшая зона подавления роста была выявлена против грамположительной культуры *S. aureus* (28 мм и 20 мм, соответственно; Буюн и др., 2016). Листья, побеги, корни и псевдобульбы другого эпифита, *Dendrobium crumenatum*, использованные для приготовления метанольных экстрактов, имели зону подавления роста тест-культур не более 7-10 мм, при этом немного большая активность была отмечена в стеблях и корнях, но не листьях (Sandrasagan et al., 2014): экстракты стеблей были более активны в отношении *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Enterobacter aerogenes*, а экстракты корней и стеблей – в отношении *Streptococcus pneumonia*, *Shigella flexneri* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Sanrasagan et al., 2014). Таким образом, можно сказать, что на сегодняшний момент имеется еще недостаточно данных для полного понимания антимикробного действия веществ, содержащихся в различных частях эпифитных орхидей: на результаты экспериментов могут влиять способы экстракции и используемые органические растворители, способ посева культур и используемая концентрация экстрактов. Кроме того, очевидно, что показатели могут разниться в зависимости от используемых частей растений. В наших экспериментах мы показали, что фитоэкстракты листьев *D. moschatum*,

в отличие от стеблей и воздушных корней этого растения обладают некоторым антибактериальным действием, позволяющим, очевидно, сдерживать рост микроорганизмов, что необходимо для контроля разрастания бактериальных популяций, однако, не ингибирует развитие ассоциативных микроорганизмов полностью. При этом антибактериальное действие между двумя исследованными нами орхидеями различается и у *Pholidota chinesis* оно заметно выше. У обеих орхидей более выражено действие против споровых культур и, таким образом, выборочное ингибирование роста некоторых групп микроорганизмов, что еще раз подтверждает наличие некоторой селективности в выборе спектра ассоциативных, в том числе филлобактерий.

Известно, что при развитии микоризы, орхидея-хозяин контролирует развитие и распространение гиф гриба внутри корней, препятствуя их продвижению в ткани, расположенные глубже коровой паренхимы. Это осуществляется не только за счёт лигнифицирования стенок клеток, но и за счёт образования ряда фенольных и противогрибных соединений (Waterman and Bidartondo, 2008). Синтез антибактериальных соединений в концентрациях, которые не супрессируют их рост полностью, но препятствуют чрезмерному разрастанию при непосредственном контакте, позволяют орхидеям сохранять контроль за развитием ассоциативного микробного сообщества, в том числе, сдерживая распространение грамположительных бактерий (споровых бацилл, а также актинобактерий, преобладающих в составе филлопланы этих растений). Результаты этого исследования подтверждают нашу концепцию о коммуникации –разговоре между растением-хозяином и его ассоциативными партнёрами- микроорганизмами, в которой сигнальные соединения и биологически-активные вещества, образуемые всеми участниками, позволяют вовремя реагировать на поступающие сигналы, что способствует стратегии взаимовыгодного сосуществования и поддержания сбалансированных ассоциативных взаимоотношений для успешного развития партнёров.

3.5. Использование бактерий для семенного проращивания орхидей

Репродуктивная биология орхидных привлекает значительное внимание исследователей по всему миру, в том числе, для изучения особенностей формирования зародыша и будущих семян с целью успешного семенного размножения в искусственных условиях для сохранения биологического разнообразия этих растений, поддержания их численности и возрождения популяций в природе. Известно, что семена *Dendrobium*-типа обычно продолговатые, от светло-желтого до желто-коричневого цвета, имеют длину 450-550 мкм (рис. 102). На примере *D. nobile* нами было показано, что завязь плода является

нижней, одногнездной (паракарпной). На поперечном срезе завязи неопыленного цветка можно увидеть по три стерильных и три фертильных створки (рис. 103). На фертильных створках присутствует область плаценты со слабо развитыми примордиями семязачатков, состоящими из достаточно небольшого числа клеток. Плаценты образованы сросшимися краями соседних плодолистиков и имеют двулопастные плацентарные гребни (Корчагина, 1994). Поверхность семян происходит из внешнего слоя наружного интегумента, клетки семенной оболочки продолговатые. Поперечные антиклинальные клеточные стенки изогнуты и имеют округлые торцы, а продольные антиклинальные клеточные стенки клеток внешнего слоя наружного интегумента после потери протопластов сближаются, а их стенки образуют выраженные гребни. Клеточная стенка семян разрушается в процессе прорастания, когда эмбрион увеличивается в размерах с последующим переходом в стадию образования портокорма (рис. 103).

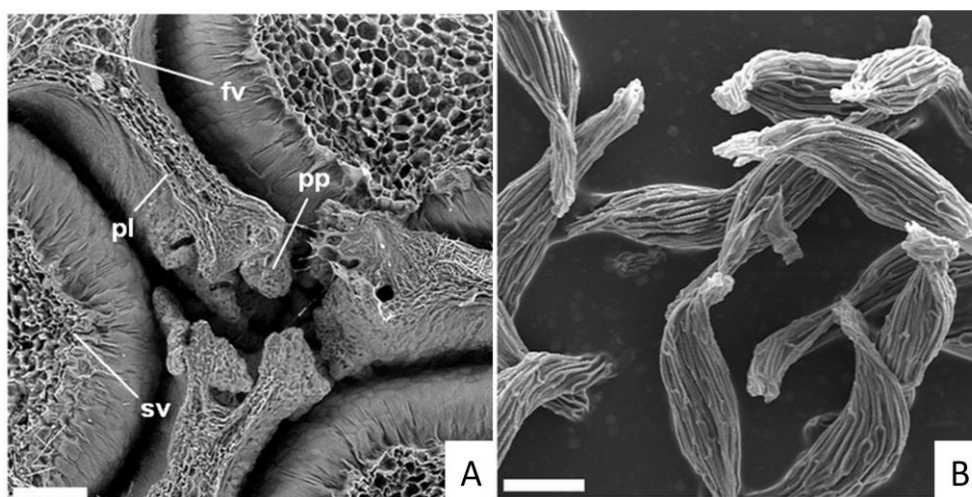


Рисунок 102. Микрофотографии семян и завязи *Dendrobium nobile*: А - неопылённая одногнёздная завязь после раскрытия цветка; В – внешний вид семян с продольными гребнями. Сокращения: fv, фертильные створки; pl - плацентарные гребни; pp, – примордии семязачатков; sv – стерильные створки. Шкала соответствует 100 µm. СЭМ (с изменениями по Kolomeitseva et al., 2020).

Полученные нами данные показывают, что последовательность клеточных делений зародыша *D. nobile* от зиготы до стадии октантов мало отличается от тех видов орхидей, зародыши которых имеют одноклеточный суспензор, например, *Dienia ophrydis* из трибы Malaxideae (Kolomeitseva et al., 2017). Плоды со зрелыми семенами у *D. nobile* вскрываются через год после опыления. При этом в эмбриогенезе имеется довольно продолжительный период (от 3 до 6 месяцев после опыления), когда у одного и того же плода можно наблюдать семязачатки на разных стадиях развития – от содержащих зародыши на стадии квадрантов до многоклеточных зародышей внутри хорошо сформированных оболочек семени.

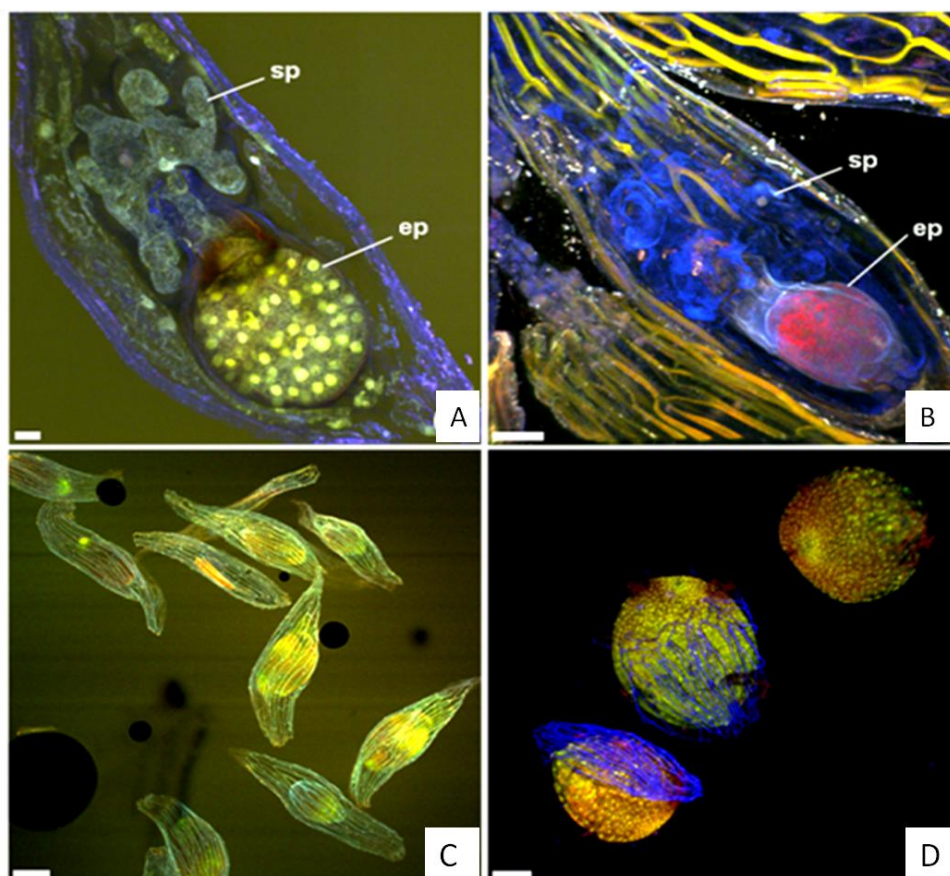


Рисунок 103. Формирование зрелого зародыша и прорастание семян. А –многоклеточный зародыш с хорошо развитым лопастным суспензором. Внутренний слой наружного интегумента еще не разрушен (окрашивание с помощью флуоресцеин диацетата); В – многоклеточный зародыш с лопастным суспензором, оболочка зародыша (мантия) имеет синюю флуоресценцию. Внутренний слой наружного интегумента отсутствует. С - D - Шкала соответствует: 10 μm (А), 100 μm (В-Д). СЭМ (с изменениями по по Kolomeitseva et al., 2020).

Последующие 6 месяцев занимает созревание, при котором отставшие в развитии зародыши продолжают развитие до глобулярной стадии и элиминации суспензора и всех интегументов, кроме наружного слоя наружного интегумента, преобразующегося затем в однослойную семенную оболочку. Разрушение семенной оболочки происходит при прорастании, когда многоклеточный зародыш набухает и преобразуется в протокорм (рис. 103). Явление сокращения числа ядер в зародышевых мешках у орхидей отмечено и другими исследователями (Abe, 1976; Arekal, Karanth, 1981; Law and Yeung, 1993; Shamrov and Anisimova, 2003). Важным отличием орхидных является отсутствие у их зрелых семян эндосперма – представляющего собой запасную ткань и характерного для всех других семян растений. Короткоживущий эндосперм орхидей обсуждали и ранее (Поддубная-Арнольди, 1958; Shamrov, 2008). У большинства исследованных видов орхидей из подсемейства Epidendroideae (к которому относятся виды *Dendrobium*) эндосперм состоит всего из 2-3 ядер. Отсутствие эндосперма не позволяет прорасти семенам орхидей без

участия микоризообразующего гриба; его отсутствие компенсируется в условиях *in vitro* сложными питательными средами, содержащими витамины, факторы роста, а зачастую, питательные вещества неопределенного состава, такие как кокосовое молоко, банановые и томатные соки, гидролизаты растительного и грибного происхождения.

Для исследования фундаментальных и прикладных аспектов при изучении новых подходов к семенному размножению орхидей *in vitro* с использованием PRPB штаммов, которые могли бы способствовать прорастанию семян орхидей, лишённых эндосперма, нами были впервые изучены стратегии взаимодействия рост-стимулирующих бактерий с семенами и проростками орхидей. Для этого были исследованы особенности распространения и локализации и изучено влияние ассоциативных ризобактерий на рост и развитие растений. Особое внимание было уделено изучению вопросов специфичности во взаимодействии партнёров. Известно, что подобная узкая специализация негативным образом влияет и сужает применение микоризообразующих штаммов грибов при симбиотическом проращивании семян орхидей, не позволяя сделать этот подход универсальным и применимым к различным видам этого обширного семейства. Некоторые культуры ризобактерий были изучены нами в динамике, в том числе после их длительного хранения, для определения стабильности сохранения изолятами своих рост-стимулирующих свойств, что позволит использовать высокоэффективные штаммы в течение длительного времени.

Известно, что резидентные штаммы RGPB значительно стимулируют образование корней, наращивание вегетативной массы и продуктивность многих сельскохозяйственных растений (Noel et al. 1996; Yasmin et al., 2004; Khalid et al., 2004; Kamilova et al., 2006; Mehnaz and Lazarovits, 2006), что используют в агро- и биотехнологии растений (Цавкелова и др., 2006а; Ahemad and Kibret, 2014). В настоящее время появляется всё больше работ, посвященных использованию различных видов и штаммов рост-стимулирующих бактерий для увеличения урожайности, повышения толерантности и приспособляемости сельскохозяйственных растений в условиях активного земледелия. Первая попытка бактеризации семян орхидей была предпринята еще в 1922 Л. Кнудсоном (Knudson, 1922). Он показал, что *Bacillus radicola* (*Rhizobium leguminosarum*), первоначально выделенная из люцерны, улучшала прорастание видов *Epidendron* и *Laelia-Cattleya*. Затем, в 1990-х годах XX века была изучена возможность совместного использования бактериальных штаммов *Pseudomonas putida*, *Bacillus cereus*, *B. sphaericus*, и *Xanthomonas maltophilia* с микоризообразующим грибом для симбиотического проращивания семян орхидеи *Pterostylis vittata* (Wilkinson et al., 1989,

1994a,b). Нам впервые удалось показать возможность использования резидентных штаммов ассоциативных ризобактерий, выделенных с корней орхидей, для их семенного размножения *in vitro* (Цавкелова, 2003; Tsavkelova et al, 2007b). Примечательно, что прорастание орхидей с используемыми PGPB штаммами происходит без участия гриба-микоризообразователя, а также без дополнительного внесения стимуляторов роста (ауксинов, цитокининов, гиббереллинов), что является обязательным условием при *in vitro* семенном проращивании орхидей.

Для определения способности резидентных ассоциативных бактерий стимулировать прорастание семян орхидеи-хозяина были первоначально отобраны культуры *Sphingomonas* sp., *Mycobacterium* sp. и *Rhizobium* sp., выделенные исходно с корней эпифитного *Dendrobium moschatum*. Семена этого растения культивировали с выбранными PGPB изолятами на модифицированной среде Кнудсона-С (Tsavkelova et al., 2007b). Результаты эксперимента представлены в таблице 40. Однако среди отобранных нами культур известная фитосимбионтная бактерия, *Rhizobium* sp., не способствовала прорастанию семян, так как обильная внеклеточная слизь (экзополисахаридный матрикс), который образуют эти бактерии на средах, богатых углеводами, полностью покрывала мельчайшие семена орхидей слоем около 3 мм толщиной, предотвращающим циркуляцию воздуха, в результате чего семена не могли развиваться. В отличие от ризобиума, две другие культуры, наоборот, проявили значительный рост-стимулирующий эффект, наблюдаемый через 1,5 месяца культивирования, когда фотосинтетическая активность проростков (протокормов) может быть четко прослежена. Так, после 100 сут культивирования с культурой *Sphingomonas* sp. все проросшие семена имели 1-2 развитых листа, дополнительные корни и размер около $5 \pm 0,2$ мм. Бактеризация семян культурой *Mycobacterium* sp. также способствовала прорастанию семян, в результате чего проростки размером $2 \pm 0,15$ мм имели развитые ризоиды и сформированный апекс (таблица 40). Дальнейшее развитие наблюдали только в симбиотической культуре с культурой *Sphingomonas*, где продолжался рост протокормов, листья оставались интенсивно зелеными и было отмечено формирование нового (третьего) листа. В целом, использование культур бактерий способствовало прорастанию 1,2% семян в ко-культуре с *Mycobacterium* sp. и 10,4% семян, культивируемых совместно с культурой *Sphingomonas* sp. Примечательно, что ни в одной из контрольных повторностей (без инокуляции бактериями) семена не проросли вообще (0%).

Таблица 40. Влияние PGPB штаммов на прорастание семян орхидеи *D. moschatum in vitro* на модифицированной среде Кнудсон-С (с изменениями по Цавкелова, 2003; Tsavkelova et al., 2007b)

Время инкубации (сутки)	Контроль (асимбиотическая культура)	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>Sphingomonas</i> sp.
60	0 ^b	1	1
70	0	2+3	2 + 3
82	0	3+4	4
100	0	4	5
120	0	4	5
Проросшие семена (%)	0	1,2 ± 0,2	10,4 ± 0,9

^a Результаты представлены средними значениями из пяти повторностей ± стандартная ошибка. Стадии прорастания семян обозначены как: ^b 0 – непроросшие семена, семенная кожура интактная; 1 – набухшие семена с активным фотосинтезом; 2 – появление апекса; 3 – массивное набухание протокорма, развитие ризоидов; 4 – появление первого листовидного органа; 5 – развитие корней и последующих листьев.

После опубликования наших первых работ по использованию ризобактерий и получения патента на использование бактериального штамма в симбиотическом проращивании орхидей (Коломейцева, Цавкелова и др., 2002; Tsavkeloma et al., 2007b) стало появляться всё больше исследований, касающихся изучения разнообразия и влияния бактерий на развитие тропических орхидей (Galdiano Jr. et al., 2011; Faria et al., 2013; Yang et al., 2014) и орхидей, произрастающих в умеренном климате (Shekhovtsova et al., 2013). Так, Faria с соавт. (2013) показали, что несколько штаммов *Paenibacillus* стимулировали развитие и рост проростков *Cattleya loddigesii* Lindl. Штаммы *Bacillus* sp. и *Enterobacter* sp. улучшали акклиматизацию и повышали выживание другого эпифита, *Cattleya walkeriana* Gardn., при посадке растений в субстрат (Galdiano Jr. et al., 2011). Все вышеописанные исследования, однако, проводили на молодых растениях, которые бактеризовали культурами микроорганизмов, тогда как мы сосредоточили внимание на исследовании ранних этапов развития и прорастания семян орхидей. Особенности биологии и развития орхидей сокращают выбор возможных к использованию штаммов PGPB (как это было показано нами на примере культуры *Rhizobium* sp., которую активно используют для других сельскохозяйственных растений).

Следующей целью наших исследований было выяснить, существует ли какая-либо специфичность в выборе бактериальных партнёров между растениями, не резидентными для выделенных штаммов, и смогут ли штаммы, изолированные с одного растения стимулировать прорастание других видов орхидей. Для исследования отобрали несколько ризобактерий, выделенных с корней *Dendrobium moschatum*, и использовали их для бакетризации другого вида, – *D. nobile*. Все изоляты были отобраны по принципу их

способности к биосинтезу ИУК и положительному влиянию в биотестах на стимуляцию корнеобразования черенков фасоли. *D. nobile* имеет, как и все орхидные, длительный период прорастания до этапа формирования ювенильного растения (рис. 104).

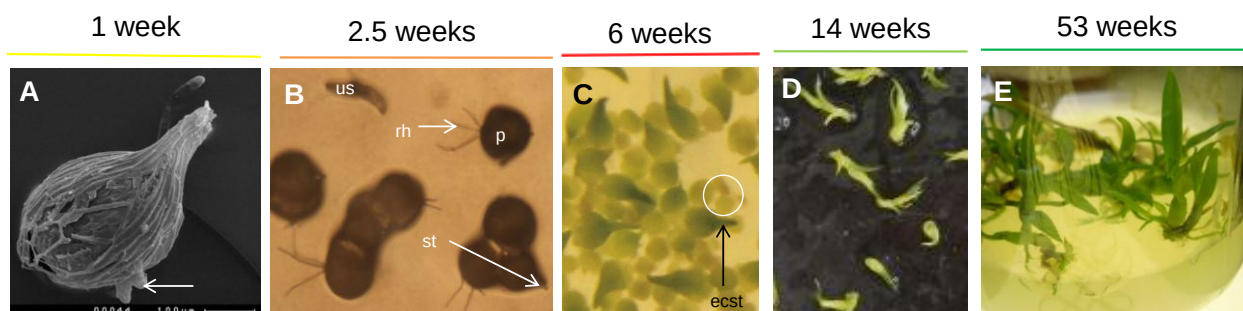


Рисунок 104. Стадии семенного развития и прорастания *Dendrobium nobile* Lindl. В условиях культивирования на среде МС (Мурасиге-Скуга) после стерилизации (15 мин в 10% средстве "Белизна", затем отмывали в стерильной дистиллированной воде). Семена инкубировали в течение 2х недель в темноте, затем помещали в условия с 12 ч светопериодом при температуре 25°C. После 1 недели отмечено появление ризоидов и разрыв семенной кожуры (А). К 2.5 неделям культивирования протокормы (р) имеют хорошо развитые ризоиды (rh) и различимый апекс (st); некоторые семена остались непроросшими (us) (В). К 6 неделям культивирования семена формируют фотосинтетически-активные протокормы с вытянутым зачатком первого листа (ecst), но другие протокормы остаются менее развитыми (в кружке) (С). К 14 неделям, протокормы имеют сформированные листья (D). Ювенильные растения можно получить, начиная с 6 месяцев после прорастания (E) (Источник: Teixeira da Silva et al., 2015a).

Для бактеризации семян была взята среда МС (Мурасиге-Скуга), не содержащая каких-либо стимуляторов роста, но с добавленным L-триптофана для индукции биосинтеза микробной ИУК. Поскольку в биотесте с черенками фасоли культура энтеробактерии проявила негативное влияние на растение, то её в эксперименте не исследовали. Также не использовали очевидно олиготрофные культуры *Caulobacter* sp. и *Roseomonas* sp., так как на среде МС они образовывали недостаточно биомассы и их рост был крайне скудным. Поэтому в качестве потенциальных PGPB штаммов были отобраны *Agrococcus* sp., *Streptomyces* sp., *Azospirillum* sp. и *Sphingomonas* sp. из вновь выделенных культур, а также *Mycobacterium* sp. и *Bacillus pumilus*. В результате исследования было показано, что культура *Azospirillum* sp. (как и *Rhizobium* sp.) образует чрезмерное количество полисахаридной внеклеточной слизи, препятствующей развитию семян, а изолят *Streptomyces* sp. вызывал негативное влияние на прорастание семян (рис. 105).

Значительный рост-стимулирующий эффект был обнаружен при бактеризации эндофитными культурами *Sphingomonas* и *Agrococcus* (таблица 41, рис. 105). Фотосинтетическую активность протокормов можно было наблюдать уже через 2,5 недели после посева. В течение 9 недель инкубации все семена, обработанные этими бактериями, имели ризоиды и 1-2 хорошо развитых листа, тогда как контрольные

растения обладали только одним различимым листом. Самый высокий процент проросших семян (94%) был обнаружен в ко-культуре с *Agrococcus* sp. (табл. 41), представители этого рода ранее не были описаны как РГРВ. Другая бактерия, *Sphingomonas* sp., способствовала прорастанию 92% семян и их переходу от стадии разбухшего протокорма к следующим этапам развития проростка. Примечательно, что эти РГРВ штаммы были выделены именно как эндофиты корней.

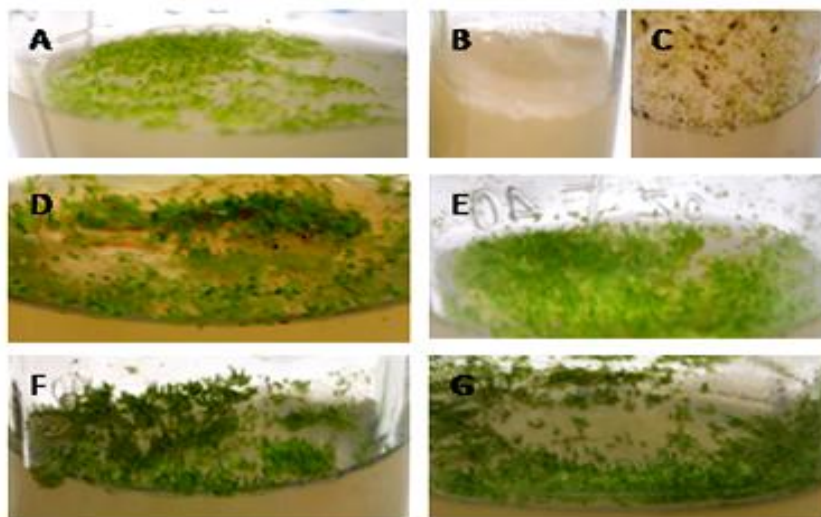


Рисунок 105. Бактеризация семян *Dendrobium nobile* – семена через 2,5 месяца развития: контроль (А) и в ко-культурах с *Azospirillum* sp. (В), *Streptomyces* sp. (С), *Mycobacterium* sp. (D), *Bacillus pumilus* (Е), *Agrococcus* sp. (F) и *Sphingomonas* sp. (G). Активно фотосинтезирующие потокармы и проростки в вариантах А, D-G. Ингибиторный эффект на развитие проростков отмечен в культуре *Streptomyces* sp. (С), отсутствие прорастания семян отмечено с культурой *Azospirillum* sp. (В) из-за образования обильного полисахаридного матрикса, формирующего плотную слизь толщиной 3-4 мм (по Tsavkelova et al., 2016).

Культуры *Mycobacterium* sp. и *B. pumilus* также способствовали прорастанию семян *D. nobile*, подтверждая устойчивую эффективность этих микроорганизмов, сохраняющих способность стимулировать рост и развитие семян орхидей *in vitro* (Цавкелова, 2003; Tsavkelova et al., 2007a). Оба штамма были исходно выделены из других орхидей (*D. moschatum* и *D. leonis*, соответственно). В наших первых экспериментах культура *Mycobacterium* sp. способствовала прорастанию 1,2% семян *D. moschatum* в условиях культивирования на модифицированной среде Кнудсон-С без стимуляторов роста и без дополнительного внесения триптофана (Tsavkelova et al., 2007b). В условиях использования более сложной (комплексной) среды MS, содержащей, в том числе, витамины, а также экзогенный триптофан для индукции биосинтеза ИУК ризобактериями, культура *Mycobacterium* sp. способствовала прорастанию 12% семян *Dendrobium nobile*. В ко-культуре семян с *Bacillus pumilus* проросло на 14% больше семян *D. nobile*, чем в контроле (табл. 41).

Таблица 41. Влияние PGPB штаммов на прорастание семян орхидеи *Dendrobium nobile in vitro* на среде МС с триптофаном (с изменениями по Tsavkelova et al., 2016).

Тест-вариант	3 недели	6 недель	9 недель	Проросшие семена (%) ^b
Контроль (семена+вода)	1+2 ^a	2	3	76±3.8
<i>Sphingomonas</i> sp.	2	2	3+4	92±4.2
<i>Mycobacterium</i> sp.	2	2+3	3+4	88±4.5
<i>Agrococcus</i> sp.	1+2	2+3	3+4	94±2.3
<i>Bacillus pumilus</i>	2	2+3	3+4	90±3.5
<i>Azospirillum</i> sp.	0	0	0	0
<i>Streptomyces</i> sp.	0+1	0+1+2	0+1+2	≤50 ^c

^a - Стадии прорастания семян и развития протокормов: 0— непроросшие семена, семенная кожура интактная; 1— раздутые протокормы, активный фотосинтез, появление апекса; 2 — массивное набухание протокорма, развитие ризоидов; 3—появление первого листовидного органа; 4— развитие корней и последующих листьев.

^b - Количество проросших семян (фотосинтетически активных) подсчитывалось через 2 месяца культивирования. Результаты представлены средним из 4-6 повторностей ± стандартное отклонение.

^c - Процент проросших семян в ко-культуре со *Streptomyces* sp. является приблизительной величиной, так как многие из проросших семян и развитых проростков затем погибли.

В результате проведённого исследования можно предположить, что не существует строгой специфичности в проявлении фитосимбионтного действия бактериальных партнёров по отношению к разным представителям орхидей. Однако при использовании бактериализации в семенном размножении орхидей *in vitro* необходимо учитывать особенности биологии орхидей, мельчайший размер их семян, отсутствие в них эндосперма и длительный период прорастания и развития до стадии формирования ювенильного растения. В связи с этим, например, широко известные PGPB штаммы, принадлежащие к родам *Rhizobium* и *Azospirillum*, оказались бесполезными из-за чрезмерного образования ими экзополисахаридного матрикса на богатых углеводами средах, что сужает возможность их использования, несмотря на их рост-стимулирующие свойства. С другой стороны, олиготрофные изоляты PGPB также невозможно использовать из-за достаточно высокой концентрации углерод-содержащих веществ, необходимых для прорастания растений.

Для наблюдения за локализацией, распространением и взаимодействием бактерий с семенами орхидей были использованы методы сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии. Было обнаружено, что PGPB штаммы ризобактерий активно заселяют поверхность семенной кожуры, предпочитая колонизировать углубления и складки на морщинистой и ребристой поверхности семян (рис. 106 А-С). В контрольных

образцах не было обнаружено бактерий (рис. 106 G), в то время как все инокулированные семена были покрыты бактериями, образующими колонии и новые субпопуляции на ризоидах. Важную роль в процессе колонизации играет внеклеточный экзополисахаридный матрикс (ЭМ), выделяемый бактериальными клетками, который способствует образованию бактериальных агломератов и кластеров, особенно в поверхностных бороздках. В то же время вместе с бактериальными кластерами, объединенными ЭМ, были отмечены и отдельные клетки, занимающие "новые территории" для формирования новых колоний (рис. 106 A-D). Наиболее отчетливо ЭМ, объединяющий клетки, виден в культуре с *Sphingomonas* sp. (рис. 106 C).

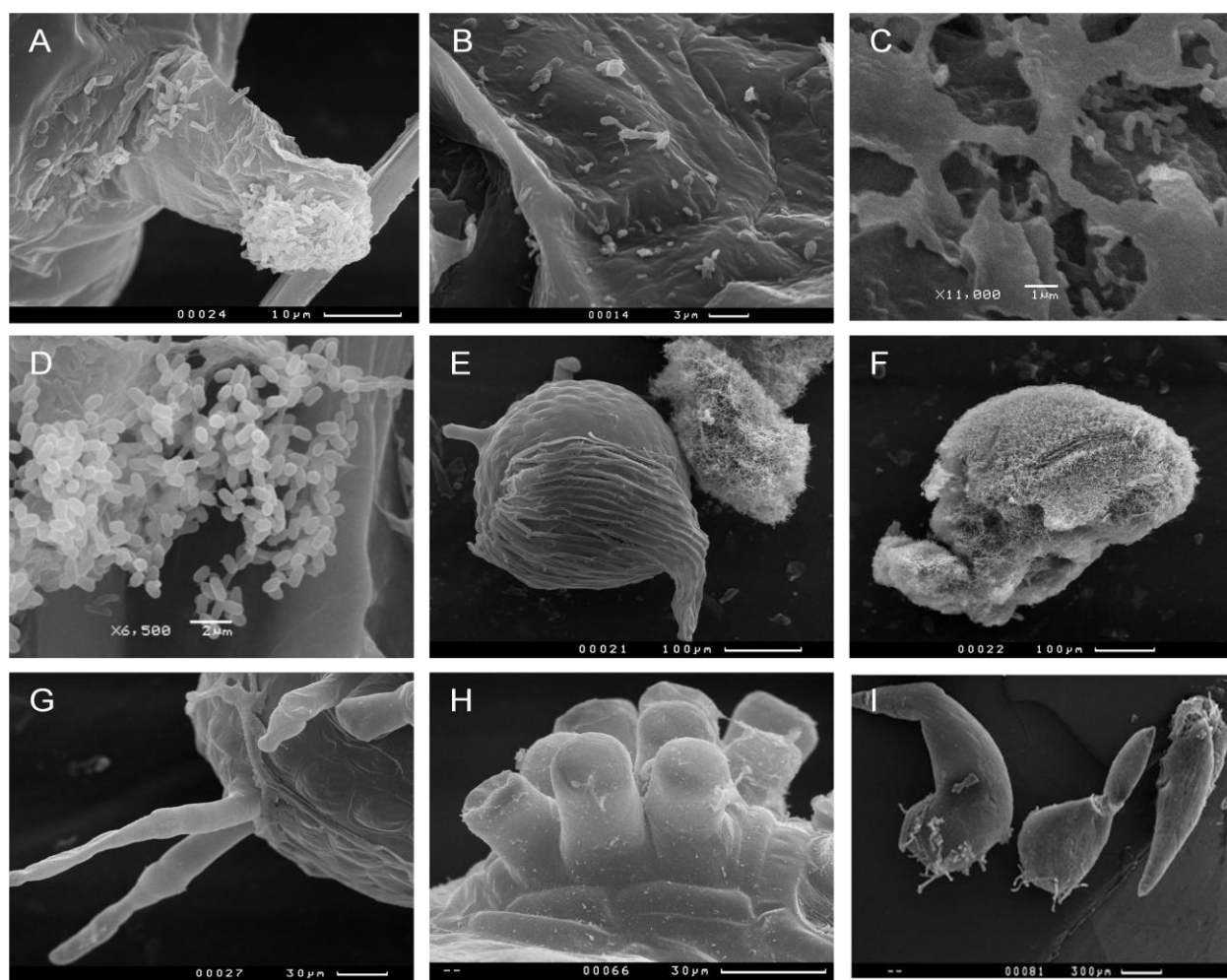


Рисунок 106. Микрофотографии семян *Dendrobium nobile*, инокулированных ризобактериями (4-8 недель после инокуляции): А - *Mycobacterium* sp., активно колонизирует появляющийся ризоид (шкала - 10 мкм), В - отдельные клетки и микроколонии *Agrococcus* sp. на ребристой поверхности (шкала - 3 мкм); С - кластеры и отдельные клетки *Sphingomonas* sp., покрытые экзополисахаридным матриксом (шкала - 1 мкм); D - *Bacillus pumilus* вегетативные клетки и споры на поверхности семян (шкала - 2 мкм); Е, F - колония *Streptomyces* sp. рядом с прорастающим живым семенем (Е) и полностью его покрывающая (F), шкала - 100мкм; G, H - контроль (необработанные бактериями семена) семена с ризоидами (G,H - шкала 30 мкм); появление первого листа (8 недель), шкала - 30 мкм. СЭМ. (Tsavkelova et al., 2016).

В отличие от стимулирующих рост PGPR штаммов, культура *Streptomyces* sp. вызвала отрицательное влияние на проростки и практически не вступала во взаимодействие с прорастающими семенами (рис. 106 E), – по мере появления ризоидов и листовидного органа, мицелий стрептомицета полностью обрастал проросток, постепенно угнетая его рост (рис. 106 F).

Клетки PGPB штамма *Mycobacterium* сразу колонизировали ризоиды (рис. 106 A), а затем заселяли сформированные корни. Вместе с вегетативными клетками в культуре *Bacillus pumilus* было отмечено большое количество спор (рис. 106 D).

На примере проростков, обработанных культурами *Mycobacterium* и *Sphingomonas* sp. (рис. 107 A-C), было также обнаружено, что бактерии проникают внутрь семенной оболочки (рис. 107 A, B) и в образующийся веламен корней у 6-месячных проростков (рис. 107 B). Наблюдения с помощью ТСМ подтвердили предпочтительную эндофитную локализацию ранее выделенных из ризопланы *D. moschatum* клеток *Mycobacterium* sp. (рис. 108 A) в виде отдельных клеток или микроколоний. Бактерии располагаются внутри апопласта клеток коровой паренхимы проростков *Dendrobium nobile*, активно колонизируя пространство между ними (рис. 108 B). В пластидах проростков были отмечены большие крахмальные зерна и осмофильные (липидные) глобулы (рис. 108 C).

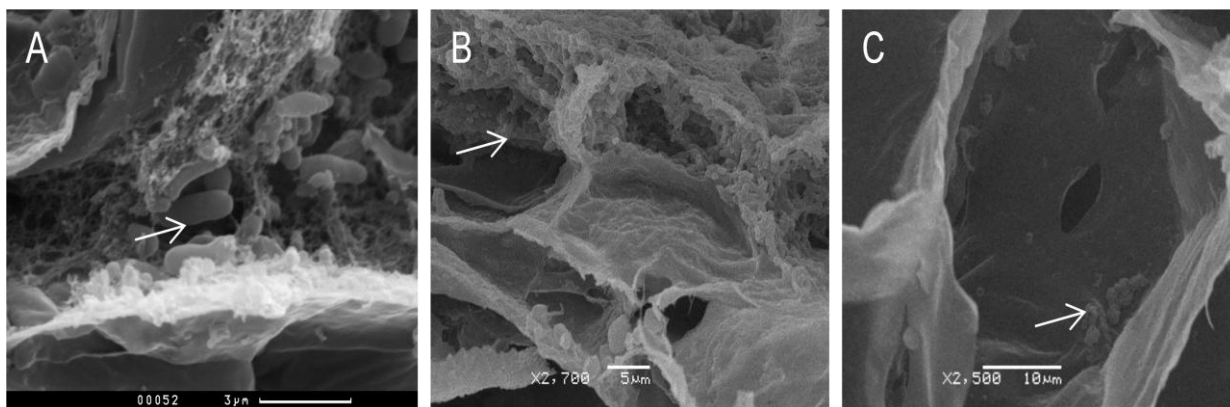


Рисунок 107. СЭМ микрофотографии поперечных срезов проростков *Dendrobium nobile*. A, B - *Mycobacterium* sp. на поверхности и внутри семенной оболочки у 9-ти недельных проростков; C - *Sphingomonas* sp. внутри веламена корней 6-ти месячных ювенильных растений; округлые перфорации являются характерными для веламена. Бактериальные клетки отмечены стрелками (Tsavkelova et al., 2016). Шкала - 3 мкм (A), 5 мкм (B) и 10 мкм (C).

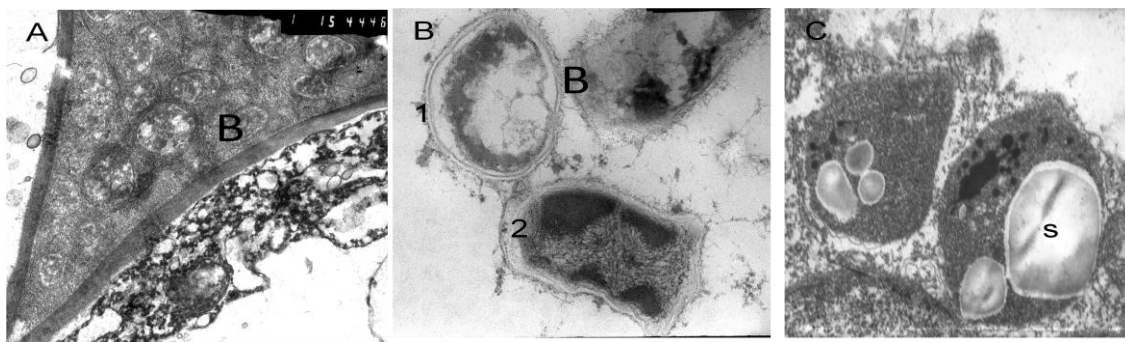


Рисунок 108. ТЭМ микрофотографии срезов корней 6-ти месячных проростков *Dendrobium nobile* А - *Mycobacterium* sp., колонизирующие пространство между клетками коровой паренхимы; В - бактериальные клетки: поперечный (1) и продольный срезы (2); С - пластиды с крахмальными зёрнами (s) и темными осмофильными гранулами (Tsavkelova et al., 2016).

Поверхность различных тропических растений является благоприятной средой обитания для её колонизации бактериями (Baldotto and Olivares, 2008). Нами было показано, что не только бактерии, заселяющие ризоплану *D. moschatum*, но и эндофитные бактерии, которые по одному из определений (Ryan et al., 2008) заселяют внутренние ткани растений без проявления каких-либо негативных эффектов на его рост и развитие, являются активными продуцентами ауксинов и среди них есть PGPB штаммы, способные стимулировать прорастание и поддерживать развитие проростков в ко-культуре. Одним из подходов к селекции таких штаммов мы использовали именно способность бактерий образовывать ИУК и установление биологической (положительной) активности этого соединения. Так, ассоциативные бактерии, заселяющие ризоплану *D. moschatum*, различаются по уровню биосинтеза ауксинов от 1,5–5 мкг/мл до 20–50 мкг/мл, особенно, при дополнительной индукции экзогенным триптофаном. Из литературных данных известно, что продуценты ИУК, используемые для улучшения роста растений, образуют ИУК в области от 5–10 до 200 мкг/мл (с добавлением к среде триптофана; Khalid et al. 2004; Shahab et al. 2009; Habibi et al., 2014). Хотя триптофан увеличивал уровень выхода ауксинов, его влияние вариабельно, в зависимости от вида и штамма микроорганизма, используемого типа среды (органической или синтетической/полусинтетической). То есть, подбор оптимальных условий для увеличения синтеза ИУК у выбранного продуцента является скорее видо- и даже штаммоспецифичным.

Известно, что биосинтез ИУК у *Pseudomonas putida* UB1 возрастал, когда в среду добавляли L-Trp (200 мкг/мл), а среда содержала 0,5% сахарозы (Bharucha and Patel, 2008), тогда как для других микроорганизмов – например, азотфиксирующих бактерий, наиболее оптимальным оказалось добавление дрожжевого экстракта и маннитола, а также внесение 300 мкг/мл L-Trp (Shokri and Emtiazi, 2010). Другие авторы указывают, что оптимальной

средой для *Pantoea agglomerans* была среда МПБ (8 г/л мясного экстракта) и 100 мкг/мл L-Trp (Apine and Jadhav, 2011).

Проверка биологической активности с использованием биотестов с черенками фасоли, предложенная нами, позволяет не только выявить наличие ИУК в КЖ бактерий и определить её влияние на ризогенез растений, но также обнаружить патогенные микроорганизмы, оказывающие отрицательное влияние на развитие растений, как например, культуру *Enterobacter* sp., провоцирующую развитие гнили у черенков фасоли. На примере растений садовой земляники авторами (De Melo Pereira et al., 2012) было показано, что среди эндофитных бактерий, принадлежащих к роду *Enterobacter*, встречались как PGPB штаммы, которые увеличивали рост растений, так и штаммы, бактериализация которыми (например, *E. ludwigii*), наоборот, приводила к ингибирующему влиянию на рост растений.

В наших экспериментах наилучшими в отношении стимуляции роста семян орхидей в культуре *in vitro* оказались эндофитные штаммы *Sphingomonas* sp. и *Agrococcus* sp. Хотя встречается информация о наличии *Agrococcus versicolor* в филлосфере растений картофеля (Behrendt et al., 2008), мы впервые показали активность представителей *Agrococcus* sp., как активных PGPB, образующих ИУК и устанавливающих тесное фитосимбиотическое взаимодействие с растением хозяином, способствуя более быстрому прорастанию семян орхидей и их лучшему развитию. Представители рода *Sphingomonas*, наоборот, являются к настоящему моменту признанными эндофитами и PGPB, что было показано на примере растений кукурузы (McInroy and Kloepper, 1995), черного тополя, ивы (Doty et al., 2009), риса (Videira et al., 2009) и томатов (Khan et al., 2014). Помимо способности к фиксации азота, что нами также было продемонстрировано при выделении ассоциативных бактерий на безазотистой среде, в результате которого были получены чистые культуры сфингомонад (данные не представлены), представители рода *Sphingomonas* синтезируют сидерофоры (Sessitsch et al., 2004), и способны к синтезу гиббереллинов и ИУК (Khan et al., 2014).

В наших экспериментах также было выяснено, что культура стрептомицета, *Streptomyces* sp., наоборот, подавляла прорастание орхидей и вызывала угнетение роста и гибель проростков. Одной из возможных причин этого явления может быть образование стрептомицетом антибиотиков, которые известны своими фитотоксическими эффектами, что отмечено при замедлении роста корней (Liu et al., 2009), а также нарушении фотосинтеза в листьях и снижении содержания в клетке фотосинтетических пигментов (Opris, et al., 2013; Wang et al., 2015).

Под *Azospirillum* считается одним из самых известных представителей группы PGPB (Cassán et al., 2014) и широко применяется в биотехнологии культивирования и бактеризации различных сельскохозяйственных культур (Mehnaz and Lazarovits, 2006); *A. amazonense* был также обнаружен на корнях нескольких культивируемых бразильских орхидей – *Dendrobium fimbriatum* и *D. nobile*, *Vanda tricolor* и *Oncidium varicosum* (Lange and Moreira, 2002). Однако в условиях *in vitro* семенного размножения орхидей, когда используют питательные среды с высоким содержанием углеводов, эта культура, как и *Rhizobium* sp., непригодна для использования из-за образования большого количества внеклеточной слизи.

В то же время у других культур, менее склонных к образованию обильного внеклеточного матрикса, он (ЭПС), тем не менее, играет важную роль в закреплении клеток на поверхности семян, ризоидов или корней, структурируя их популяции, а также защищая бактериальные клетки от УФ и воздействия других абиотических факторов, а также высыхания (Олескин и др., 2000; Morris and Monier, 2003). Биопленки, которые также формируются за счет внеклеточных полисахаридов, помогают ризобактериям, особенно неспорообразующих видам, успешно колонизировать корни растений (Rinaudi and Giordano, 2010). Растительные поли- и олигосахариды, составляющие основу клеточных стенок, в свою очередь, могут индуцировать образование биопленок у ассоциированных с растениями бактерий, хотя степень микробной колонизации может варьировать в зависимости от растения-хозяина, что было показано на примере *Bacillus* при взаимодействии этой культуры с растениями томата и *Arabidopsis* (Beauregard et al., 2013).

Используя результаты сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии мы показали, что PGPB штаммы *Mycobacterium* sp., *Agrococcus* sp., *Sphingomonas* sp. и *Bacillus pumilus* активно колонизируют не только поверхность семян, где они формируют колонии, но и проникают внутрь тканей растений как эндофиты. Наши результаты согласуются с результатами Ryan et al. (2008), которые указывают на тот факт, что успешная колонизация эндофитов включает совместимого растения-хозяина, а бактерии могут заселять поверхность растений как одиночные клетки, микроколонии или даже биопленки (Baldotto and Olivares, 2008). Эндофиты могут проникать в корни через трещины и надломы в местах появления корней, затем колонизируя межклеточные пространства, аэренхиму и клетки коровой паренхимы, что было показано на примере PGPB штамма риса, *Herbaspirillum seropedicae* Z67 (James et al., 2002).

Прорастание семян орхидей отличается от всех других известных растений: семена орхидных способны на первой стадии своего развития набухать из-за минимального поглощения воды и оптимальных условий освещения и температуры даже без наличия микоризообразующего гриба, но для дальнейшего развития протокорма необходимо обязательное симбиотическое взаимодействие с микобионтом или наличие экзогенных углеводов и питательных веществ, особенно в случае *in vitro* асимбиотического проращивания семян (Smith and Read, 2008). Стадии прорастания у представителей рода *Dendrobium* могут занять длительное время и в условиях *in vitro* составляют недели или даже месяцы до момента появления одного или нескольких настоящих корней (Teixeira da Silva, Tsavkelova et al., 2015a; b). Но уже после того, как семенная кожура лопается и начинают формироваться первые ризоиды на фотосинтезирующем протокорме, они становятся привлекательными для колонизации бактериальными клетками. Известно, что корневые экссудаты обычно содержат сахара, аминокислоты и органические кислоты в дополнение к ряду вторичных метаболитов (Kamilova et al., 2006; Broeckling et al. 2008). Однако, на данном этапе мы можем только предполагать аналогичное или схожее содержание в экссудатах, выделяемых микроскопическими ризоидами, которые имеют лишь около 30-50 мкм в длину, поскольку пока что нет возможности проанализировать и изучить состав соединений, которые входят в состав корневых выделений и являются аттрактантами для ассоциативных микроорганизмов у проростков орхидей.

Большинство ауксинов в зоне ризосфере имеют своё происхождение от триптофана, который также секретируется корнями растений и эффективно конвертируется в ИУК бактериями ризосферы (Kamilova et al., 2006). Корни растений чувствительны к колебаниям содержания ауксина: низкие количества ИУК (между 10^{-9} и 10^{-12} М) стимулируют рост первичных корней, тогда как более высокие концентрации ИУК могут, наоборот, ингибировать рост и корнеобразование (Meuwley and Pilet, 1991; Patten and Glick, 2002). Так, изоляты *Paenibacillus lentimorbus* и *P. macerans*, выделенные из меристемы орхидеи *Cymbidium eburneum*, способствовали росту *in vitro* микроклональных проростков другого вида орхидей – *Cattleya loddigesii*, образуя лишь 1,5-3,6 мкг/мл ИУК (Faria et al., 2013). Культуры *Enterobacter* sp. и *Bacillus* sp., изолированные с корней *Cattleya walkeriana*, синтезировали 18 и 32 мкг ИУК/мл, соответственно (Galdiano Jr. et al., 2011) и также способствовали росту и развитию проростков, а кроме того, их лучшей акклиматизации при пересадке в субстрат (Galdiano Jr. et al., 2011). В других работах (Yang et al., 2014) сообщается о бактеризации семян другого вида *Dendrobium*, *D. officinale*, культурой *Sphingomonas paucimobilis* ZJSH1, которая увеличивала длину и вес растений на 8,6% и на 7,5%, соответственно.

Полученные данные согласуются с нашими ранними результатами по бактериализации культурой *Bacillus pumilus* нескольких различных представителей орхидей на среде Кнудсон-С, принадлежащих к эпифитным родам *Dendrobium leonis*, *D. crumenatum* и *D. nobile*, а также к наземным – *Paphiopedilum barbatum*, *Ponthieva racemosa* и *Dactylorhiza fuchsii* (Коломейцева и др., 2002; Цавкелова, 2003). Эта бактериальная культура, исходно выделенная с *Dendrobium leonis*, также увеличивала всхожесть семян дендробиумов: в сравнении с контролем, число проросших семян составило 83,3%; 39% и 56,5% у *D. leonis*, *D. crumenatum* и *D. nobile*, тогда как в контроле – 20%, 9,5% и 8%, соответственно. У наземных орхидей проросло 8% семян у *P. barbatum*, 23% семян у *P. racemosa* и 3,5% семян у *D. fuchsii*. Без обработки в асимбиотической культуре семена вообще не проросли. Примечательно, что несмотря на эффективную конверсию триптофана в ауксин, уровень биосинтеза ИУК культурой *B. pumillus* в условиях опыта не превышал 9 мкг/мл (Коломейцева, Цавкелова и др., 2002).

Таким образом, мы показали, что нет очевидной строгой специфичности между орхидеей-хозяином и бактериальными партнерами RGPB штаммов. В отличие от микоризообразующих грибов орхидей, когда строгая специфичность между ними вынуждает использовать только один вид гриба по отношению к одному виду орхидей, использование бактериальных культур для стимуляции прорастания семян обеспечивает широкое применение RGPB штаммов, образующих ИУК, для семенного размножения орхидных, особенно в условиях *in vitro*. Более того, бактеризованные семена за счет налаживания микробно-растительных отношений не только имеют преимущества при прорастании, но и более стрессоустойчивы к влиянию ряда абиотических факторов, что повышает адаптационные возможности ювенильных растений при пересадке в субстрат, а также могут рассматриваться как необходимый этап в целях сохранения видового разнообразия редких и исчезающих видов этих растений при ре-интродукции популяций орхидей, выращенных *in vitro*, в природу. В то же время, отобранные изоляты бактерий должны удовлетворять некоторым минимальным требованиям: не образовывать чрезмерной биомассы и/или внеклеточного матрикса, а также быть активными в отношении триптофан-зависимого биосинтеза ИУК. Другие их свойства, такие как азотфиксация, солюбилизация фосфора или выделение антимикробных соединений не так значимы для первых этапов *in vitro* семенного развития орхидей.

3.5.1. Стратегия колонизации орхидей на примере *Klebsiella oxytoca* и *Pseudomonas fluorescens*

Для того чтобы исследовать способы взаимодействия ризобактерий не только с семенами, но и со взрослыми растениями, изучить локализацию и распространение бактерий в ризоплане субстратных и воздушных корней эпифитов, а также для оценки возможности использования RGPB, выделенных с других (не орхидных) растений, для бактеризации семян орхидей были использованы культуры *Klebsiella oxytoca* и *Pseudomonas fluorescens*.

Поскольку на предыдущем этапе работы нами было установлено, что растения не обладают строгой специфичностью в выборе бактериальных партнёров, то возможность использования известных RGPB штаммов, выделенных из иных источников, могла бы позволить сократить отчасти трудозатратный и длительный этап по выделению, идентификации и селекции изолятов с корней генеративно-зрелых орхидей. В качестве тест микроорганизмов были отобраны штаммы, выделенные ранее из ризосферы сельскохозяйственных овощей (*Klebsiella oxytoca*) и с корней пшеницы (*Pseudomonas fluorescens*). Оба имеют плазмиду с маркерным GFP геном, что позволяет отслеживать распределение микроорганизмов в тканях растения.

Уже после 30 мин после обработки корней *D. nobile* культурой *K. oxytoca* TSKhA-gfp, бактериальные клетки были обнаружены в субстратных и в воздушных корнях, концентрируясь, в основном, в веламене (рис. 109). Дальнейшая колонизация коровой паренхимы происходила, в том числе, за счет пропускных клеток экзодермы, облегчая их проникновение вовнутрь. Через 24 часа клетки *K. oxytoca* были обнаружены и в центральном цилиндре субстратных корней, тогда как в воздушных корнях бактерии оставались на уровне клеток паренхимы. Через неделю после обработки, микроорганизмы были отмечены внутри центрального цилиндра воздушных корней.

Поскольку бактериальные клетки *K. oxytoca* достигли центрального цилиндра, где располагаются сосудистые (проводящие) пучки, то для определения возможности продвижения и распространения бактерий в верхние части растений с током в продольном направлении по ксилеме, были исследованы образцы тканей растения на расстоянии 2-5 см выше области обработки. Однако, бактерии не были обнаружены ни в вышележащих областях воздушных корней, ни в основании ближайших листьев (рис. 110).

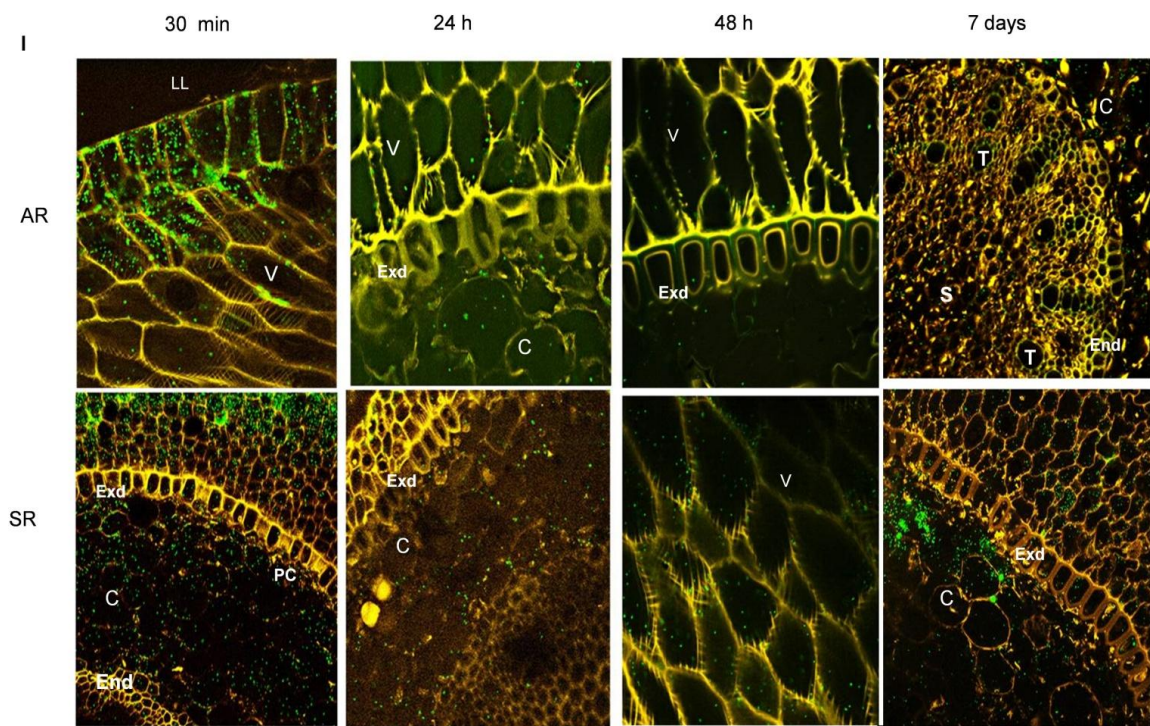


Рисунок 109. КЛСМ микрофотографии поперечных срезов воздушных (AR) и субстратных (SR) корней *D. nobile*, обработанных культурой *Klebsiella oxytoca* TSKhA-gfp (I), после 30 мин, 24 ч, 48 ч и 7 суток после инокуляции микроорганизмами. LL - limiting layer of the velamen (внешний слой веламена); V - velamen (веламен); Exd - exodermis (экзодерма); C - cortical parenchyma (коровая паренхима); PC - passage cells (пропускные клетки); End - endodermis (эндодерма); S - stele (центральный цилиндр); T - tracheids (трахеиды, пучки проводящих тканей). Увеличение – 200-400 (с изменениями по Pavlova et al., 2017).

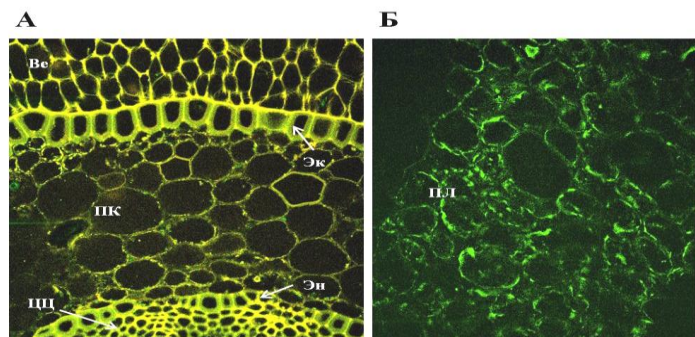


Рисунок 110. КЛСМ микрофотографии поперечных срезов воздушных корней (А) и основания листа (Б) *D. nobile*, обработанных культурой *Klebsiella oxytoca* TSKhA-gfp (I) через 14 суток (А, Б) после инокуляции микроорганизмами. Ве – веламен; Эк – экзодерма; ПК – паренхима коры; Эн – эндодерма; ЦЦ – центральный цилиндр; ПЛ – паренхима листа. Увеличение 200-400х.

Другая культура, *Pseudomonas fluorescens*, также активно заселяла поверхность и внутренние ткани корней растения. Через 30 минут после инкубации клетки были обнаружены в коровой паренхиме воздушных и субстратных корней, также проникая через многослойный веламен и экзодерму (рис. 111). Активной колонизации центрального цилиндра не происходило. По большей части, микроорганизмы заселяли веламен и

паренхиму корня, при этом колонизация воздушных корней проходила более активно, чем субстратных корней, что было также отчетливо видно через 7 сут после обработки.

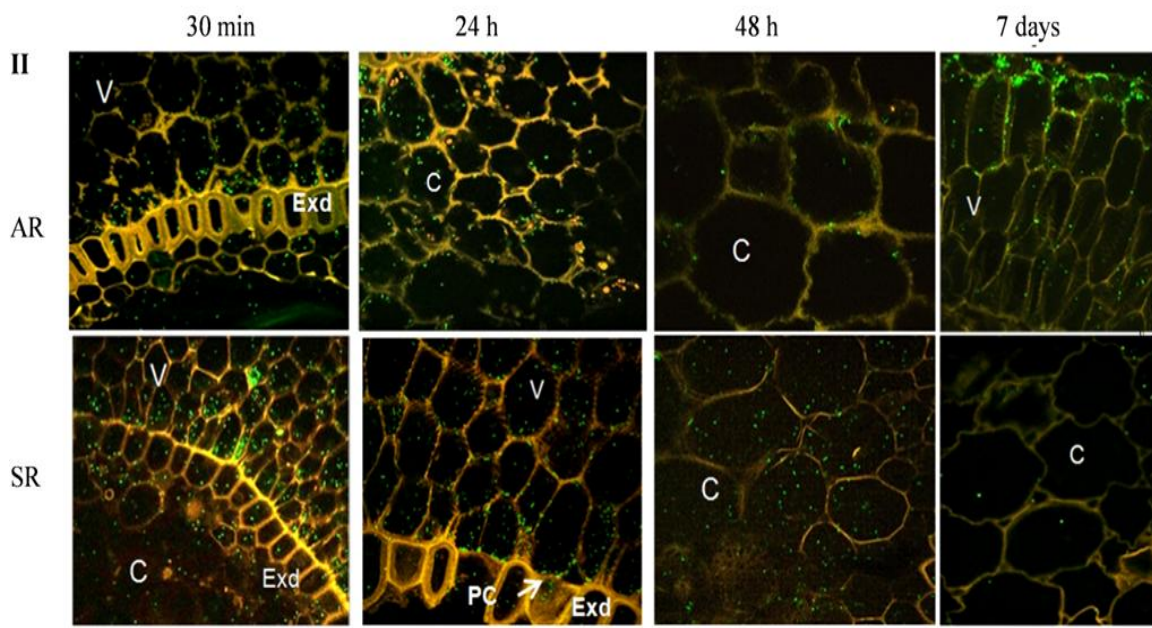


Рисунок 111. КЛСМ микрофотографии поперечных срезов воздушных (AR) и субстратных (SR) корней *D. nobile*, обработанных культурой *Pseudomonas fluorescens* 32-gfp (II), после 30 мин, 24 ч, 48 ч и 7 суток после инокуляции микроорганизмами. LL (limiting layer of the velamen) - внешний слой веламена; V (velamen) - веламен; Exd (exodermis) - экзодерма; C (cortical parenchyma) - коровая паренхима; PC (passage cells) - пропускные клетки; End (endodermis) - эндодерма; S (stele) - центральный цилиндр; T (tracheids) - трахеиды, пучки проводящих тканей. Увеличение – 200-400 (с изменениями по Pavlova et al., 2017).

Локализация и распространение микроорганизмов была также изучена на семенах, проростках и ювенильных растениях (возраст 1 год) *D. nobile*. Оказалось, что в отличие от корней генеративно-зрелых растений, при их взаимодействии с семенами и протокормами не было отмечено их проникновения во внутренние ткани прорастающих растений. Однако бактерии активно колонизировали поверхность протокормов и появляющихся ризоидов, прикрепляясь и накапливаясь в углублениях и выемках на их поверхности, формируя субпоуялции (рис. 112). Экзополисахаридный матрикс бактерий участвовал в прикреплении отдельных клеток и их агрегатов, способствуя фиксации микроорганизмов и закреплению формирующихся популяций.

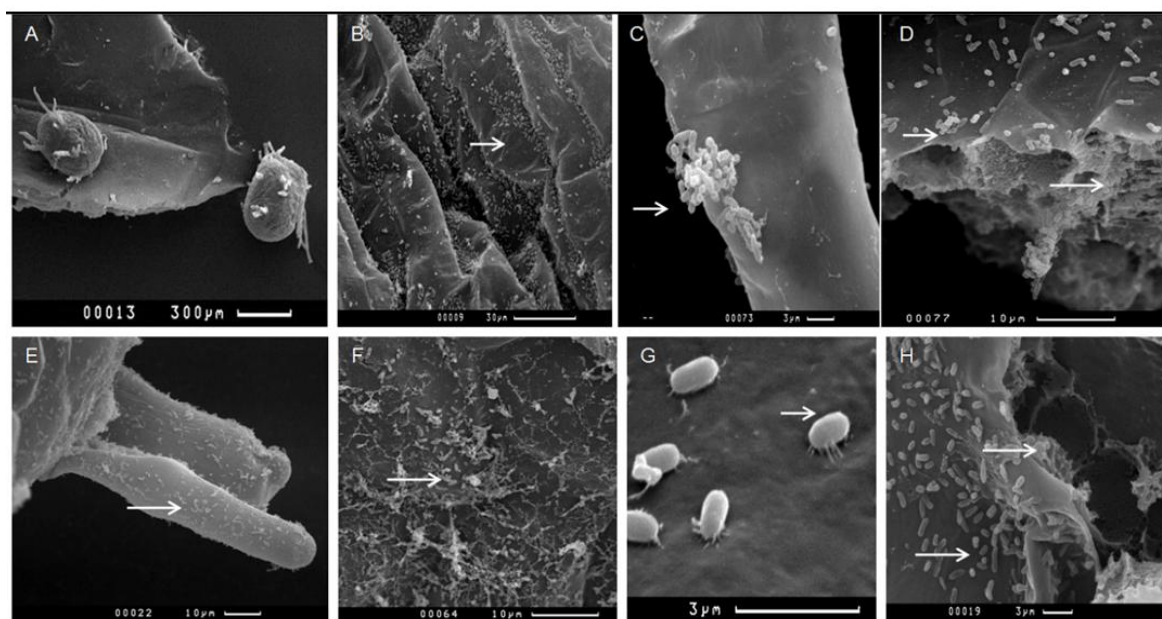


Рисунок 112. СЭМ микрофотографии колонизации семян и проростков *D. nobile* культурами *K. oxytoca* TSKhA-gfp (A-D) и *P. fluorescens* 32-gfp (E-H). Показана локализация ризобактерий через 21 сутки (A-D) и 49 (E-H) суток прорастания семян в ко-культурах. А, Е - проросшие семена с ризоидами; В, F - поверхность проростков с бактериальными клетками на ней (указано стрелками); С, G - микроколонии бактерий на ризоидах. G - клетки *P. fluorescens*, прикрепляющиеся к поверхности растения с помощью экзополисахаридных тяжей; D, H - бактериальные клетки на поверхности и в наружных слоях базальной части протокорма. Шкала: 300 мкм (А), 30 мкм (В), 3 мкм (С), 10 мкм (D), 10 мкм (Е), 10 мкм (F), 3 мкм (G), 3 мкм (H) (с изменениями по Pavlova et al., 2017).

Однако на этих ранних стадиях прорастания орхидей оба штамма бактерий заселяли исключительно внешние покровы семян, не проникая глубже 1-2 внешних слоев. Результаты КЛСМ микроскопии также подтвердили эти наблюдения (рис. 113). Несмотря на то что микроорганизмы в значительной степени заселяли поверхность однолетних ювенильных растений, даже после недели совместной инокуляции бактериальными культурами, клетки пседомонад оставались на поверхности проростков или их корней. В то же время, для образцов, инокулированных *K. oxytoca* TSKhA-gfp, было отмечено проникновение бактерий во внутренние ткани проростка.

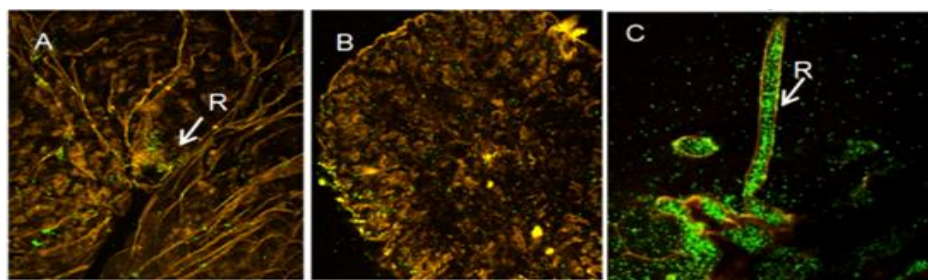


Рисунок 113. КЛСЭМ микрофотографии поверхности однолетних ювенильных растений *Dendrobium nobile*, инокулированных *K. oxytoca* TSKhA-gfp. R - roots (корни). Увеличение – 200-400.

При изучении взаимодействия бактерий с растительными клетками с помощью трансмиссионной электронной микроскопии было отмечено, что многие клетки *P. fluorescens* 32-gfp, окруженные экзополисахаридным матриксом, находились в непосредственной близости от клеточной стенки растения. Так, через 24 ч инокуляции псевдомонадами, была зафиксирована локальная целлюлозолитическая активность клеток, выражающаяся в визуальном разложении полимеров клеточной стенки растений, что провоцировало частичную деформацию и некоторое расслоение клеточной стенки под воздействием экзоферментов бактерий (рис. 114).

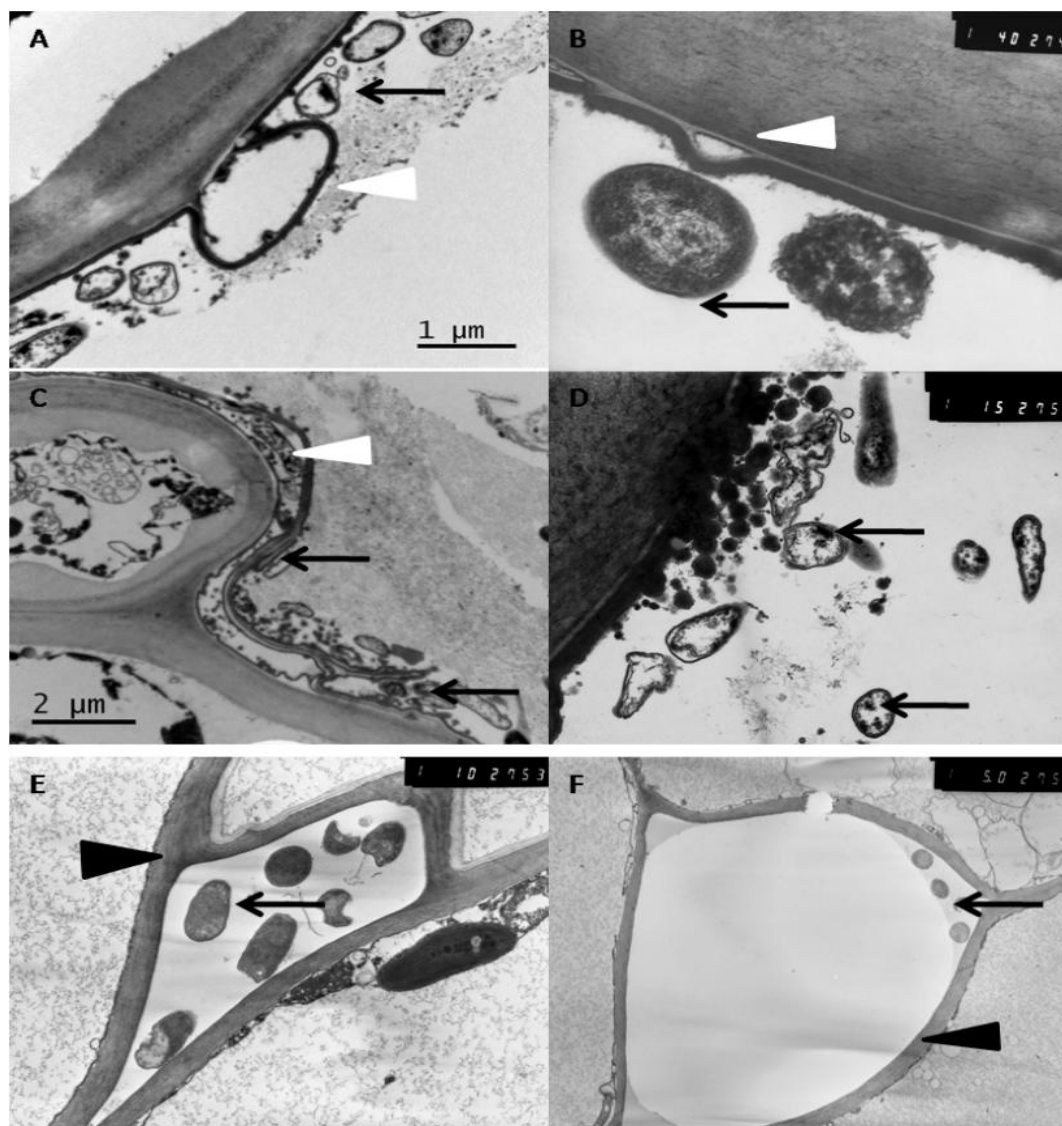


Рисунок 114. ТЭМ микрофотографии срезов *D. nobile*, инокулированных *P. fluorescens* 32-gfp (A-D) и *K. oxytoca* TSKhA-gfp (E, F) через 24 ч (*P. fluorescens*) и 7 сут (*K. oxytoca*) после бактеризации. Бактериальные клетки отмечены черными стрелками, отслоение эпидермиса клеточной стенки отмечено белым треугольником. Локализация клеток *K. oxytoca* в межклеточном пространстве коровой паренхимы корня; черными треугольниками отмечены клеточные стенки паренхимы (по Pavlova et al., 2017). Шкала и/или увеличение указаны на рисунках.

Известно, что некоторые штаммы флуоресцентных псевдомонад (*P. fluorescens* subsp. *cellulosa*) характеризуются целлюлазной активностью (Hall et al., 1995). Подобные события также характерны при формировании микробно-растительных ассоциаций и симбиозов с эндофитными бактериями. Эндофитный образ локализации был показан в том числе для *K. oxytoca*, которые заселяли коровую паренхиму корней ювенильных растений (рис. 114 E, F).

3.5.1.1. Биосинтез ИУК культурами *P. fluorescens* 32-gfp и *K. oxytoca* TSKhA-gfp

Следующей целью было оценить способность исследуемых ризобактерий, несущей маркерный ген GFP, синтезировать ауксины, которые могли бы оказывать влияние на рост и развитие семян орхидей. Мы показали (Блинков и др., 2014), что дикий штамм исследованной нами культуры *K. oxytoca* (бывший *K. planticola* TSKhA-91) образовывал ИУК в стационарной фазе роста с индукцией экзогенным триптофаном в количестве 85,5 мкг/мл, причём наибольшие количества ИУК и стимуляцию биосинтеза у этой диазотрофной культуры наблюдали именно в условиях, лимитированных по азоту, в безазотной среде. В данном исследовании мы также проанализировали влияние источника азота на образование ИУК у этих ризобактерий. Обе культуры (*P. fluorescens* и *K. oxytoca*) накапливали лучше всего биомассу на органической среде LB в течение первых (для клебсиеллы) и вторых (для псевдомонады) суток культивирования (рис. 115).

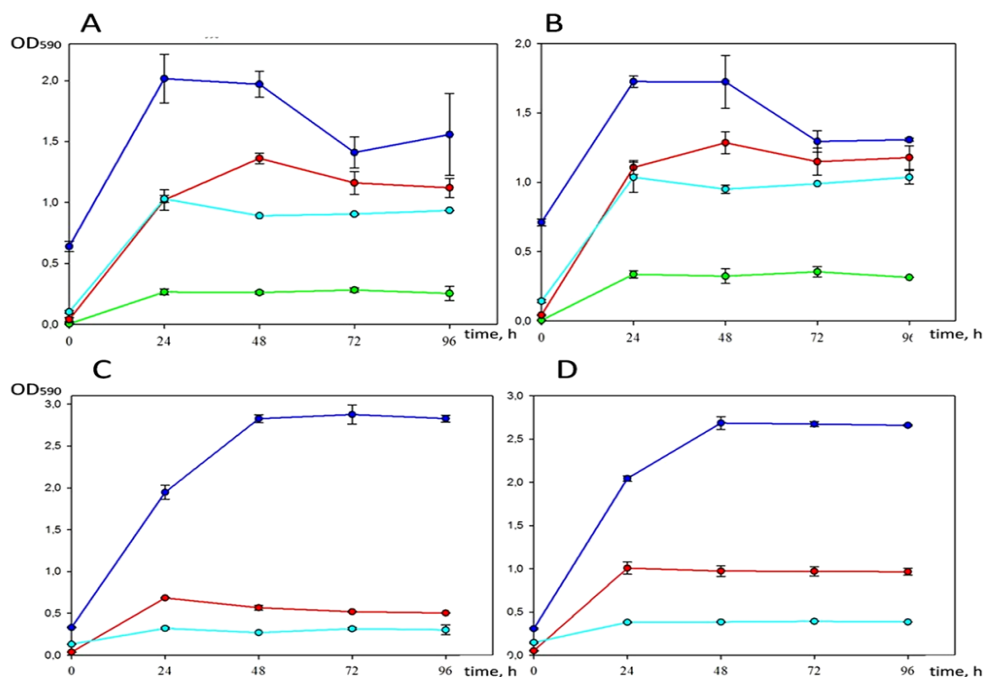


Рисунок 115. Оптическая плотность (OD₅₉₀) *Klebsiella oxytoca* TSKhA-gfp (A, B) и *Pseudomonas fluorescens* 32-gfp (C, D). Культуры ризобактерий культивировали в органической среде LB (синяя линия на графике) и минеральных средах с различным

источником азота без Trp (A, C) и с внесением 200 мкг/мл L-Trp (B, D). Основная среда (K2-N0, безазотистая) состоит из (г/л): K_2HPO_4 - 0,5; KH_2PO_4 - 0,3; $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,1; NaCl-0,75; $CaCl_2 \times 6H_2O$ - 0,03; сахара - 6,0; микроэлементы - 1 мл. "Аммонийная" среда K_2-NH_4 (бирюзовая линия на графике) - дополнена дрожжевым экстрактом и $(NH_4)_2SO_4$, а "нитратная" среда, K_2-NO_3 (красная линия на графике), дополнена дрожжевым экстрактом и $NaNO_3$. Безазотистая среда использовалась только для культивирования диазотрофного штамма *K. oxytoca*. Эксперименты проводили в трёх повторностях; результаты представлены средним арифметическим значением OD и стандартным отклонением (по Pavlova et al., 2017).

По сравнению со средой LB биомасса *K. oxytoca* TSKhA-gfp была меньше в 1,5, 2,0 и 7,5 раз, когда микроорганизмы культивировали на минеральных средах с нитратом, аммонием или без источника азота, соответственно. Внесение экзогенного триптофана в среды значительно не влияли на накопление биомассы *K. oxytoca* за исключением безазотной среды, где он увеличивал на 20% показатели оптической плотности, по сравнению с контролем. Для *P. fluorescens* 32-gfp стимулирующий эффект триптофана наблюдали на нитратной среде K2- NO_3 (рис. 116 C,D).

Основываясь на результатах динамики роста бактерий, мы проанализировали образование ИУК в первые 96 ч культивирования микроорганизмов. Без добавления триптофана уровень выхода ИУК у *K. oxytoca* TSKhA-gfp не превышал 3 мкг/мл в среде K2- NO_3 и 4 мкг/мл на LB, тогда как на аммонийной среде вообще не было обнаружено какого-либо образования ауксина (рис. 116 A, B).

Добавление триптофана (200 мкг/мл) привело к значительному увеличению количеств ИУК в среде – в 4,0, 7,7 и 30,0 раз в средах LB, K2- NH_4 и K2- NO_3 , соответственно. Максимальный эффект был обнаружен в безазотной среде с более чем 400-кратной стимуляцией и образованием 120 мкг/мл ИУК, тогда как лишь 7,5 мкг/мл ИУК образовывалось в среде K2- NH_4 . В среде LB, богатой органическими пептидами и аминокислотами, добавление триптофана почти не вызывало эффекта индукции биосинтеза ИУК, в то время как наибольшее стимулирующее влияние триптофана проявлялось в "некомфортной" для накопления биомассы среде, лимитированной по азоту.

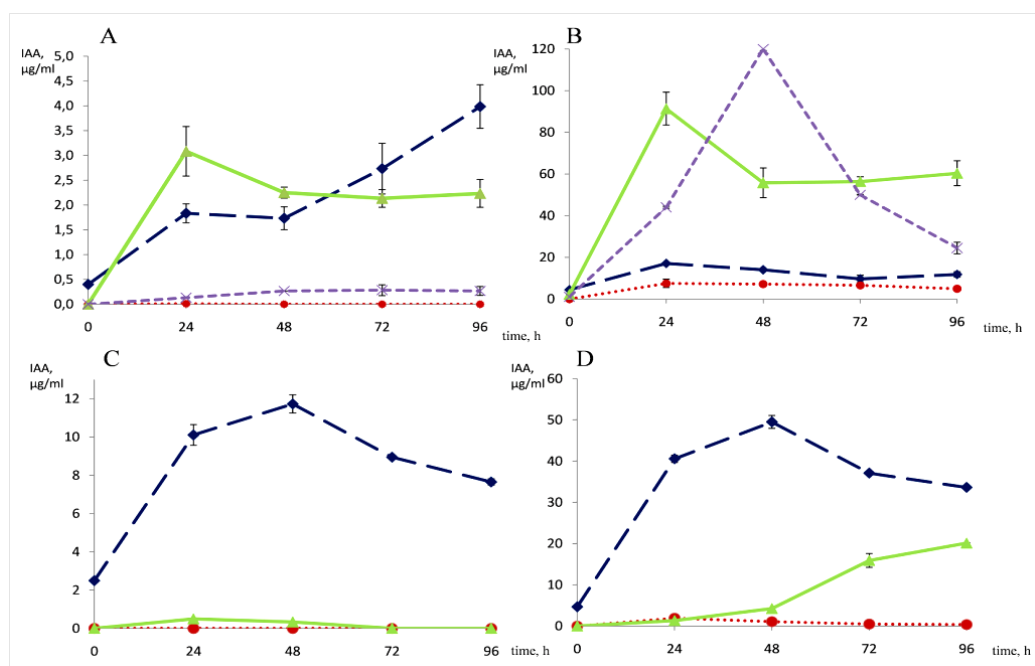


Рисунок 116. Образование ИУК (индолил-3-уксусная кислота, IAA) культурами *Klebsiella oxytoca* TSKhA-gfp (A, B) и *Pseudomonas fluorescens* 32-gfp (C, D). Ризобактерии культивировали в среде LB (—◆— LB) и минеральных средах: K2-N₀ (—×— K2-N₀), K2-NO₃ (—▲— K2-NO₃) и K2-NH₄ (····●···· K2-NH₄), без триптофана (A, C) и с добавлением 200 мкг/мл L-Trp (B, D). Эксперименты проводили в трёх повторностях; результаты представлены средним арифметическим значением OD и стандартным отклонением (по Pavlova et al., 2017).

Наоборот, *P. fluorescens* не образовывала ИУК в отсутствии экзогенного триптофана в минеральных средах. Около 12 мкг/мл ИУК было обнаружено после 48 часов в среде LB (рис. 116 C). Внесение триптофана повышало выход ауксина до 20 и 50 мкг/мл в средах K2-NO₃ и LB, соответственно (рис. 116 D). Тем не менее, биосинтез ИУК в аммонийной среде K2-NH₄ оставался минимальным, как и в случае с клебсиеллой, – на уровне 2 мкг/мл, отражая ингибирующее влияние ионов аммония на биосинтез ИУК.

Для идентификации соединений индольной природы, образуемых *Pseudomonas fluorescens* 32-gfp (a–d) и *Klebsiella oxytoca* TSKhA gfp, использовали тонкослойную хроматографию. Без добавления триптофана были обнаружены только небольшие полосы, соответствующие ИУК, когда бактерии культивировали в органической среде LB. Добавление экзогенного Trp значительно интенсифицировало образование ИУК (рис. 117). Наибольшее разнообразие индольных соединений было обнаружено в КЖ *K. oxytoca*, культивируемой на "нитратной" среде K2, а также в её безазотистом аналоге (рис. 117 A,C).

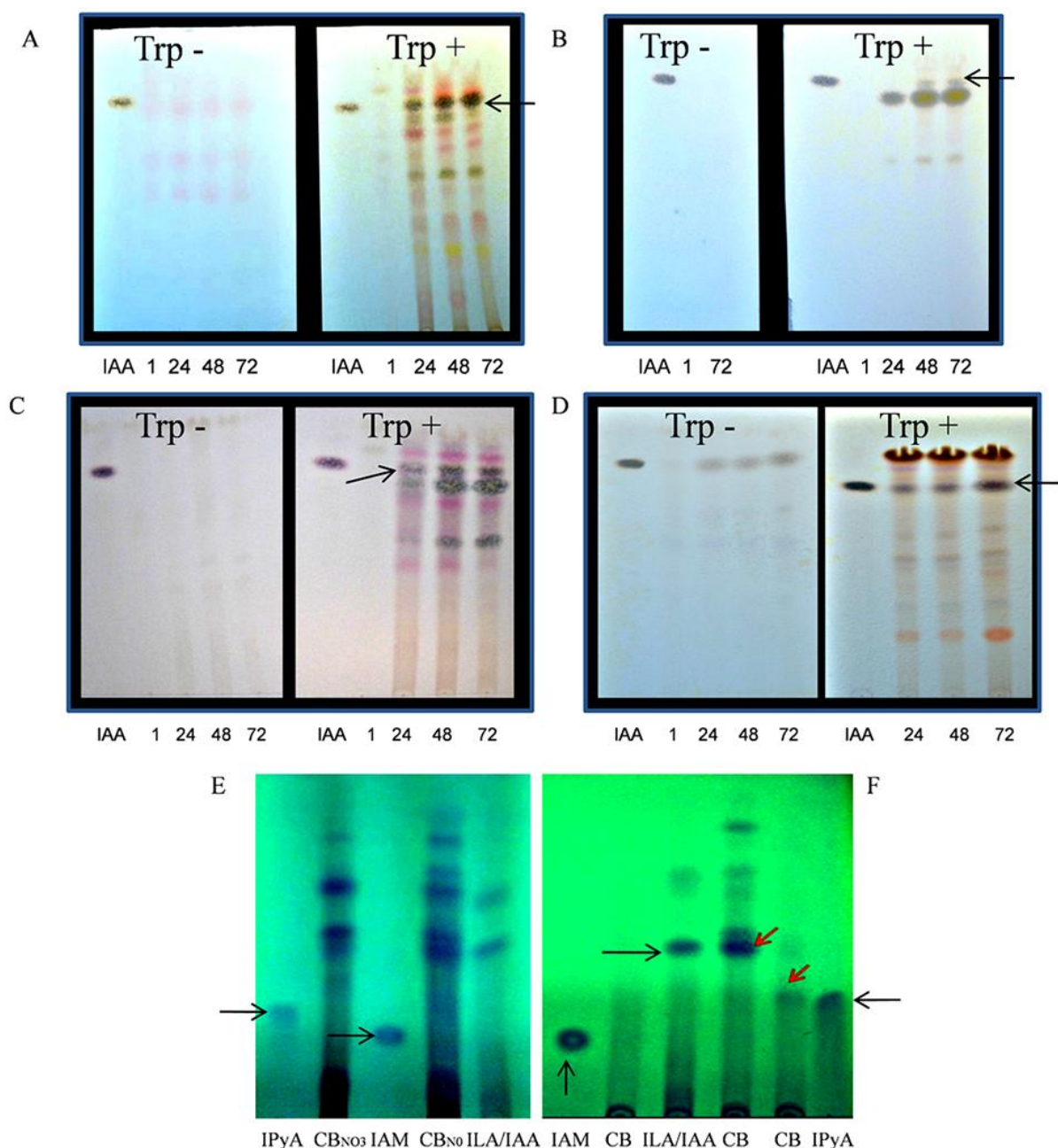


Рисунок 117. Биосинтез ИУК культурой *K. oxytoca* TSKhA-gfp. Тонкослойная хроматография (ТСХ). В качестве питательных сред использовали минеральную "нитратную" среду (А), "аммонийную" среду (В) и безазотистую среду (С), а также LB (D) без (-Trp) и с 200 мкг/мл триптофана (+ Trp). КЖ отбирали через 1, 24, 48 и 72 ч культивирования. Индольные вещества экстрагировали и анализировали с помощью ТСХ в системе растворителей хлороформ: этилацетат: формиат (50:40:10 мл). Хроматограммы просматривали в УФ свете (Е, F). Е - ТСХ в первой системе растворителей (хлороформ: этилацетат: формиат, 50:40:10); F - рехроматография во второй системе растворителей [н-гексан: этилацетат: изопропанол: ацетат (40: 20: 5: 1)]. IAA - стандарт индолил-3-уксусной кислоты, IAM – индолил-3-ацетамида, ILA – индолил-3-молочной кислоты, IPyA – индолил-3-пировиноградной кислоты.

Результаты анализа ТСХ соответствуют данным, полученным в отношении содержания ИУК колориметрическим методом; наличие ионов аммония в среде ингибируют биосинтез ИУК и значительно сокращают количество образуемой ИУК. Никаких полос, сходных с ИУК, не было обнаружено при культивировании *P. fluorescens* 32-gfp на "аммонийной" среде; едва заметные полосы были идентифицированы на среде K2-NO₃ после 96 ч культивирования. Тем не менее, пятна, соответствующие IAA, были четко определены на хроматограммах с этилацетатными экстрактами, полученными со среды LB (рис. 118 С).

Кроме ИУК в КЖ изученных микроорганизмов содержатся соединения, соответствующие по R_f индолил-3-лактату и индолил-3-пировиноградной кислоте, которые являются характерными метаболитами для ИПвК-пути биосинтеза ИУК. Полос, сходных с метчиком индолил-ацетамидом обнаружено не было.

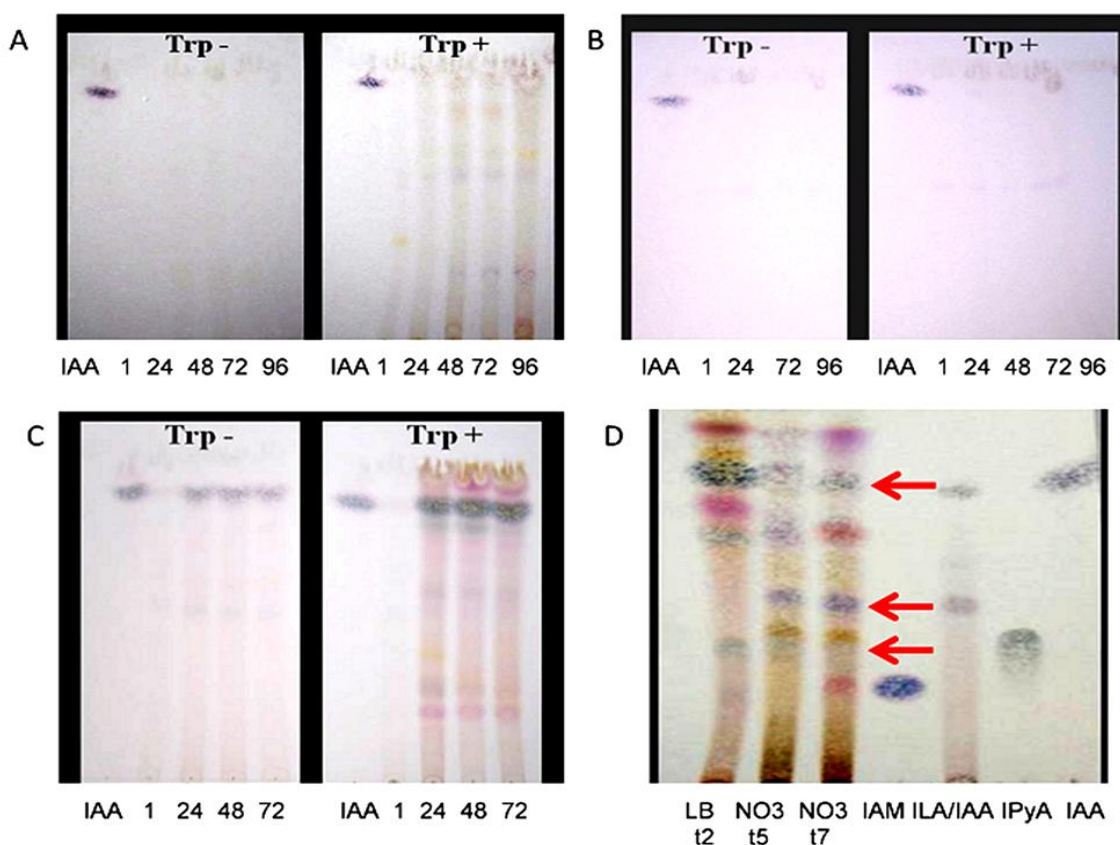


Рисунок 118. Биосинтез ИУК культурой *P. fluorescens* 32-gfp. Тонкослойная хроматография (ТСХ). В качестве питательных сред использовали минеральную "нитратную" среду (А), "аммонийную" среду (В) и LB (С) без (-Trp) и с 200 мкг/мл триптофана (+ Trp). КЖ отбирали через 1, 24, 48, 72 и 96 ч культивирования. Индольные вещества экстрагировали и анализировали с помощью ТСХ. D – хроматограммы экстрактов, полученных при росте *P. fluorescens* 32-gfp на LB и "нитратной" среде (NO₃), после 2 (t2), 5 (t5) и 7 (t7) суток культивирования. IAA – стандарт индолил-3-уксусной кислоты, IAM – индолил-3-ацетамида, ILA – индолил-3-молочной кислоты, IPyA – индолил-3-пировиноградной кислоты.

Для оценки биологической активности образуемой культурами ИУК были использованы биотесты с черенками фасоли, восприимчивыми к экзогенной ИУК, в результате чего на них формируются корни. Результаты эксперимента представлены в таблице 42 и на рисунке 119.

Таблица 42. Влияние культуральной жидкости *Klebsiella oxytoca* TSKhA-gfp и *Pseudomonas fluorescens* 32-gfp на ризогенез черенков.

Культура	Кол-во ИУК, мкг/мл	Корнеобразование	
		Высота, на которой закладываются корни, см	Кол-во корней на один черенок
Контроль (вода)	-	0,4 ± 0,3	3,9 ± 0,1
Индолил-3-уксусная кислота (стандарт)	60	7,1 ± 0,1	47,7 ± 5,2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	60	5,7 ± 0,3	63,8 ± 3,1
<i>K. oxytoca</i>	80	6,8 ± 0,5	96,3 ± 6,9
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30	2,0 ± 0,1	18,3 ± 2,9

Примечания: значения представлены средним из пяти повторностей ± стандартная ошибка. Все обработанные варианты значимо отличались от контроля в соответствии с однофакторным анализом (one-way analysis of variance, ANOVA); F-test ($p < 0.001$).

Результаты биотеста показали, что микробная ИУК обеих бактериальных культур значительно стимулировала ризогенез черенков (рис. 119), увеличивая высоту формирования корней на черенках и увеличивая количество образуемых корней. Различия между контролем и обработанными черенками были значимыми и для параметров высоты (LSD = 0,37), и для количества корней (LSD = 5,4). На контрольных черенках, как и в предыдущих опытах, формировалось 3-4 корня на небольшой высоте (0,4 см). При обработке культуральной жидкостью (КЖ) *K. oxytoca*, содержащей 60 и 80 мкг/мл ИУК, ризогенез черенков проходил на высоте 5,7 и 6,4 см, соответственно. По сравнению со стандартным раствором ауксина, содержащим 60 мкг ИУК/мл, черенки, обработанные КЖ клебсиеллы в той же концентрации, образовали дополнительные корни несколько ниже, однако, их численность превышала контрольные варианты. В опытных образцах с КЖ *K. oxytoca*, содержащей 80 мкг/мл ИУК, высота закладки корней и их численность были больше в 1,10 и 1,50 раза, соответственно. Формирование корней под воздействием культуральной жидкости *P. fluorescens* было менее эффективным, видимо, из-за более низкого содержания в КЖ фитогормона.

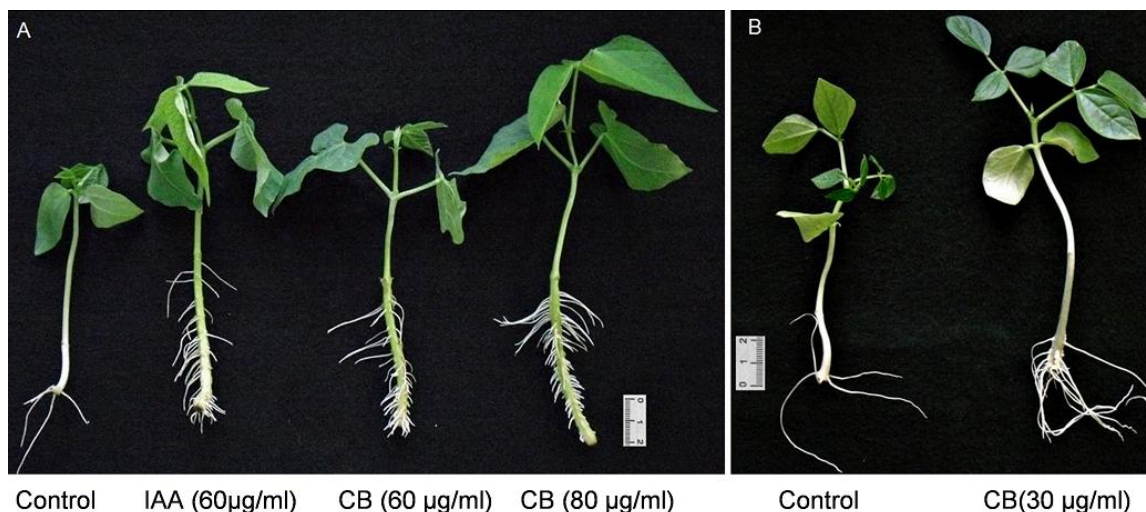


Рисунок 119. Ризогенез черенков фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) при обработке бактериальной ИУК. Черенки погружали в воду (контроль), раствор ауксина (ИУК) 60 мкг/мл и КЖ бактерий различных концентраций (60 и 80 мкг/мл для *K. oxytoca* и 30 мкг/мл для *P. fluorescens*). Относительное содержание ИУК оценивали колориметрически. А - *K. oxytoca* TSKhA-gfp; В - *P. fluorescens* 32-gfp.

3.5.1.2. Бактеризация семян *Dendrobium nobile* культурами *P. fluorescens* 32-gfp и *K. oxytoca* TSKhA-gfp

Чтобы подтвердить наше предположение о том, что орхидеи не имеют строгой специфичности к бактериальным PGPB штаммам, мы использовали культуры *P. fluorescens* 32-gfp и *K. oxytoca* TSKhA-gfp для инокуляции семян *D. nobile*, культивируемых на модифицированной среде Кнудсона-С без добавления стимуляторов роста растений, но с внесением L-Тгр для индукции образования ИУК микроорганизмами. Число жизнеспособных семян дендробиума, которое оценивали с трифенил-тетразолием хлористым (ТТХ) и его аналогом, трифенил-тетразолием бромистым (ТТБ), варьировало и составило $47,5\% \pm 3,4$ и $71,0\% \pm 4,7$, соответственно (данные представлены средним значением из трех повторностей с подсчетом 150-200 семян в каждой).

В результате проведенного исследования было показано, что обе культуры, *P. fluorescens* и *K. oxytoca*, не только не проявляли ингибирующего действия на прорастание семян, но напротив, увеличили количество проросших семян *D. nobile* и ускорили их развитие (рис. 120 и 121). Без добавления экзогенного триптофана после 39 дней культивирования ризобактерии значительно ($P \leq 0,05$) увеличили количество проросших семян с развитыми ризоидами и сформированным первым листовидным органом.

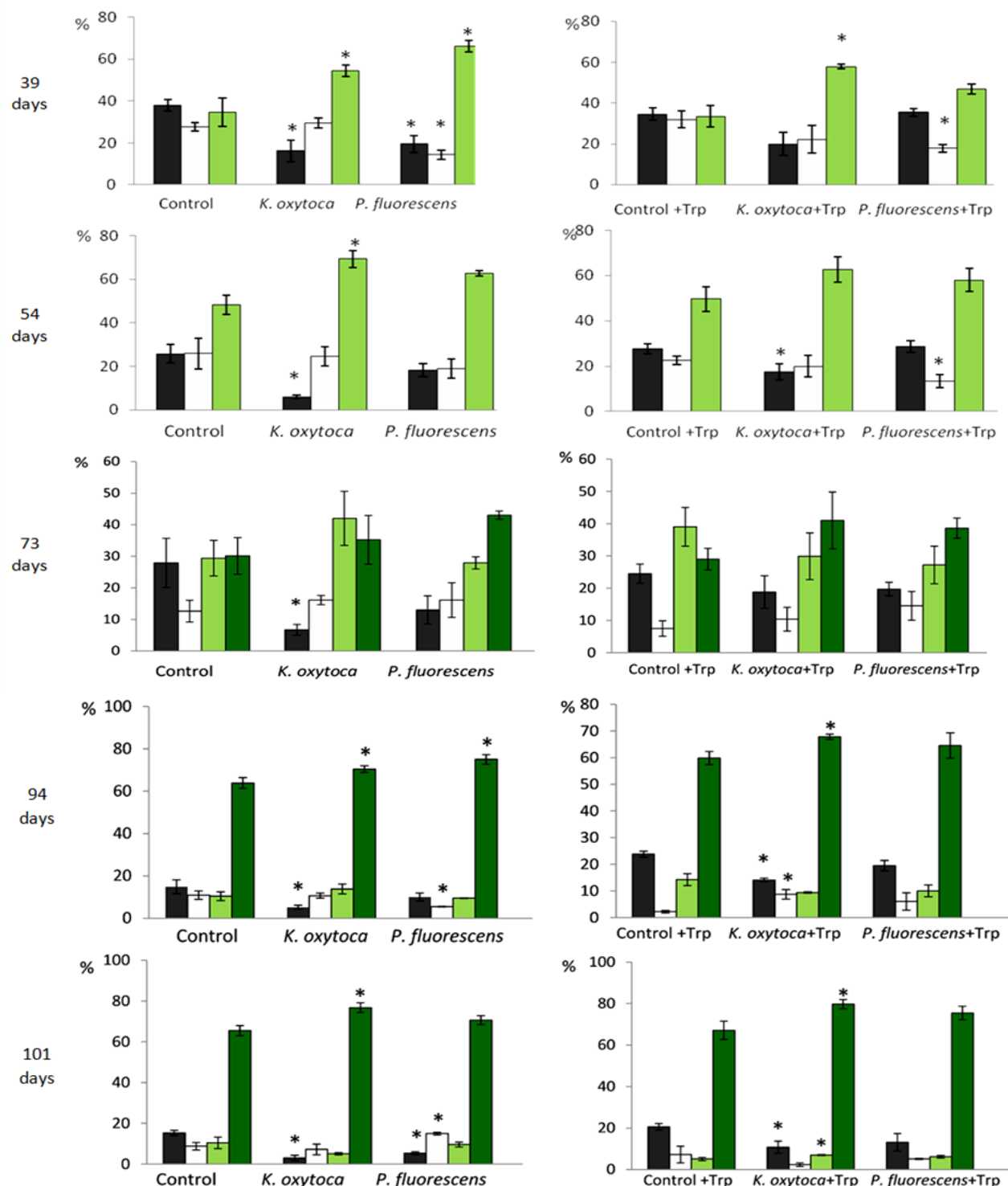


Рисунок 120. Стадии прорастания и развития семян *D. nobile* без инокуляции бактериями (контроль) и бактеризованными культурами *Klebsiella oxytoca* TSKhA-gfp и *Pseudomonas fluorescens* 32-gfp. Бактеризацию проводили на модифицированной среде Кнудсон-С без добавления триптофана и с 200 мкг/мл L-триптофана (+Trp); непроросшие семена или фотосинтетически неактивный эмбрион (черный); зеленый фотосинтетически активный протокорм (белый); развитые ризоиды и первый листовидный орган (светло-зелёный); два и более листьев (темно-зелёный). Значения представляют собой среднее из четырех повторностей при подсчете 60 семян/протоковок/проростков в трёх рандомизированных областях в каждой повторности) $\pm$ стандартная ошибка. Звездочки указывают на значимое отличие между опытными и контрольным вариантами согласно t-критерию Стьюдента ($n = 4$; $P \leq 0,05$). С изменениями по Pavlova et al., 2017.

Хотя положительное влияние *P. fluorescens* наблюдали в течение всего периода бактеризации, статистически значимые результаты ($P \leq 0,05$) между контролем и опытными вариантами были зафиксированы при бактеризации культурой после 94 сут инкубации. Рост-стимулирующий эффект штамма *K. oxytoca* TSKhA-gfp был отмечен в обоих тестовых условиях (без и с добавлением экзогенного триптофана). К 101-му дню ко-культивирования клебсиелла значимо ($P \leq 0,05$) увеличила число проростков, имеющих два и более листьев, на 17% (– Trp) и на 22% (+ Trp). Даже в условиях без добавления триптофана эта бактериальная культура показала существенное ускорение прорастания семян, сокращая количество непроросших семян и увеличив количество протокормов с развитыми ризоидами и сформированным первым листом к 39 и 54 суткам культивирования, и проростков с двумя и более листьями после 94-х суток совместной инкубации семян с культурой *K. oxytoca*. Дополнительное внесение триптофана несколько сгладило этот эффект на ранних стадиях (39, 54 и 73 дня) развития семян: разница между инокулированными и контрольными семенами оказалась статистически не значимой ($P \leq 0,05$). Тем не менее, наиболее очевидный стимулирующий эффект был зафиксирован к 94 суткам инкубации, когда проростки перешли к ювенильной стадии онтогенеза с активным фотосинтезом, ростом и дифференцировкой, образованием дополнительных листьев и корней. Именно на этом этапе *K. oxytoca*, как активный продуцент ИУК, показала наиболее заметное влияние.

Было также отмечено, что даже без добавления триптофана длина проростков к 73, 94 и 101 суткам инкубации составляла на 40%, 25% и 27% больше после бактеризации культурой *K. oxytoca* и на 14%, 29% и 43% больше – с *P. fluorescens*, чем в контроле (рис. 121, 122). Внесение триптофана уменьшило эффективность *P. fluorescens* 32-gfp в сравнении с контрольными семенами, в среду культивирования которых также была добавлена эта аминокислота. Однако культура *K. oxytoca* TSKhA-gfp сохранила и даже повысила свою эффективность в этом варианте опыта со статистически значимой разницей ($P \leq 0,05$). Увеличение длины проростков к 54, 73, 94 и 101 суткам культивирования было в ко-культуре с клебсиеллой больше на 25, 45, 36 и 35%, соответственно. Таким образом, добавление триптофана, действительно, стимулировало биосинтез ИУК этим продуцентом, который, в свою очередь, вызывал ИУК-зависимые реакции у растений.

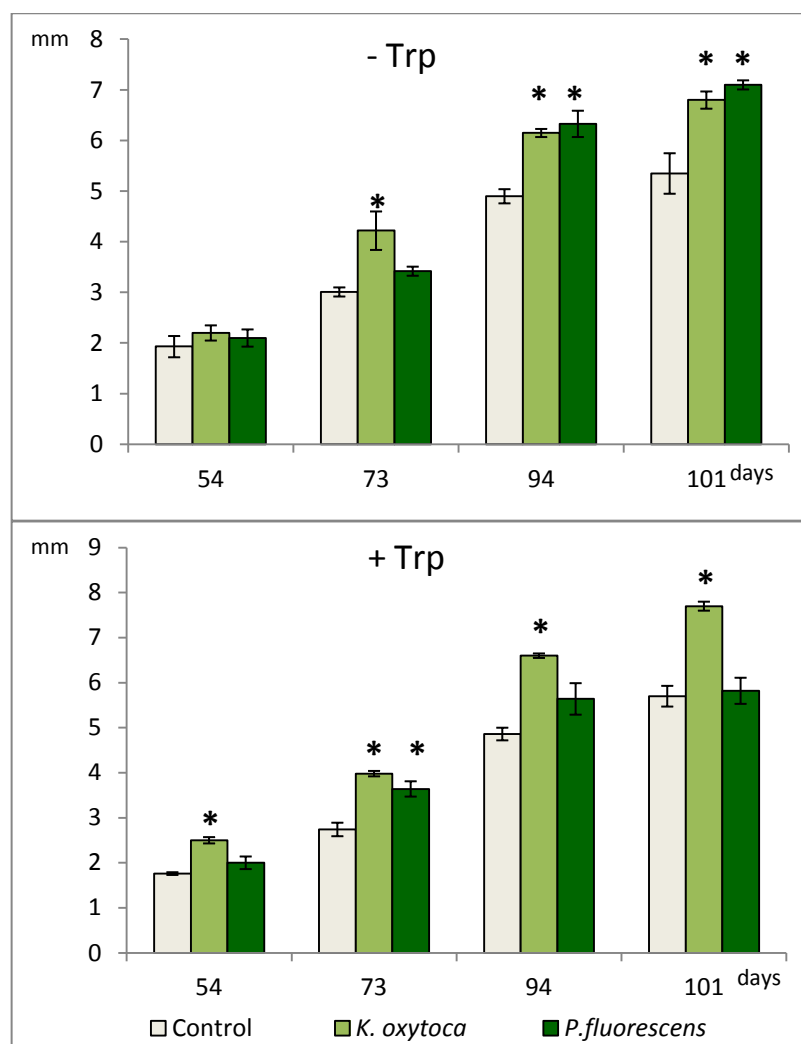


Рисунок 121. Длина проростков *D. nobile* в контроле (серый) и при бакетризации PGPR культурами *K. oxytoca* TSKhA-gfp (в светло-зелёный) и *P. fluorescens* 32-gfp (темно-зелёный) без (-Trp) и с внесением L-триптофана (+ Trp) в среду Кнудсон-С. Данные представлены средним значением из трех повторностей (подсчет 20 проростков в трех случайно выбранных областях: всего 60 для одной повторности) $\pm$ стандартная ошибка. Звездочки указывают на статистически достоверное различие между опытными и контрольным вариантами согласно t-критерию Стьюдента ($P \leq 0,05$) (с изменениями по Pavlova et al., 2017).

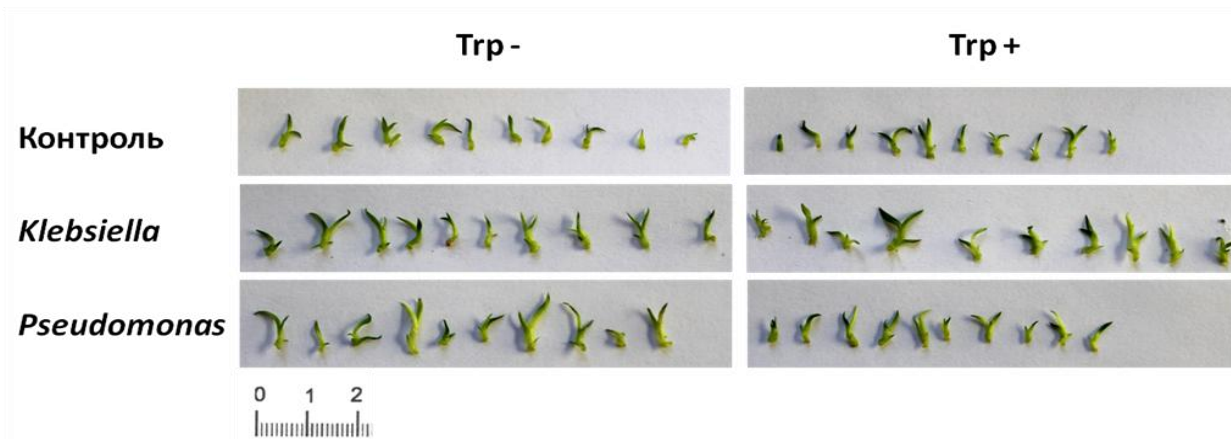


Рисунок 122. Проростки *Dendrobium nobile* через 121 сутки после инкубации с PGPR штаммами *K. oxytoca* TSKhA-gfp и *P. fluorescens* 32-gfp.

Таким образом, обе исследованные ризобактерии проявили свои PGPB свойства, что выражалось в ускорении развития и прорастания семян, особенно на ранних стадиях развития орхидей. При этом растение не проявило селективной специфичности к выбранным бактериям, что позволяет использовать различные, в том числе не резидентные потенциально-активные PGPB штаммы микроорганизмов для семенного размножения орхидей в бактеризованных культурах *in vitro*. Штамм *K. oxytoca* продемонстрировал более интенсивную колонизацию растения и более эффективное рост-стимулирующее воздействие на семена *Dendrobium nobile*, тогда как культура *P. fluorescens*, образуя значительно меньше ИУК, проявляла большую активность в условиях без добавления триптофана. По-видимому, обе стратегии можно рассматривать как дополняющие и улучшающие адаптивный потенциал растения, когда микробные популяции, состоящие из множества различных бактерий, в том числе эндофитных, колонизируют ризоплану растения-хозяина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В области знаний о "растительно-микробных взаимодействиях" к настоящему времени накоплен значительный объём данных, относящихся и к фундаментальной, и к прикладной науке. В то же время, если говорить о такой уникальной, обособленной и экологически-специализированной группе растений, как орхидеи, то изучению их взаимодействий с ассоциативными микроорганизмами практически не уделяли должного внимание. Исключение составляли исследования симбиотических отношений с грибами, с тех пор как Ноэль Бернар (1874-1911) открыл существование и роль микоризы орхидных в прорастании их семян, предложив метод симбиотического проращивания орхидей *in vitro* (Arditti, 2008). Другой великий орхидеолог, Льюис Кнудсон (1884-1958), предложил асимбиотический способ массового семенного размножения и питательные среды, которые до сих пор повсеместно применяют и носят его имя (среда Knudson C). Нельзя не сказать о том, что он был, видимо, также первым исследователем, который использовал культуру бактерий (совр. *Rhizobium leguminosarum*) для бактеризации орхидей видов *Epidendron* и *Laelia-Cattleya* (Knudson, 1922). Однако затем какие-либо исследования роли и биоразнообразия микроорганизмов, заселяющих ризо- и филлоплану этих растений, на протяжении многих десятилетий вплоть до начала 90-х годов прошлого века не проводились.

Особенности биологии, в том числе корневой системы, эпифитных орхидей позволяют им существовать в довольно экстремальной среде, произрастая на поверхности других растений или камней (литофиты): на значительной высоте, без типичного субстрата, в зачастую лимитированных по доступности ряда элементов (прежде всего, азота) условиях. Эпифитные орхидеи могут проявлять пациентную жизненную стратегию (Grime, 2001), что проявляется в удлинении прегенеративного периода, длительной продолжительности жизни и медленном росте растения, а также наличии разнообразных функциональных и структурных адаптаций, способствующих их выживанию в неблагоприятных условиях (Буюн, 2015). Связь орхидных с микоризообразующими грибами рассматривают же как одну из характерных черт стресс-толерантной стратегии (Татаренко и Вахрамеева, 1999). При интродукции тропических орхидей в оранжерейных условиях, особенно в регионах умеренных широт, растения подвержены воздействию дополнительных абиотических и биотических стрессовых факторов, среди которых утрата природных консортивных связей с ассоциативными микроорганизмами и микоризообразователями также является существенным "стрессовым барьером" (Коломейцева и др., 2013а; б). Растения вынуждены устанавливать новые биотические связи с локальными микробными сообществами, определённым образом подбирая (селектируя) партнёров, взаимодействие с которыми направлено на повышение адаптационных возможностей для растения-хозяина, улучшение его роста и развития. Примечательно, что оранжерейные биоценозы можно охарактеризовать как динамические, учитывая весь комплекс обитающих в таких оранжереях беспозвоночных, сосудистых растений, мхов, а также различных про- и эукариотических микроорганизмов (Коломейцева и др., 2013б).

Как показали результаты нашей работы, среди таких групп, как грибы, цианобактерии или гетеротрофные бактерии, можно выделить доминанты, присущие различным представителям эпифитных орхидных, культивируемым в отличающихся по условиям оранжереях (Tsavkelova, 2011; Коломейцева и др., 2013а; б). Наряду с этим, можно выделить микробные сообщества, формируемые на различных частях одного и того же растения – это филлоплана или ризоплана субстратных или воздушных корней, общий профиль популяций микроорганизмов которых будет значительно отличаться между собой. Примечательным являются полученные нами данные по сравнительному анализу количественного и качественного разнообразия микробных сообществ на корнях – именно на воздушных корнях эпифитов можно наблюдать наиболее многочисленные и

многокомпонентные консорциумы, что также бесспорно указывает на роль веламена как своеобразной экониши для заселения ассоциативными микроорганизмами.

Среди всех полученных результатов хотелось бы еще раз остановить внимание на некоторых из них. Влияние абиотических факторов (температура, влажность) прежде всего оказывает своё влияние на интенсивность развития на воздушных корнях цианобактериальных сообществ, биоразнообразие популяций в которых отличается у облиственных и безлистных видов орхидей. Тем не менее, очевидно превалирование нитчатых diaзотрофных цианобактерий, образующих гетероцисты. Недостаточное содержание или даже лимитирование по содержанию соединений азота является критичным для развития эпифитов тропических регионов (Davidson et al., 2004), а основной приток азота в почвы может происходить именно за счёт активности азотфиксирующих цианобактерий, что было показано на примере цианобактериальных сообществ инзельбергов (Dojani et al., 2007). Поэтому эпифитные орхидеи, особенно их безлистные виды, нуждаются в diaзотрофных партнерах, формируя тесные консорциумы с азотфиксирующими бактериями, а цианобактерии представляют собой наилучшую возможность для партнёрских отношений, учитывая их эволюционную предрасположенность к образованию симбиозов, большую продуктивность при наращивании биомассы и высокую активность азотфиксации. Другой функциональной составляющей является структурирующая и "питательная" роль цианобактериальных сообществ для микроорганизмов ризоплан: за счёт образуемых биоплёнок, наличия слизистых чехлов и выделения комплекса соединений (азот- и углеродсодержащих), они поддерживают рост и развитие всего микробного консорциума, в том числе предоставляя питательные вещества как самому растению, так и микоризообразующим грибам, что было продемонстрировано нами ранее (Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003a). Подобная структурирующая и защитная роль почвенных сообществ характерна для представителей семейства *Nostocaceae*, особенно в экстремальных условиях развития, например, в аридных местообитаниях (Домрачева, 2005; Peng and Bruns, 2019).

Выявленная нами ранее в наших пионерских работах (Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2003a) высокая потенциальная азотфиксирующая активность цианобактериальных биоплёнок, обрастающих воздушные корни *Phalaenopsis amabilis*, а также эффективная биоконверсия мортмассы цианобактерий (*Anabaena* sp.) в качестве единственного источника углерода анаэробным сообществом микроорганизмов (Петрова и др., 2017) позволяют с уверенностью сказать о структурирующей, ресурсной и коммуникативной (учитывая образование и накопление различных сигнальных молекул и вторичных

метаболитов, в том числе в экзополисахаридном матриксе бактерий и в биоплёнках) роли цианобактериального сообщества ризопланы воздушных корней. Наиболее выразительно это проявляется в оптимальных для развития этих фототрофов условиях, а также у безлистных видов орхидей, на корнях которых представители рода *Komarekiella*, занимающие доминирующее положение, были нами выявлены впервые в качестве ассоциантов растений.

Среди гетеротрофных бактерий, заселяющих филлоплану эпифитов, доминируют грамположительные бактерии, преимущественно представители порядка *Actinomycetales*. Филлобактерии локализуются в углублениях листовой пластины, а также заселяют участки вокруг устьиц: на листовой пластинке отмечены зоны гидролиза вокруг клеток бактерий, указывающие на эмульгацию восков, входящих в кутикулу листа, что подтверждает использование локально доступных источников углерода, в том числе гидрофобных соединений кутикулярного слоя (Mercier and Lindow, 2000).

Филлоплана и ризоплана воздушных корней эпифитных орхидных являются специфической и уникальной эконишей, в которой ассоциативные многокомпонентные микробные консорциумы находятся под непосредственным влиянием ряда абиотических факторов: УФ-излучения, перепадов температуры (учитывая, что многие растения произрастают на высоте выше 2 000 м) и влажности (как в течение суток, так и на протяжении года с чередующимися засушливыми периодами). Поэтому формирование стабильных взаимоотношений между растением-хозяином и его микробными партнёрами, направленными на достижение устойчивого и эффективного взаимодействия, является взаимовыгодной стратегией для всех участников консорциума.

Среди ассоциативных грибов эпифитных видов, колонизирующих их корни, как на оранжерейных, так и на дикорастущих растениях, доминирующие виды относились к родам *Fusarium* и *Trichoderma* (Цавкелова и др., 2003в; 2005а; Tsavkelova et al., 2008). Грибы рода триходерма и их ферменты широко применяют в биотехнологии (Алимова, 2006). Высокая гидролитическая способность *T. viride* на примере целлюлазной активности в отношении бумажных отходов (Прокудина и др., 2016) подтверждает биотехнологический потенциал *T. viride*: утилизация и предобработка смеси легко- и трудноразлагаемых бумаг повышает эффективность их биоразложения и последующей биоконверсии в биотопливо (биогаз).

В работе проведена идентификация представителей фузарий на основе молекулярно-биологических методов и подтверждена их таксономическая принадлежность к роду *Fusarium* у большинства изолятов (Tsavkelova et al., 2008). К

настоящему времени всё больше появляется информации о том, что на облиственных орхидеях, в особенности у генеративно-зрелых растений, подобные ассоциативные сообщества микромицетов играют не менее важную роль, чем грибы-микоризообразователи (Yuan et al., 2009). Подобные свидетельства подтверждают высказанные нами ранее предположения (Цавкелова, 2003; Цавкелова и др., 2005а) о том, что входящие в такие ассоциативные микосообщества непатогенные представители *Fusarium*, а также известные своими биоконтролирующими свойствами представители рода *Trichoderma*, наоборот, создают для растения своеобразный защитный барьер за счёт конкуренции, хищничества или выделения антимикробных соединений, подавляя таким образом или не допуская развития патогенных видов грибов и их агрессии по отношению к растению. Это подтверждает концепцию сбалансированного антагонизма, имеющую место между растением и эндофитными микроорганизмами (Li et al., 2016). Всё больше данных в последнее время появляется о разнообразии и наличии представителей *Fusarium*, заселяющих корни тропических орхидных (Yang et al., 2008; Yuan et al., 2009; Chen et al., 2012). Мы впервые продемонстрировали в прямом биотесте на примере двух видов *Dendrobium* (*D. moschatum* и *D. nobile*) то, что непатогенный эндофит *Fusarium proliferatum* ET1 в оптимальных для роста растения условиях не проявляет агрессии и не вызывает каких-либо симптомов заболеваний у генеративно-зрелых растений, в отличие от патогенных видов (*F. proliferatum* 62905 и *F. fujikuroi*). Более того, на обработанных *F. proliferatum* ET1 растениях были отмечены вновь образующиеся и активно растущие корни, что подтверждает нейтральное и даже фитостимулирующее действие этого изолята за счёт выделения стимуляторов роста растений.

Способность этого гриба к биосинтезу фитогормонов была нами изучена на молекулярном уровне; впервые обнаружены особенности в механизмах образования и регуляции биосинтеза ауксинов (Tsavkelova et al., 2012) и гиббереллинов (Tsavkelova et al., 2008; Niehaus et al., 2016), отличающего *F. proliferatum* ET1 от фитопатогенных видов и штаммов одноименного рода. Таким образом, различия в составе и количестве образуемых вторичных метаболитов, в особенности стимуляторов роста растений, между индивидуальными штаммами может существенную влиять на стратегию их взаимодействия с растениями, начиная с этапа колонизации.

К фундаментальным аспектам вопроса изучения биосинтеза гиббереллинов (гибберелловых кислот) также можно отнести наши исследования возможности реставрации способности к биосинтезу ГК у *Fusarium oxysporum*, который не относится к комплексу видов *Gibberella fujikuroi*, которые исходно не способны к биосинтезу

гиббереллинов ввиду отсутствия одного или нескольких генов в кластере и из-за множественных мутаций, а также наличия дефектов в регуляции генной экспрессии (Bömke and Tudzynski, 2009; Wiemann et al., 2013). После трансформации всего кластера генов *F. oxysporum* #1, он полностью возобновил способность к образованию ГК в больших количествах (Tsavkelova, 2016), подтверждая что регуляторные механизмы, такие как наличие ключевого GATA фактора транскрипции - AreA, функционируют у *F. oxysporum* также как и у некоторых других представителей рода *Fusarium*: *F. proliferatum* и *F. verticillioides* (Malonek et al., 2005a; Bömke et al., 2008; Tsavkelova et al., 2008).

При изучении локализации, биоразнообразия и роли ассоциативных микроорганизмов особое внимание нами было уделено гетеротрофным бактериям, колонизирующим ризоплану воздушных и субстратных корней оранжерейных и дикорастущих эпифитных орхидей. Наши ранние исследования (Цавкелова и др., 2001; Цавкелова, 2003), пионерские в отношении бактерий ризопланы эпифитных орхидей и механизмов их взаимодействия, можно считать поворотным моментом для дальнейших исследований в этой области, публикации по которым появляются в последнее время и затрагивают вопросы биоразнообразия и взаимодействия наземных (Shekhovtsova et al., 2013) и эпифитных (Faria et al., 2013; Galdiano Junior et al., 2011; Yu et al., 2013; Yang et al., 2014; Li et al., 2017b) орхидных с их ассоциативными бактериями.

В проведённой работе нам удалось показать существенные различия в составе ассоциативных сообществ гетеротрофных бактерий, заселяющих воздушные и субстратные корни эпифитных *Acampe praemorse* и *Dendrobium moschatum* (Цавкелова, 2003; Tsavkelova, 2011; Tsavkelova et al., 2016). Отдельным методическим вопросом был выбор техник, наилучшим образом характеризующим биоразнообразие бактерий, составляющих эти микробные сообщества. Было проведено сравнение двух подходов: традиционно-микробиологического, включающего выделение чистых культур на питательных средах с дальнейшей их идентификацией, а также молекулярно-биологического профилирования сообществ с использованием высокопроизводительного секвенирования (на базе Illumina Miseq). Несмотря на наличие типичных для ризосферы различных растений (Jha et al., 2013; Ahemad and Kibret, 2014) представителей, таких как *Pseudomonas* и *Bacillus*, обнаруженных, прежде всего, в ризоплане субстратных корней, вместе с тем, был выявлен целый спектр видов, входящих в состав доминирующих популяций исключительно либо на определённом растении, либо на определённых типах его корней, что характеризует индивидуальный состав ассоциативных бактериальных сообществ. В микробиоме воздушных корней дендробиума преобладающими оказались

представители филумов *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Отличительной чертой является влияние особенностей строения корневой системы орхидей и наличие веламена на воздушных корнях эпифитов, а также воздействие условий окружающей среды на микробные популяции, колонизирующие субстратные или воздушные корни эпифитов. Необходимо принять во внимание, что на воздушных корнях питательные вещества, в том числе выделяемые с корневыми экссудатами, а также образуемые цианобактериальным сообществом, остаются на поверхности корней и не диффундируют (не распределяются) далее, как это происходит при развитии субстратных корней. Учитывая свойства веламена, который, имея губчатую структуру, способен накапливать и удерживать влагу, лучшее развитие ассоциативные микроорганизмы получают именно на воздушных корнях эпифитов, что подтвердили впервые проведённые нами количественные оценки распределения бактериальных популяций на корнях оранжевых (Tsavkelova, 2011) и дикорастущих орхидей (Tsavkelova et al., 2007a).

Наши исследования показали правомочность применения чашечного метода выделения микроорганизмов для описания разнообразия микробно-растительных популяций такого типа: использование оптимальных питательных сред позволило выделить широкий спектр бактерий, в том числе эндофитов, которые затем были обнаружены и с помощью профилирования. Среди них представители родов *Agrococcus*, *Serinicoccus*, *Dyadobacter*, *Aureimonas*, *Ferrovibrio* и *Enterobacter*, обнаруженные на TSA и R2A, а также *Phaeospirillum*, *Nesterenkonia*, *Jeongeupia*, *Mitsuaria*, *Cupriavidus*, *Azospirillum*, изолированные на полусинтетической среде. Сходные результаты при сравнении двух методов были нами получены и при анализе филлобактерий, колонизирующих листья эпифитного *D. moschatum*. Таким образом, сочетание молекулярно-биологических методов и традиционных методов посева на питательные среды обеспечивает максимально полную и точную характеристику состава растительных микробных сообществ. Отдельного внимания заслуживает тот факт, что транзитных микроорганизмов, случайно попавших на листья, оказалось лишь незначительное количество, что еще раз говорит в пользу образования тесных ассоциаций, направленных на взаимовыгодную кооперацию между растением и его микробными партнёрами.

Такие сообщества, состоящие, как мы видим, из различных про- и эукариотических микроорганизмов, каждая группа из которых вносит определенный вклад в устойчивое функциональное развитие всего консорциума в целом, создают лучшие возможности для растения в плане стимуляции его роста, повышения устойчивости к воздействию стрессовых условий и неблагоприятных факторов, защите от фитопатогенов,

способствуют формированию по сути многофункционального надорганизма. Его успешное и конкурентноспособное существование определяется именно чётким взаимодействием всех его составляющих, в том числе, за счёт сигнальных молекул. Фитогормоны оказывают не только прямое воздействие на физиологические характеристики в самом растении, но и проявляют гормональные эффекты, что было показано нами впервые, по отношению к самим продуцентам, стимулируя рост и развитие бактериальных популяций (Tsavkelova et al., 2007b). В этом контексте наши данные полностью согласуются с концепцией холобионта (Margulis, 1991). К настоящему моменту эта концепция расширена и включает ассоциативные бактерии, "верные хозяину", причём подобная тесная приуроченность видов сохраняется на протяжении поколений (Guerrero et al., 2013). Селективное давление, действующее на отдельные компоненты холобионта, рассматривается как формирующее связанные с растениями микробные популяции из присутствующих в среде микроорганизмов, – но тех, которые максимально адаптированы к данному хозяину, что, в свою очередь, влияет на приспособленность растений и гомеостаз консорциума в целом (Hassani et al., 2018).

Примечательно, что практически все выделенные изоляты, в той или иной мере, оказались способными к биосинтезу ИУК, фоновое содержание которой создаёт условия для ризогенеза, что особенно важно для эпифитных растений для формирования и роста их корней, учитывая, что до момента вхождения в субстрат, все их корни функционируют как воздушные. Микробные ауксины, образуемые бактериями и грибами, обладают и идентичностью химической структуры, а также проявляют биологическую активность, направленную на ускорение роста и увеличение численности формируемых корней (Tsavkelova et al., 2007a; b; 2016). В наших исследованиях мы показали, что биосинтез ИУК, как и многих вторичных метаболитов, происходит в стационарной фазе роста микроорганизмов (Цавкелова и др., 2004; Tsavkelova, 2011). На этот процесс значительное влияние имеет наличие в среде аммонийного азота (Блинков и др., 2014; Pavlova et al., 2017), который подавляет биосинтез ИУК, как считается на стадии дезаминирования триптофана (Муронец и др., 1997; Datta, Basu, 1998; Иванова и др., 2001). Очевиден биологический смысл этого явления, так как наличие в среде ионов аммония, которые с лёгкостью усваиваются микроорганизмами и вовлекаются в азотный метаболизм, свидетельствует о достаточном содержании в среде питательных веществ и об отсутствии необходимости стимулировать корнеобразование, при котором молодые участки корня выделяют корневые экссудаты, используемые ризобактериями как источник питательных веществ. В то же время, на полностью лимитированной (безазотистой среде),

даже при небольшой образуемой биомассе, diaзотрофные бактерии способны синтезировать значительное количество ИУК (Блинков и др., 2014; Pavlova et al., 2017). Одним из наблюдений, таким образом, является тот факт, что именно содержание соединений азота в среде и их количество или же полное отсутствие являются триггерами многих процессов с участием вторичных метаболитов, в частности, стимуляторов роста растений, таких как ауксины и гиббереллины.

Эндофитные бактерии с маркерным GFP геном позволили нам изучить локализацию и распределение ризобактерий на корнях орхидных, а также визуализировать роль веламена в проникновении, аккумуляции и распространении микроорганизмов, а использование трансмиссионной электронной микроскопии – увидеть локализацию эндофитов в межклеточном пространстве коровой паренхимы корней (Pavlova et al., 2017). В отличие от других растений, где проникновение эндофитов зачастую может осуществляться через корневые волоски (Mercado-Blanco and Prieto, 2012), у воздушных корней вся их поверхность, покрытая веламеном, становится доступной для эндофитных ризобактерий.

При этом сами орхидеи, которые известны тем, что образуют ряд ферментов (пектиназы, кислые фосфатазы, оксидазы), а также разнообразные фенольные соединения - фитоалексины (Fisch et al., 1973; Arditti et al., 1975; Beyrle et al., 1995), необходимые для сдерживания роста грибов, в том числе микоризообразующих, также образуют и антибактериальные соединения, которые могут различаться по активности и зонам подавления роста ряда бактериальных культур, как показали наши исследования при сравнении двух эпифитов – *Pholidota chinensis* и *D. moschatum*. В нашем исследовании, помимо некоторых условно-патогенных культур, мы оценили аллелопатическое действие соединений, содержащихся в листьях *D. moschatum*, по отношению к его ассоциативным филлобактериям, и наблюдали максимальный эффект, направленный на грамположительные споровые культуры. На остальные изоляты филлобактерий, фитоэкстракты оказывали сдерживающее, но не ингибирующее полностью рост действие. Таким образом, растение имеет возможность контролировать рост бактерий и подбирать наиболее подходящих партнёров.

Особое внимание в работе было уделено изучению взаимодействия ризобактерий с семенами и проростками орхидей, учитывая, что орхидеи находятся в предгенеративном периоде довольно длительный период: в течение многих месяцев и даже лет. Нами были исследованы такие фундаментальные вопросы, как формирование зародыша и стадии

раннего эмбриогенеза у *D. nobile* (Kolomeitseva et al., 2020), объясняющие отсутствие эндосперма в его семенах; впервые изучены ранние этапы взаимодействия RGPB с прорастающими семенами, локализация бактерий на поверхности семян и образующихся ризоидов и корней проростков (Pavlova et al., 2017).

Среди биотехнологических аспектов работы – изучение возможности биоразложения биомассы цианобактерий и целлюлозолитических свойств микромицетов при биоконверсии субстратов термофильными метаногенными сообществами в биогаз (Цавкелова и Нетрусов, 2012; Цавкелова и др., 2012а, б; Прокудина и др., 2016; Петрова и др., 2017; Tsavkelova et al., 2018). Полученные нами результаты представляют научно-методические основы в исследованиях по поиску субстратов и эффективных подходов к получению альтернативных источников биотоплива. Среди таких субстратов для сбраживания метаногенным анаэробным сообществом возможность использования биомассы фототрофных микроорганизмов рассматривается как перспективный источник (Dębowski et al., 2013; Montingelli et al., 2015) и имеет как свои преимущества за счёт высокой продуктивности биомассы (Mata et al., 2010) и низких затрат для её получения, а также отсутствия увеличения парникового эффекта за счёт потребления солнечной радиации и углекислоты, так и свои недостатки, ввиду трудноразлагаемой клеточной стенки микроводорослей (Nobles et al., 2001), образования токсичных для анаэробных микроорганизмов соединений и высокого содержания азота в биомассе фототрофов, приводящее к выделению аммиака и повышению pH, что ингибирует метаногенез (Mata-Alvarez et al., 2007; Dębowski et al., 2013). Подобранные нами условия культивирования и использование селектированных сообществ (Цавкелова и др., 2012а; б; Петрова и др., 2017) позволили нам осуществить конверсию биомассы *Anabaena* sp. термофильными сообществами с образованием более 60% кумулятивного метана в составе образуемого биогаза. Это открывает перспективы для дальнейшего использования биомассы цианобактерий для получения биотоплива. Так, на примере мезофильных сообществ, разлагающих биомассу фототрофных микроорганизмов, в биореакторе с применением интегрированных мембранных систем (контакторов) стало возможным одновременное разделение образуемых газовых смесей с получением отдельных возобновляемых энергоносителей, – метана и водорода (Gasanova et al., 2006; Цавкелова и др., 2011).

К молекулярно-генетическим аспектам биотехнологических разработок можно отнести полученные нами результаты по исследованию возможности двух представителей рода *Fusarium* к биосинтезу гиббереллинов (гибберелловых кислот). На примере грибов, ассоциированных с орхидными, нами впервые были получены данные о способности,

входящего в комплекс видов *Giberella fujikuroi*, *F. proliferatum* ET1 к биосинтезу ряда ГК, в том числе ГК₄ и ГК₇ (Tsavkelova et al., 2008; Niehaus et al., 2016), а также о возможности использования генно-инженерных технологий для полного восстановления биосинтеза ГК у *F. oxysporum* #1 (Tsavkelova, 2016), не входящего в комплекс видов *G. fujikuroi*. Установленный факт о сохранении общих регуляторных механизмов для экспрессии кластера генов, необходимых для многоступенчатого биосинтеза ГК у грибов, позволяет рассматривать этот подход для потенциального использования новых продуцентов внутри рода *Fusarium* для получения определённых ГК. Так, среди спектра образуемых микромицетами гиббереллинов, несомненный интерес для практики могут представлять ГК₄ и ГК₇, так как их диапазон действия шире, а физиологическая активность во многих случаях выше, по сравнению с таковой у ГК₃ (Муромцев и Краснопольская, 1997). Кроме того, экзогенная ГК₄ может быть преобразована в побегах растений в ГК₁ (Kobayashi et al., 1993). Поэтому эндофитный *F. proliferatum* ET1 может представлять интерес именно как продуцент ГК₄ и ГК₇, которые как индивидуально, так и в смеси могут оказывать более мягкое действие на растения, в отличие от ГК₃ и ГК₁, образуемых фитопатогенами. Наши результаты подчёркивают также важность использования "омик-" методов геномики и протеомики для анализа способностей исходных штаммов и их потенциальных возможностей для биотехнологии. Так, наши результаты показали полную компенсацию гиббериллиногенной активности у дикого типа *F. oxysporum*, исходно неспособного к биосинтезу ГК, за счёт введения космиды с полным кластером необходимых генов. Возможность использования генно-модифицированных штаммов позволяет использовать новые виды микромицетов для их потенциального применения.

Вместе с тем, мы считаем наиболее значимыми наши практические достижения в области биотехнологии сохранения и воспроизведение орхидных *in vitro*, поскольку впервые предложенный нами ранее (Цавкелова, 2003) и усовершенствованный в этой работе (Коломейцева и др., 2006; Tsavkelova et al., 2007; 2016; Pavlova et al., 2017) метод семенного размножения этих растений в ко-культуре со штаммами RGPB, как аборигенными (Tsavkelova et al., 2007; 2016), так и выделенными изначально с других растений (Pavlova et al., 2017), показал свою высокую эффективность в отношении увеличения всхожести семян и ускорения их роста и развития. Примечательным является тот факт, что селектированные по способности к биосинтезу ауксинов штаммы оказывают своё рост-стимулирующее действие на средах в отсутствии фитогормонов, без которых лишенные эндосперма семена орхидных в асимбиотической культуре не прорастают. В работе акцентируется внимание на невозможности использования таких широко-

зарекомендовавших себя в агробиотехнологии PGPB как *Rhizobium* или *Azospirillum* при семенном проращивании орхидей на стандартных высокоуглеводных средах из-за экзополисахаридного матрикса бактерий, который блокирует развитие семян. При выборе таких ассоциативных PGPB культур, потенциально способных ускорять развитие семян орхидных, необходимо учитывать это их свойство. В то же время, в отличие от грибов-микоризообразователей, зачастую узко специализированных по отношению к растению-хозяину, мы показали отсутствие подобной специфичности во взаимодействии орхидных с бактериальными партнёрами. Использование PGPB культур, обладающих требуемыми характеристиками позволяет значительно повысить всхожесть семян (в том числе, учитывая полное её отсутствие в контрольных вариантах; Tsavkelova et al., 2007b) и ускорить их развитие, а формирование таких ассоциаций – значительно увеличить выживаемость и приспособляемость растений при их реинтродукции в природу с целью воссоздания утраченных популяций. Таким образом, не только несколько высокоактивных селектированных нами штаммов – стимуляторов прорастания и развития орхидей *in vitro* (Цавкелова, 2003; Коломейцева и др., 2005, Tsavkelova et al., 2007b; 2016; Pavlova et al., 2017), но и определение механизмов их взаимодействия с семенами и проростками орхидных, а также выявление особенностей их использования *in-vitro* позволяют рекомендовать разработанный нами способ для широкого использования в биотехнологии орхидных.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что на эпифитных орхидных формируются многокомпонентные микробные сообщества, тесно ассоциированные с ризо-и филлопланой растений, и находящиеся в динамическом взаимодействии, в зависимости от особенностей биологии растения-хозяина, типов корней (субстратные или воздушные) и воздействия факторов внешней среды. Веламен является структурой воздушных корней, способствующей колонизации и распределению грибов и бактерий в ризоплане генеративно-зрелых и ювенильных растений. Отмечено распределение эндофитных бактерий в апопласте коровой паренхимы корней. Численность ризобактерий у *Acampe praemorsa* и *Dendrobium moschatum* на воздушных корнях в 280-1250 раз превышает обсеменённость их субстратных корней.

2. Цианобактериальное сообщество воздушных корней преимущественно состоит из нитчатых, содержащих гетероцисты, видов семейства *Nostocaceae*. Из ризопланы безлистных орхидей *Chiloschista parishii* и *Microcoelia moreauae* выделены представители рода *Komarekiella*. Азотфиксирующая активность цианобактериальных сообществ и возможность биodeградации мортмассы цианобактерий подтверждают их ресурсную роль для консорциума микроорганизмов.

3. При изучении фитомикробиома *Dendrobium moschatum* оба используемых подхода: высокопроизводительное секвенирование (ВПС) и традиционный чашечный метод получения отдельных колоний с их последующей идентификацией позволили получить сходные результаты по качественному составу и количественному распределению доминантных и минорных популяций ассоциативных бактерий. В надземных частях преобладают грамположительные яркопигментированные актинобактерии, в основном, *Microbacterium*: 34% (по результатам ВПС) и 13-14% и 28-42% при выделении культивируемых бактерий из ризопланы и внутренних тканей воздушных корней, соответственно. В филлоплане представители филума *Actinobacteria* достигают 90%. На субстратных корнях доминирующие популяции состоят преимущественно из *Proteobacteria*: *Pseudomonas* и *Rhizobium* (44% и 37% по данным ВПС и 52% и 11% при высеве на среды, соответственно). Сочетание обеих техник обеспечивает максимально полный анализ биоразнообразия фитомикробиома растений.

4. Сравнение фитомикробиома орхидей, культивируемых в оранжерейных условиях, с дикорастущими видами выявило индивидуальные отличия в составе бактериальных популяций, в том числе значительное присутствие энтеробактерий (*Pantoea*, *Erwinia*) и представителей *Burkholderia* на дикорастущих *Pholidota articulata* и *Paphiopedilum appletonianum*.

5. Среди ассоциативных микромицетов оранжерейных и дикорастущих орхидей преобладают представители родов *Trichoderma* и *Fusarium*. Целлюлозолитическая активность *Trichoderma viride* выявлена при использовании различных типов бумаг и составила при биоразложении офисной бумаги 10,2 Ед./мг (белка) и 3,0 Ед./мг при утилизации смеси, в том числе, трудноразлагаемых бумаг, что подтверждает высокую экзогидролитическую активность грибов рода *Trichoderma*.

6. Изолят *Fusarium proliferatum* ET1, существенно отличающийся по своей способности к биосинтезу ауксинов и гиббереллинов от грибов этого вида и рода. Активность пути биосинтеза ауксинов через индолил-3-ацетамид, нефункционального у фитопатогенных фузарий, а также способность к образованию гибберелловых кислот ГК₄ и ГК₇ указывают на штаммоспецифичность в биосинтезе этих вторичных метаболитов, что в значительной степени определяет стратегию взаимодействия гриба с растением. Отсутствие фитопатогенеза и эндофитизм *F. proliferatum* ET1 подтверждены в биотестах с генеративно-зрелыми эпифитными орхидеями на примере *Dendrobium moschatum* и *D. nobile*.

7. Азотная регуляция экспрессии генов, ответственных за биосинтез гиббереллинов, функционально активна как у *F. proliferatum*, входящего в комплекс видов *Fusarium fujikuroi*, так и у *F. oxysporum*, не входящего в него. Это даёт возможность получения новых высокоактивных продуцентов среди представителей рода *Fusarium* после введения отдельных генов или кластера генов.

8. Ассоциативные (в том числе, эндофитные) бактерии ризо- и филлопланы осуществляют триптофан-зависимый биосинтез ауксинов (средний уровень биосинтеза индолил-3-уксусной кислоты составляет 20-30 мкг/мл в микробных сообществах филлопланы и 50-60 мкг/мл – ризопланы): функциональными являются пути образования ИУК через индолил-3-пировиноградную кислоту и через индолил-3-ацетамид. Рост-стимулирующий эффект ИУК в диапазоне 1-100 мкг/мл на развитие культур *Mycobacterium*, *Sphingomonas*, *Rhizobium* и *Microbacterium* выражен в увеличении плотности их бактериальных популяций в 1,3-2 раза.

9. Взаимодействие-коммуникация между растением и ассоциативными бактериями осуществляется с помощью сигнальных соединений, среди которых ИУК, очевидно, занимает ведущее место. В свою очередь, орхидеи (на примере *Dendrobium nobile*, *Pholidota chinensis*) выделяют антимикробные соединения, сдерживающие рост колонизирующих их бактерий, определённым образом осуществляя селекцию микробных партнёров в составе фитомикробиома.

10. Разработаны методы использования бактерий, стимулирующих рост растений (PGPB), для семенного размножения орхидей. Показана возможность применения аборигенных ассоциативных и эндофитных (*Sphingomonas*, *Agrococcus*) видов, а также изолятов PGPB с других растений (*Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella oxytoca*) на средах, не содержащих внешних фитогормонов. Отмечено ускорение развития прорастания семян и увеличение проросших семян: так, всхожесть семян *Dendrobim nobile* составляет 92-94% при использовании эндофитных культур (против 76% в контроле). Помимо выделения и селекции на основании образования ИУК эффективных штаммов бактерий подобраны условия для бактеризации и определены факторы, влияющие на успешность совместного развития семян орхидей и культур PGPB. Длина проростков семян, инокулированных *P. fluorescens* и *K. oxytoca*, на ранних стадиях развития (73-100 сут) выше, чем в контроле на 40%. Преимуществом этого метода также является отсутствие видоспецифичности при взаимодействии растений и ассоциативных бактерий, что позволяет рекомендовать предложенный метод к широкому использованию в биотехнологии орхидных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агафонова Н., Капаруллина Е., Доронина Н., Троценко Ю. Фосфатсоллюбилизирующая активность аэробных метиловых бактерий // Микробиология. 2014. 83 (1): 28–32.
2. Акимов Г.П., Соколова М.Г., Нечаев Л.В. Влияние инокуляции *Rhizobium leguminosarum* на содержание ИУК и АБК в корнях проростков гороха // Физиология растений – наука 3-го тысячелетия: Тез. докл. Межд. конф. IV Съезда Общ. физиологов растений России. Москва, 1999. С. 514.
3. Актуганов Г.Э., Галимзянова Н.Ф., Мелентьев А.И., Кузьмина Л.Ю. Внеклеточные гидролазы штамма *Basillus* sp. 739 и их участие в лизисе клеточных стенок микромицетов // Микробиология. 2007. 76: 471–479.
4. Александрова А.В., Великанов Л.Л., Сидорова И.И., Сизова Т.П. Влияние гриба *Trichoderma harzianum* на почвенные микромицеты // Микология и фитопатология. 2000. 34 (3): 68–77.
5. Алимова Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. Казань: Унипресс: ДАС. 2006. 268 с.
6. Андреюк Е.И., Коптева Ж.П., Занина В.В. Цианобактерии. Киев: Наукова Думка. 1990. 199 с.
7. Артамонова М.Н., Потатуркина-Нестерова Н.И., Беззубенкова О. Е. Роль бактериальных симбионтов в растительно-микробных ассоциациях // Вестник Башкирского университета. 2014. 19 (1): 81–84.
8. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Основы микротехнических исследований в ботанике. Справ. рук-во. М.: "Гриф и К". 2000. 127 с.
9. Билай В. И. Фузариоз. Киев: Наукова думка. 1977. 442 с.
10. Белимов А.А., Иванчиков А.Ю., Юдкин Л.В., Хамова О.Ф., Поставская С.М., Поползухина П.В., Шмакова А.А., Козлова Г.Я. Характеристика и интродукция новых штаммов ассоциативных ростстимулирующих бактерий, доминирующих в ризоплане проростков ячменя // Микробиология. 1999. 68 (3): 392–397.
11. Белимов А.А., Сафронова В.И. АЦК деаминизация и растительно-микробные взаимодействия (обзор). Сельскохозяйственная биология. 2011. 3: 23–28.
12. Благовещенская Е.Ю. Разнообразие системных эндофитов // Биотические связи грибов: мосты между царствами: материалы VII всероссийской микологической школы-конференции с международным участием. Сборник докладов и тезисов. 2015. С. 232.
13. Блинков Е.А., Цавкелова Е.А., Селицкая О.В. Образование ауксина штаммом *Klebsiella planticola* Тсха-91 и его влияние на развитие семян огурца посевного (*Cucumis sativus* L.). Микробиология. 2014. 83 (5): 543–551.
14. Блинова И.В. Особенности онтогенеза некоторых корневых орхидных (Orchidaceae) крайнего Севера // Бот. журн. 1998. 83 (1): 85–94.
15. Бобровский М.В. Лесные почвы Европейской России: биотические и антропогенные факторы формирования. Москва: тов-во науч. изданий КМК. 2010. 393 с.
16. Боронин А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas* способствующие росту и развитию растений // Соросовский образовательный журнал. 1998. 10: 25–31.
17. Ботвинко И.В. Экзополисахариды бактерий // Успехи микробиол. 1985. 20: 79–116.
18. Буюн Л.И. Особенности жизненных стратегий орхидных // Охрана и культивирование орхидей: мат. межд. научно-практич. конференции (Минск, 1–5 июня 2015 г.). Минск: А.Н. Варакин, 2015. С. 39.
19. Буюн Л.И., Ткаченко Г.М., Гиренко А.Г. Антибактериологическая активность этанольных экстрактов из псевдобульб видов рода *Coelogyne* (Orchidaceae)

- относительно роста золотистого стафилококка. Сборник научных трудов. ФГБНУ ВНИИОК., 1 (9). Ставрополь: Бюро новостей. 2016. 612 с.
20. Буюн Л. И., Ткаченко Г. М., Осадковский З., Ковальская Л. А., Гиренко А. Г. Антимикробные свойства эпифитной орхидеи *Coelogyne assamica* Linden & Rchb. f. в отношении *Pseudomonas aeruginosa*. Материалы Международной научной конференции, посвященной 85-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. 2017. Ч. 2: 359-363.
 21. Великанов Л.Л. Роль грибов в формировании мико- и микробиоты почв естественных и нарушенных биоценозов и агроценозов // Дис. на соиск. уч. ст. д.б.н. Москва. 1997. 547 с.
 22. Великанов Л.Л., Сидорова И.И. Экологические проблемы защиты растений от болезней. Итоги науки и техники. Сер. Защита растений. М.:ВИНИТИ. 1988. 6. 143 с.
 23. Виноградова Т.Н. Морфология и биология некоторых бореальных орхидных (Orchidaceae Juss.) на ранних стадиях их развития // Дис. на соиск. уч. ст. к.б.н. Москва. 1999. 200 с.
 24. Виноградова О.Н., Коваленко О.В. Подсемейство Leptolyngbyoideae Anagn. et Komarek (Cyanokaryota) во флоре Украины // Альгология. 2012. 22(3): 316-330.
 25. Высоцкий В.В. Структурные основы межклеточных связей в бактериальных популяциях // Тр. Всес. Семина. НТО РЭС им. А.С.Попова "Электронная микроскопия для исследования функциональных изменений структуры клетки при различных воздействиях". Иваново: Изд-во Иван. мед. ин-та. 1988. С. 46-49.
 26. Гарибова Л.В., Дундин Ю.К., Коптяева Т.Ф., Филин В.Р. Водоросли, лишайники и мохообразные СССР. М.: Мысль. 1978. 365 с.
 27. Гладкова В.Н. Семейство орхидные (Orchidaceae). В кн.: Жизнь растений. М.: Просвещение. 1982. 6: 248-275.
 28. Глушакова А.М., Чернов И.Ю. Сезонная динамика дрожжевого населения листьев *Oxalis acetosella* L. // Микробиология. 2004. 73 (2): 226-232.
 29. Горелова О.А., Баулина О.И. Ультраструктура клеточных форм цианобактерий *Nostoc* sp. f. *Blasia* в персистирующих популяциях // Микробиология. 2009. 78 (5): 674-683.
 30. Гусев М.В., Никитина К.А. Цианобактерии (физиология и метаболизм). М.: Наука. 1979. 228 с.
 31. Дерфлинг К. Гормоны растений. Системный подход. М.: Мир. 1985. 304 с.
 32. Дидович С.В., Темралеева А.Д., Дидович А.Н., Алексеенко О.П., Горгулько Т.В., Чайковский В.А. Метаболический потенциал цианобактерий в растительно-микробном взаимодействии // Таврический вестник аграрной науки. Биол. науки. 2017. 4 (12): 9-17.
 33. Добровольская Т.Г., Сквирица И.Н., Лысак Л.В. Методы выделения и идентификации почвенных бактерий. М.: МГУ. 1990. 72 с.
 34. Добровольская Т.Г., Хуснетдинова Т.И., Савицкая П.М., Манучарова Н.А., Якушев А.В. Специфика таксономического состава бактериальных сообществ лекарственных растений и их экологическая значимость // Агрохим. Вестник. 2018. 2: 42-45.
 35. Добровольский Г.В. Роль и значение почв в становлении и эволюции жизни на Земле // Эволюция биосферы и биоразнообразие (к 70-летию А.Ю. Розанова). М.: КМК. 2006. С. 246-257.
 36. Домрачева Л.И. Цветение почвы и закономерности её развития. Сыктывкар. 2005. 336 с.
 37. Доронина Н.В., Иванова Е.Г., Троценко Ю.А. Новые данные о способности метилобактерий и метанотрофов синтезировать ауксины // Микробиол. 2002. 71 (1): 130-132.
 38. Дьяков Ю.Т., Долгова А.В. Вегетативная несовместимость у фитопатогенных грибов. М.: МГУ. 1995. 160 с.

39. Егоров Н.С. (ред.). Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: МГУ. 1995. 224 с.
40. Емцев В.Т. Ассоциативный симбиоз почвенных diaзотрофных бактерий и овощных культур // Почвоведение. 1994. 4: 74-84.
41. Заварзин Г.А. Эмиссия метана с территории России // Микробиология. 1997. 66 (5): 669-673.
42. Заварзин Г.А. Планета бактерий // Вестник РАН. 2008. 78 (4): 328-336.
43. Заварзина А.Г., Заварзин А.А. Гумус в ранних наземных экосистемах // Природа. 2013. 9 (1177): 49-58.
44. Залукаева Г.Л. О микоризах тропических и субтропических орхидей в оранжерейной культуре // Бюл. МОИП. Отд. Биол. 1990. 95 (3): 111-117.
45. Залукаева Г.Л. Особенности онтогенеза тропических и субтропических орхидей в оранжерейной культуре // Дис. канд. биол. наук. М., 1990.
46. Захарычев В.В. Фитогормоны, их аналоги и антагонисты в качестве гербицидов и регуляторов роста растений: Учебное пособие / РХТУ им. Менделеева. М., 1999. 56 с.
47. Иванова Е.Г., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Аэробные метиловобактерии синтезируют ауксины // Микробиология. 2001. 70 (4): 452-458.
48. Каменева С.В., Муронец Е.М. Генетический контроль процессов взаимодействия бактерий с растениями в ассоциациях // Генетика. 1999. 35 (11): 1480-1494.
49. Капарулина Е.Н., Доронина Н.В., Мустахимов И.И., Агафонова Н.В., Троценко Ю.А. Биоразнообразие аэробных метиловобактерий, ассоциированных с филлосферой растений южного подмосковья // Микробиология. 2017. 86 (1): 107-113.
50. Кожевин П.А. Микробные популяции в природе. М.: МГУ. 1989. 172 с.
51. Коломейцева Г.Л. Эти таинственные орхидеи // Приусадебное хоз-во (прилож.). М.: Сельская новь. 2001. № 12. 14 с.
52. Коломейцева Г.Л. Орхидеи и особенности их выращивания. Москва : Фитон XXI. 2017. 264 с.
53. Коломейцева Г.Л., Антипина В.А., Широков А.И., Хомутовский М.И., Бабоша А.В., Рябченко А.С. Семена орхидей: развитие, структура, прорастание .М.: ГЕОС. 2012. 352 с.
54. Коломейцева Г.Л., Цавкелова Е.А., Гусев Е.М., Малина Н.Е. О симбиозе некоторых орхидных и активного штамма бактерии *Bacillus pumilus* в культуре *in vitro* // Бюлл. ГБС. Москва: Изд-во Наука. 2002. 183: 117-126.
55. Коломейцева Г.Л., Цавкелова Е.А., Гусев Е.М., Редько Н.Е. Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Штамм бактерии *Bacillus pumilus* КМ МГУ 467, стимулирующий прорастание семян орхидей, и способ его использования //Патент РФ. 2005. № 2272409.
56. Коломейцева Г.Л., Цавкелова Е.А., Колобов Е.С. Оранжерейные биоценозы в экспозициях тропических и субтропических растений // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология. 2013а. 31: 133-142
57. Коломейцева Г.Л., Цавкелова Е.А., Колобов Е.С. Динамические сообщества оранжерейных биоценозов в экспозициях тропических и субтропических растений // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2013б. 3: 716-727.
58. Корженевская Т.Г., Лобакова Е.С., Дольникова Г.А., Гусев М.В. Особенности топографии микросимбионтов в апогеотропных корнях саговников *Cycas revoluta* Thunb. и *Encephalartos horridus* (Jacq.) Lehm. // Микробиология. 1999. 68 (4): 501-507.
59. Корчагина И.А. Семязачаток. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. СПб. Мир и Семья. 1994. 1: 122-131.
60. Кочетков Н.К. (ред.). Методы химии углеводов. М.: Мир. 1967. 512 с.
61. Кравченко Л.В. Роль корневых экзометаболитов в интеграции микроорганизмов с растениями // Автореф. на соиск. уч. ст. д.б.н. Москва. 2000. 51 с.

62. Кравченко Л.В., Азарова Т.С., Макарова Н.М. и др. Роль триптофана в корневых экзометаболитах для фитостимулирующей активности ризобактерий // Микробиология. 2004. 2: 195-198.
63. Красильников Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения. Изд-во Академии Наук СССР, 1958. 463 с.
64. Кругова Е.Д. Специфические стратегии клубеньковых и фитопатогенных бактерий при инфицировании растений // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. 41 (1): 3-15.
65. Крюков Л.А., Широков А.И., Сырова В.В. Поливариантность онтогенеза *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo. в связи с вегетативным размножением протокормов *in vitro* // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2011. 1 (2): 71–78.
66. Кузнецова Е.Н., Вайшла О.Б. Вклад цитокининов в индуцированную устойчивость к фитовирусам // Экол. сегодня. 2001.1: 35-38.
67. Кулаева О.Н. Цитокинины, их структура и функция. М.: Наука. 1973. 263 с.
68. Кулаева О. Н., Кузнецов В. В. Новейшие достижения и перспективы в области изучения цитокининов // Физиология растений. 2002. 49: 626-640.
69. Куприянова Е.В., Лось Д.А., Кузнецов В.В., Кулаева О.Н. Возможное участие цианобактерий в формировании гормональной системы растений // Физиология растений 2014. 61 (2): 170–176.
70. Леонов, В. В., Миронов, А. Ю., Ананьина, И. В., Рубальская, Е. Е., Сентюрова, Л. Г. Микробные сидерофоры: строение, свойства, функции // Астраханский медицинский журнал. 2016. 11(4): 24-37.
71. Лисицина Р.А., Рахимбаев И.Р. Ауксиноксидазная система *Allium longicuspis* Regel. В Фитогормоны – регуляторы роста растений/ под. ред. Н.В. Цицина. М: Наука, 1980. 106-119.
72. Лыонг Т.М., Нечаева И.А., Петриков К.В., Пунтус И.Ф., Понаморева О.Н. Бактерии-нефтедеструкторы рода *Rhodococcus* – потенциальные продуценты биосурфактантов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2016. 1 (16): 50-60.
73. Макеева А.П., Краснопольская Л.М., Садовская В.Л. Закономерности накопления абсцизовой кислоты в погруженной культуре гриба *Cercospora rosicola*. // Прикладная биохимия и микробиология. 1999. 35 (4): 437-440.
74. Максимов И. В., Веселова С. В., Нужная Т. В., Сарварова Е. Р., Хайруллин Р. М. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам // Физиология растений. 2015. 62 (6): 763–775.
75. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование: методы генетической инженерии. Пер. с англ. М.: Мир. 1984. 479 с.
76. Манучарова Н.А., Власенко А.Н., Менько Е.В., Звягинцев Д.Г. Специфика хитинолитического микробного комплекса в почвах, инкубируемых при различных температурах // Микробиология. 2011. 80 (2): 219-229.
77. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Cohn в агросистемах // Уфимский науч. центр, Ин-т биологии. Москва : Наука. 2007. 145 с.
78. Ми Ф.Т., Емцев В.Т., Поздняков Л.А., Селицкая О.В. Биологическая активность ассоциативных бактерий, выделенных из ризопланы овощных растений Вьетнама *Ipomoea aquatica* L. и *Brassica integrifolia* L. // Известия ТСХА. 2014. 5: 24-35.
79. Миклашевич Э.П., Мишке И.В., Тевелева М.К., Чернин Л.С. Плазмида pPS136, определяющая синтез цитокининов у *Pseudomonas stutzeri* // Микроорганизмы – стимуляторы и ингибиторы роста растений и животных: Тез. докл. Всесоюз. Конф. Ташкент. 1989. 132.
80. Мишке И.В. Микробные фитогормоны в растениеводстве. Рига: Зинатне. 1988. 151 с.

81. Моргун В.В., Коць С.Я., Кириченко Е.В. Ростстимулирующие ризобактерии и их практическое применение // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. 41 (3): 187–207.
82. Мордухова Е.А., Скворцова Н.П., Кочетков В.В., Дубейковский А.Н., Боронин А.М. Синтез фитогормона индол-3-уксусной кислоты ризосферными бактериями рода *Pseudomonas* // Микробиология. 1991. 60 (3): 494-500.
83. Муромцев Г.С., Краснопольская Л.М. Штамм микромицета *Fusarium moniliforme* – продуцент фитогормонов гиббереллинов А₄, А₇ // Патент РФ. 1997. № 2084531.
84. Муронец Е.М., Белавина Н.В., Митронова Т.Н., Каменева С.В. Синтез индолилуксусной кислоты сапрофитной ассоциативной бактерией *Agrobacterium radiobacter* // Микробиология. 1997. 66 (4): 506-513.
85. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. Академия Москва, 2005. 608 с
86. Никишина Т.В., Попов А.С., Коломейцева Г.Л., Головкин Б.Н. Криогенное хранение семян некоторых тропических орхидных // Доклады РАН. 2001. 378 (4): 555-557.
87. Олескин А.В., Ботвинко И.В., Цавкелова Е.А. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов // Микробиология. 2000: 69 (3): 309-327.
88. Олескин А.В., Кировская Т.А., Ботвинко И.В., Лысак Л.В. Действие серотонина (5-окситриптамина) на рост и дифференциацию микроорганизмов // Микробиология. 1998. 67 (3): 305-312.
89. Олескин А.В., Эль-Регистан Г.И., Шендеров Б.А. Межмикробные химические взаимодействия и диалог микробиота- хозяин: роль нейромедиаторов // Микробиология. 2016. 85 (1): 3–25.
90. Олюнина Л.Н., Шабает В.П. Продуцирование индолил-3-уксусной кислоты ризосферными бактериями рода *Pseudomonas* в процессе роста // Микробиология. 1996. 65 (6): 813-817.
91. Павлова И.Б., Куликовский А.В., Ботвинко И.В., Джентимирова К.М., Дроздова Т.Д. Электронно-микроскопическое исследование развития бактерий в колониях. Морфология колоний бактерий // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. 1990. 9: 15-20.
92. Панкратова Е.М., трефилова Л.В., Зяблых Р.Ю., Устюжанин И.А. Цианобактерия *Nostoc paludosum* Kutz как основа для создания агрономически полезных микробных ассоциаций на примере бактерий рода *Rhizobium* // Микробиология. 2008. 77 (2): 266-272.
93. Панкратова Е.М. Значение в эволюции, экологии и практическом использовании естественных и искусственных цианобактериальных консорциумов // Сельскохозяй. микробиология в XIX-XXI вв.: Тез. докл. Всероссийская конференция. СПб, 2001: 65-66.
94. Панкратова Е.М. Участие цианобактерий в круговороте азота в почве и создании ее плодородия // Успехи микробиологии. М: Наука. 1987. 21: 212-242.
95. Панкратова Е.М., Мезенцева Г.В. Значение синезеленых водорослей (цианобактерий) в круговороте азота в почвах умеренной зоны // Бюл. ВНИИ с -х. микробиологии. 1985. 42: 48-51.
96. Петрова Е.В., Егорова М.А., Пискункова Н.Ф., Кожевин П.А., Нетрусов А.И., Цавкелова Е.А. Анаэробные целлюлозолитические микробные сообщества, разлагающие биомассу *Anabaena variabilis* // Микробиология. 2017. 86 (6): 729-738.
97. Поддубная-Арнольди В.А. Исследование процесса оплодотворения у некоторых покрытосеменных на живом материале. М.-Л. Бот. ж. 1958. 43 (2): 178-193.
98. Полевой В.В., Саламатова Т.С. Физиология роста и развития растений. Л. ЛГУ, 1991. 240 с.

99. Полевой В. В., Тараховская Е. Р., Маслов Ю. И., Полевой А. В. Роль ауксина в индукции полярности у зигот *F. vesiculosus* L. // Онтогенез. 2003. 34 (6): 432-437.
100. Полевой В.В. Фитогормоны. Л.: Изд-во Ленинградского университета. 1982. 248 с.
101. Полянская Л.М., Лукин С.М., Звягинцев Д.Г. Изменение состава микробной биомассы в почве при окультуривании // Почвоведение. 1997. 2: 206-212.
102. Прокудина Л.И., Осмоловский А.А., Егорова М.А., Нетрусов А.И., Цавкелова Е.А. Биоразложение целлюлозосодержащих субстратов микромицетами с последующей биоконверсией в биогаз // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. 52 (2): 200–209.
103. Рабинович М.Л., Мельник М.С. Прогресс в изучении целлюлолитических ферментов и механизм биodeградации высокоупорядоченных форм целлюлозы. // Успехи биологической химии. 2000. 40 (1): 205-266.
104. Работнов Т.А. Жизненный цикл многолетних травянистых растений в луговых ценозах // Тр. Ботан. ин-та АН СССР. (Сер. 3) 1950. 6: 7-201.
105. Рёлльке Ф. Орхидеи, так они растут лучше всего. М.: Лик пресс. 1998. 63 с.
106. Рощина В.В. Биомедиаторы в растениях. Ацетилхолин и биогенные амины. Пушино: ОНТИ ПНЦ АН СССР. 1991. 192 с.
107. Рубин Б.А. (ред.). Большой практикум по физиологии растений. М.: Высшая школа. 1978. 407 с.
108. Рудик В.Ф., Бурцева С.А., Растимешина И.О., Перевалов Р.Г. Влияние культуральной жидкости *Streptomyces canosus* 71 var. 6 на ростовые и регенерационные процессы в культуре тканей гвоздики // Микробиол. и биотех. На рубеже 21 столетия: мат. межд. Конф. Минск. 2000. С. 198.
109. Рязанова Т.В., Чупрова Н.А., Литовка Ю.А. Биоконверсия вегетативной части топинамбура микро- и макроскопическими грибами // Системы. Методы. Технологии. 2016. 1(29): 142-151.
110. Садыкова В.С., Лихачев А.Н., Бондарь П.Н. Ограничение развития комплекса возбудителей гнилей ячменя антагонистами рода *Trichoderma* // Микология и фитопатология. 2010. 44 (6): 556-562.
111. Садыкова В.С., Кураков А.В., Куварина А.Е., Рогожин Е.А. Антимикробная активность штаммов грибов рода *Trichoderma* из Средней Сибири // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. 51 (3): 340-347.
112. Сафронова И.Ю., Ботвинко И.В. Межклеточный матрикс *Bacillus subtilis* 271: полимерный состав и функции // Микробиология. 1998. 67 (1): 55-60.
113. Селиванов И. А. Микосимбиотрофизм как форма консервативных связей в растительном покрове Советского Союза. М.: Наука. 1981. 230 с.
114. Селицкая О.В., Емцев В.Т., Соколова А.Я., Колесников О.В. Особенности колонизации растений интродуцированной популяцией *Klebsiella planticola* при воздействии стрессовых факторов // Известия ТСХА. 2013. 1: 48-56.
115. Селях И.О., Семенова Л.Р. Влияние экзогенных аминокислот и фитогормонов на рост и структурные особенности цианобактерий. Проблемы экологии и физиологии микроорганизмов (к 110-летию со дня рождения проф. Е.Е.Успенского). Сборник трудов. М.: Диалог-МГУ. 2000. С. 94.
116. Сизова Т.П., Вахрамеева М.Г. Особенности микоризы любки двулистной и ятрышника Фукса в зависимости от их возрастного состояния // Вест. МГУ. 1984. 16 (2): 27-31.
117. Сеницын А.П., Короткова О.Г., Сеницына О.А., Рожкова А.М., Проскурина О.В., Осипов Д.О., Кондратьева Е., Чекушина А.В. Оптимизация состава целлюлазного ферментного комплекса *Penicillium verrucosum*: увеличение гидролитической способности с помощью методов генетической инженерии // Катализ в промышленности. 2015. 15 (6): 78-83.

118. Стахеев А.А., Самохвалова Л.В., Рязанцев Д.Ю., Завриев С.К. Молекулярно-генетические методы в исследовании таксономии и специфической идентификации токсинпродуцирующих грибов рода *Fusarium*: успехи и проблемы (обзор). Сельхоз Биол. 2016. 51 (3): 275-284.
119. Страховская М.Г., Иванова Е.В., Фрайкин Г.Я. Стимулирующее влияние серотонина на рост дрожжей *Candida guilliermondii* и бактерий *Streptococcus faecalis* // Микробиология. 1993. 62: 46-49.
120. Сытников Д.М., Воробей Н.А., Пацко Е.В. Реакция сои на инокуляцию альго-ризобияльными композициями // Біотехнологія. 2010. 3 (6): 42-48.
121. Тараховская Е.Р., Маслов Ю.И., Шишова М.Ф. Фитогормоны водорослей. Физиология растений. 2007. 54(2): 186-194.
122. Татаренко И.В. Микориза орхидных (Orchidaceae) приморского края // Бот. журнал. 1995. 80 (8): 64-72.
123. Татаренко И.В., Вахрамеева М.Г. Жизненные стратегии наземных евразийских орхидных // Охорона і культивування орхідей: Мат. міжнар. наук. конф. (Київ, вересень 1999 р.). Київ: Наукова думка. 1999. 82-83.
124. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Кооперация растений и микроорганизмов: новые подходы к конструированию экологически устойчивых агроecosистем. Успехи соврем. биол. 2007. 127 (4): 339-357.
125. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агроecosистем будущего. СПб: Из-во Санкт-Петербургского университета. 2009. 209 с.
126. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Сельскохозяйственная микробиология как основа экологически устойчивого агропроизводства: фундаментальные и прикладные аспекты // Сельскохозяй. Биол. 2011а. 3: 3-9.
127. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Сибриогенетика микробно-растительных взаимодействий // Экол. генетика. 2011б. 1: 36-46.
128. Ткаченко Ф.П., Топтиков В.А. Экстракты морских водорослей как стимуляторы начальных этапов развития растений ячменя. // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н.Каразіна. Серія: біологія. 2008. 7 (814): 199-204.
129. Трейвас Л.Ю., Каштанова О.А., Коломейцева Г.Л., Лукьянова Т.А. Болезни и вредители коллекции орхидей ГБС РАН // Охорона і культивування орхідей: Мат. міжнар. наук. конф. (Київ, вересень 1999 р.). Київ: Наукова думка. 1999. 128-129.
130. Троценко Ю.А., Иванова Е.Г., Доронина Н.В. Аэробные мезофитотрофные бактерии как фитосимбионты // Микробиология. 2001. 70 (6): 725-736.
131. Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация. М.: Изд-во МГУ. 1986. 134 с.
132. Уоллес А. Тропическая природа. М.: Географгиз. 1956. 223 с.
133. Усов А.И. Олигосахариды – новый класс сигнальных молекул в растениях // Успехи химии, 1993. 62 (11): 1119-1144.
134. Феофилова Е.П., Мысякина И.С. Лигнин: химическое строение, биодegradация, практическое использование (Обзор). 2016. 52 (6): 559-569.
135. Фёдоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Фитосимбиоз аэробных мезобактерий: новые факты и гипотезы // Микробиология. 2011. 80 (4): 435-446.
136. Холодный Н.Г. Фитогормоны. Киев: Изд-во АН УССР. 1939. 264 с.
137. Хуха Ф. Нейрохимия. Основы и принципы. М.: Мир, 1990. 370 с.
138. Цавкелова Е.А. Микроорганизмы, ассоциированные с оранжерейными орхидными. Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук. Москва. 2003. 161 с.
139. Цавкелова Е.А., Чердынцева Т.А., Лобакова Е.С., Коломейцева Г.Л., Нетрусов А.И. Микробиота поверхности корней орхидных // Микробиология. 2001. 70 (4): 567-573.

140. **Цавкелова Е.А.**, Лобакова Е.С., Коломейцева Г.Л., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Особенности локализации ассоциативных цианобактерий на корнях эпифитных орхидей // Микробиология. 2003а. 72 (1): 99-104.
141. **Цавкелова Е.А.**, Лобакова Е.С., Коломейцева Г.Л., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Ассоциативные цианобактерии, выделенные с корней эпифитных орхидей // Микробиология. 2003б. 72 (1): 105-110.
142. **Цавкелова Е.А.**, Александрова А.В., Чердынцева Т.А., Коломейцева Г.Л., Нетрусов А.И. Грибы, ассоциированные с корнями орхидей в условиях оранжереи // Микология и фитопатология. 2003в. 37: 57-63.
143. **Цавкелова Е.А.**, Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Образование фитогормонов грибами, ассоциированными с орхидными // Микология и фитопатология. 2003г. 37: 75-83.
144. **Цавкелова Е.А.**, Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Бактерии, ассоциированные с корнями эпифитных орхидей // Микробиология. 2004. 73: 825-831.
145. **Цавкелова Е.А.**, Александрова А.В., Чердынцева Т.А., Коломейцева Г.Л., Нетрусов А.И. Ассоциативные микромицеты тропических вьетнамских орхидей // Микология и фитопатология. 2005а. 39: 46-52.
146. **Цавкелова Е.А.**, Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Образование ауксинов бактериями, ассоциированными с корнями орхидей // Микробиология. 2005б. 75: 55-62.
147. **Цавкелова Е.А.**, Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // Прикладная биохимия и микробиология. 2006а. 42 (2): 133-143.
148. **Цавкелова Е.А.**, Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Соединения микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология. 2006б. 42 (3): 261-268.
149. **Цавкелова Е.А.**, Тепляков В.В., Нетрусов А.И. Выделение и изучение микробных сообществ, образующих биогаз при разложении целлюлозы. Москва: Макс Пресс. 2011. 24 с.
150. **Цавкелова Е.А.**, Нетрусов А.И. Получение биогаза из целлюлозосодержащих субстратов // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. 48 (5): 469-483.
151. **Цавкелова Е.А.**, Егорова М.А., Петрова Е.В., Нетрусов А.И. Термофильные анаэробные микробные сообщества, разлагающие целлюлозу с образованием метана (биогаза) // Вестн. Московского университета. Серия Биология. 2012а. 2:36-42.
152. **Цавкелова Е.А.**, Егорова М.А., Петрова Е.В., Нетрусов А.И. Образование биогаза микробными сообществами при разложении целлюлозы и пищевых отходов. Прикладная биохимия и микробиология. 2012б. 48 (2): 417-424.
153. Чайлахян М.Х. Гормональная регуляция роста и развития высших растений // Успехи соврем. биологии. 1982. 95 (1): 23-34.
154. Чеботарь В.К., Мальфанова Н.В., Щербаков А.В., Ахтемова Г.А., Борисов А.Ю., Люгтенберг Б., Тихонович И.А. Эндифитные бактерии в микробных препаратах, улучшающих развитие растений. Прикладная биохимия и микробиология. 2015. 51. №3. С.1-8
155. Черевченко Т. М. Тропические и субтропические орхидеи. Киев: Наук. думка. 1993. 253 с.
156. Черевченко Т.М., Кушнир Г.П. Орхидеи в культуре. Киев: Наукова думка. 1986. 200 с.
157. Черевченко Т.М., Заименко Н.В., Мартыненко Е.И. Биохимические особенности видов орхидных различных экотипов // Физиол. и биохим. культурных растений. 2000. 32 (2): 121-127.
158. Чуб В.В. Рост и развитие растений. 2003, URL: http://herba.msu.ru/russian/departments/physiology/spezkursi/chub/index_7.html

159. Шабает В.П. Почвенно-агрохимические аспекты ремедиации загрязненной свинцом серой лесной почвы при внесении стимулирующих рост растений // Почвоведение. 2012. 5: 601-611.
160. Шамров И.И. Семязачаток цветковых растений: строение, функции, происхождение. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. 350 с.
161. Шапошников А.И., Белимов А.А., Кравченко Л.В., Виванко Д.М. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями: механизмы образования и факторы эффективности асоциативных симбиозов (обзор) // Сельскохозяй. Биология. 2011. 3: 16-22.
162. Шевченко Г. В., Каравайко Н. Н., Селиванкина С. Ю., Зубкова Н. К. и др. Обнаружение АБК-связывающих белков в цианобактериях (*Synechocystis* sp. PCC 6803) // Вест. РУДН. Агроном. Животновод. 2010. 1: 13-18.
163. Шишов В.А., Кировская Т.А., Кудрин В.С., Олескин А.В. Нейромедиаторные амины, их предшественники и продукты окисления в биомассе и супернатанте культуры *Escherichia coli* K-12 // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. 45 (5): 550-554.
164. Шишова М.Ф., Линдберг С., Полевой В.В. 1999. Активация ауксином транспорта Ca^{2+} через плазмалемму растительных клеток // Физиология Раст. 46 (5): 718-727.
165. Эмер Н.Р., Костина Н.В., Нетрусов А.И., Жебрак И.С., Кожевин П.А. Анализ состояния почвенного микробного сообщества при длительной антропогенной нагрузке // Вестник Московского университета. Серия 17: Почвоведение. 2019. 4: 55-61.
166. Abadie J-C., Püttsepp Ü., Gebauer G., Faccio A., Bonfante P., Selosse M-A. *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is mixotrophic: a comparative study between green and nonphotosynthetic individuals // Can J Bot. 2006. 84: 1462-1477.
167. Achari G.A., Ramesh R. Diversity, biocontrol, and plant growth promoting abilities of xylem residing bacteria from solanaceous crops // Int J Microbiol. 2014. 2014:296521.
168. Afzal I., Afzal I., Chinaware Z.K., Sikandar S., Shahzad S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants // Microbiol Res. 2019. 221:36-49.
169. Agrios G.N. (ed.). Plant pathology. New York: Academic Press. 4th edn. 1997, 635 p.
170. Abdala G., Miersch O., Correa N., Rosas S. Detection of jasmonic acid in cultures of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* // Natural Product Letters. 1999. 14 (1): 55-63.
171. Ahemad M., Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. Journal of King Saud University-Science. 2014. 26 (1): 1-20.
172. Adams D.G. Symbiotic interactions. In: Whitton B., Potts M. (eds.) / Ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2000, pp. 523-561.
173. Adams P.B. *Dendrobium bigibbum* (sect. Phalaenanthae) in Australia — analysis of diagnostic characters, review of taxa and a new classification // Kew Bull. 2015. 70: 16.
174. Adams D.G., Bergman B., Nierzwicki-Bauer S.A., Duggan P.S., Rai A.N., Schüßler A. Cyanobacterial-Plant Symbioses. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory F., Stackebrandt E., Thompson F. (eds.) / The prokaryotes: prokaryotic biology and symbiotic associations. Berlin: Springer Press. 4th edn. 2013, pp. 359-392.
175. Adams D.G., Bergman B., Nierzwicki-Bauer S.A., Rai A.N., Schussler A. Cyanobacterial-plant symbioses. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. (eds.) / The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria, vol 1, 3rd edn. / Symbiotic associations, biotechnology, applied microbiology. NY: Springer. 2006, pp. 331-363.
176. Adams D.G., Duggan P.S. Cyanobacteria-bryophyte symbioses // J Exp Bot. 2008. 59:1047-1058.

177. Adams D.G., Duggan P.S. Signaling in cyanobacteria–plant symbioses. In: Perotto S., Baluška F. (eds.) / Signaling and communication in plant symbiosis. Berlin, Heidelberg: Springer. 2012, pp. 93–121.
178. Adhikary S.P., Sahu J.K. UV protecting pigment of the terrestrial cyanobacterium *Tolypothrix bissoidea* // J Plant Physiol. 1998. 153 (5-6): 770-773.
179. Ahmad F., Ahmad I., Khan M. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities // Microbiological Research. 2008. 163: 173–181.
180. Ahmad M., Winter A. Studies on the hormonal relationships of algae in pure culture. III. Tryptamine is an intermediate in the conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by the blue-green alga *Chlorogloopsis fritschii* // Planta. 1969. 88 61-66.
181. Ahmed I., Abbas S., Kudo T., Iqbal M., Fujiwara T., Ohkuma M. *Deinococcus citri* sp. nov., isolated from citrus leaf canker lesions // Int J Syst Evol Microbiol. 2014. 64 (12): 4134-4140.
182. Ahemad M, Khan MS. Plant growth promoting activities of phosphatesolubilizing *Enterobacter asburiae* as influenced by fungicides // Eurasia J Biosci. 2010. 4(1): 88-95.
183. Ajitkumar P., Cherayil J. Presence of 2-methylthioribosyl-trans-zeatin in *Azotobacter vinelandii* tRNA // J Bacteriol. 1985. 162 (2): 752-755.
184. Akiyoshi D.E., Klee H., Amasino R.M., Nester E.W., Gordon M.P. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis // Proc Natl Acad Sci USA. 1984. 81:5994–98.
185. Al-Awadhi H., El-Nemr I., Mahmoud H., Sorkhoh N.A., Radwan S.S. Plant-associated bacteria as tools for the phytoremediation of oily nitrogen-poor soils. Int J Phytorem. 2009. 11(1): 11–27.
186. Alconero R. Mycorrhizal synthesis and pathology of *Rhizoctonia solani* in *Vanilla* orchid roots // Phytopathol. 1969. 59:426–430.
187. Ali B., Sabri A.N., Ljung K., Hasnain S. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.) // World J Microbiol Biotechnol. 2009. 25: 519–526.
188. Ali Shah F., Mahmood Q., Maroof Shah M., Pervez A., Ahmad Asad S. Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis // Sci World J. 2014: 1-21.
189. Alvarez-Perez S., Herrera C.M. Composition, richness and nonrandom assembly of culturable bacterial-microfungal communities in floral nectar of Mediterranean plants // FEMS Microbiol Ecol. 2013. 83: 685–699.
190. Ames R.N., Bethlenfalvay G.J. Mycorrhizal fungi and the integration of plant and soil nutrient dynamics // J Plant Nutr. 1987. 10: 1313–1321.
191. Anderson J.A., Filonow A.B., Vishniac H.S. *Cryptococcus humicola* inhibits development of lesions in “Golden Delicious” apples // Hort Science. 1997. 32: 1235–1236.
192. Andrews J.H., Harris R.F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces // Ann Rev Phytopathol. 2000. 38 (1): 145-180.
193. Angelidaki I., Karakashev D., Batstone D. J., Plugge C. M., Stams A. J. Biomethanation and its potential // Methods in enzymology. 2011. 494: 327-351.
194. Angra-Sharma R., Sharma D.K. Cytokinins in pathogenesis and disease resistance of *Pyrenophora teres*–barley and *Drechslera maydis*–maize interactions during early stages of infection // Mycopathologia. 1999. 148: 87–95.
195. Ansari M., Sridhar R. Some tryptophan pathways in the phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* // Folia Microbiol. 2000. 45 (6): 531-537.
196. Antal Z., Kredics L., Manczinger L., Ferenczy L. Extracellular enzyme profiles of mycoparasitic *Trichoderma* strains // Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens IOBC wprs Bulletin. 2001. 24 (3): 337-340.
197. Antizar-Ladislao B., Turrion-Gomez J. L. Second-generation biofuels and local bioenergy systems. // Biofuels, Bioproducts and Biorefining. 2008. 2 (5): 455-469.

198. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 2004. 55: 373-399.
199. Apine O., Jadhav J. Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM // *J Applied Microbiol.* 2011. 110: 1235-1244.
200. Arditti J. The orchid root // *Orchid Society Calif. Rev.* 1962. 4 (4): 10-12.
201. Arditti J. Niacin biosynthesis in germinating *Laeliocattleya* orchid embryos and young seedlings // *Amer J Bot.* 1967: 54 (3): 291-298.
202. Arditti J. An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture // *Bot J Linn Soc* 1984. 89:359–381.
203. Arditti J. Orchid seed germination as it relates to natural habitat // *Keseimbangan penyelidikan, asas dan gunaan biologi. Simp. Biol. Kebangsaan, 22-24 nov. 1988. Bangi: Penerbit Univ. Kebangsaan.* 1991: 71-74.
204. Arditti J. *Fundamentals of orchid biology.* John Wiley & Sons, New York, NY. 1992, pp. 691.
205. Arditti J. *Micropropagation of Orchids.* Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 2008, 1523 p.
206. Arditti J., Ghani A.K.A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytol.* 2000. 145: 367–421.
207. Arditti J., Flick B.H., Ehmann A., Fisch M.H. Orchid phytoalexins. II. Isolation and characterization of possible sterol companions // *Amer J Bot.* 1975. 62 (7): 738-742.
208. Arditti J., Michaud J.D., Oliva A. Seed germination of North American orchid. 1. Native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia* and *Platanthera* // *Bot Gaz.* 1981. 142 (4): 442-453.
209. Arditti J., Oliva A., Michaud J.D. Practical germination of North American and related orchids. – 3 – *Calopodon tuberosus*, *Calypso bulbosa*, *Cypripedium* species and hybrids, *Piperia elegans* var. *elata*, *Piperia maritime*, *Platanthera hyperborean*, and *Platanthera saccata* // *Amer Orchid Soc Bull.* 1985. 54 (7): 859-866.
210. Arditti J., Pridgeon A.M. (eds.) *Orchid biology: reviews and perspectives.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1997, 394 p.
211. Arshad M., Frankenberger W. Biosynthesis of ethylene by *Acremonium falciforme* // *Soil Biol Biochem.* 1989. 21: 633-638.
212. Aschan C., Pfanz H., Aschan G., Pfanz H. Non-foliar photosynthesis: a strategy of additional carbon acquisition /// *Flora*, 2003. 198: 81–97.
213. Assante W.B., Merlini L., Nahimi G. (+)-Absciscic acid, a metabolite of the fungus *Cercospora rosicola* // *Experientia.* 1977. 33:1556-1557.
214. Audenaert K., De Meyer G.B., Hofte M.M. Absciscic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms // *Plant Physiol.* 2002. 128: 491–501.
215. Aunpad R., Na-Bangchang K. Pumilicin A. Novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4 // *Curr Microbiol.* 2007. 55: 308–313.
216. Averyanov L.V., Nguen K.S., Maisak T.V. *Chiloschista pulchella* (Orchidaceae: Aeridinae) new orchid species from Lao PDR // *Taiwania.* 2018. 63(4): 389-392.
217. Badger M.R., Price G.D., Long B.M., Woodger F.J. The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism // *J Exp Bot.* 2006. 57: 249–265.
218. Bae H., Roberts D.P., Lim H.S., Strem M.D., Park S.C., Ryu C.M., Melnick R.L., Bailey B.A.. Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms // *Mol Plant Microbe Interact.* 2011. 24: 336-351.
219. Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms // *Annu Rev Plant Biol.* 2006. 57:234–266.

220. Bajguz A., Asami T. Effects of brassinazole, an inhibitor of brassinosteroid biosynthesis, on light- and dark-grown *Chlorella vulgaris* // *Planta*. 2004. 218 (5): 869-877.
221. Bajguz A., Hayat S.: Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses // *Plant Physiol Biochem*. 2009. 47: 1–8.
222. Baldotto B.L.E., Olivares F.L. Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system // *Canadian J Microbiol*. 2008. 54: 918-931.
223. Balzarini J., Neyts J., Schols D., Hosoya M., VanDamme E., Peumans W., De Clercq E. The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium* hybrid and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)n-specific plantlectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiencyvirus and cytomegalovirus replication in vitro // *Antiviral Res*. 1992. 18: 191–207.
224. Banat I.M., Franzetti A., Gandolfi I. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010. 87: 427–444.
225. Banerji M.L., Pradhan P. The orchids of Nepal Himalayas. Vaduz: A.R. Ganter Verlag K.G. 1984, 534 p.
226. Bar T., Okon Y. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7 // *Canadian J Microbiol*. 1993. 39: 81-86.
227. Barciszewski J, Mielcarek M, Stobiecki M, Siboska G, Clark BF. Identification of 6-furfuryladenine (kinetin) in human urine. *Biochem Biophys Res Commun* // 2000. 279: 69–73.
228. Barea J.M., Navarro E., Montoya E. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria // *J Appl Bact*. 1976. 40: 129-134.
229. Barea J.M., Navarro E., Palomares A., Montoya E. A rapid microbial assay for auxins, gibberellic acid and kinetin using yeast // *J Appl Bact*. 1974. 37: 171-174.
230. Barhoom S., Sharon A. cAMP regulation of "pathogenic" and "saprophytic" fungal spore germination // *Fungal Gen Biol*. 2004. 41 (3): 317-326.
231. Barker S., Tagu D. The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses // *J Plant Growth Regul*. 2000. 19: 144–154.
232. Barroso J., Neves H., Pais M.S. Production of indole-3-ethanol and indole-3-acetic acid by the mycorrhizal fungus of *Ophrys lutea* (Orchidaceae) // *New Phytol*. 1986. 103: 745-749.
233. Barry G.F., Rogers S.G., Fraley R.T., Brand L. Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1984. 81: 4776–80
234. Bashan Y., Carrillo A., Holguin G. New synthetic and multi-species bacterial inoculants for plant growth-promoting rhizobacteria // *Abstr. 10th Int. Congr. On Nitrogen Fixation: St.Petersburg*. 1995: 413.
235. Basu S., Sun H., Brian L., Quatrano R., Muday G. Early embryo development in *Fucus distichus* is auxin sensitive // *Plant Physiol*. 2002. 130 (1): 292-302.
236. Batty, A.L., Dixon K., Brundrett M., Sivasithamparam K. Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a mediterranean bushland // *New Phytol*. 2001a. 152: 511–520.
237. Batty A.L., Dixon K.W., Brundrett M., Sivasithamparam K. Long-term storage of mycorrhizal fungi and seed as a tool for the conservation of endangered Western Australian terrestrial orchids // *Australian Journal of Botany*. 2001b. 49: 1-10.
238. Batty A.L., Dixon K.W., Brundrett M., Sivasithamparam K. Orchid conservation and mycorrhizal associations. In: *Microorganisms in plant conservation and biodiversity*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2002: 195-226.
239. Batty A.L., Brundrett M.C., Dixon K.W., Sivasithamparam K. New methods to improve symbiotic propagation of temperate terrestrial orchids from axenic culture to soil // *Australian Journal of Botany*. 2006. 54: 367-374.
240. Baulina O.V. Ultrastructural plasticity of cyanobacteria under dark and high light intensity conditions. In: *Ultrastructural plasticity of cyanobacteria*. Springer, Berlin. 2012: 11-63.

241. Bearder J.P.R. In vitro diterpenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. The pathway after ent-kaurene. In: Crozier A (ed.) / The biochemistry and physiology of gibberellin. NY: Praeger. 1983, pp. 251-388.
242. Beattie G.A., Lindow S.E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies // Phytopathology. 1999. 89 (5): 353-359.
243. Beauregard P.B., Chai Y., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. Biofilm induction by plant polysaccharides // PNAS. 2013. 110 (17): E1621-E1630.
244. Becker-Hapak M., Troxter E., Hoerter J., Eisenstark A. RpoS-dependent overexpression of carotenoids from *Erwinia herbicola* in OxyR-deficient *Escherichia coli* // Biochem Biophys Res Commun. 1997. 239: 305-309.
245. Behrendt U., Ulrich A., Schumann P. Description of *Microbacterium foliorum* sp. nov. and *Microbacterium phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of grasses and the surface litter after mulching the sward, and reclassification of *Aureobacterium resistens* (Funke et al. 1998) as *Microbacterium resistens* comb. nov. // Int J Syst Evol Microbiol. 2001. 51(4): 1267-1276.
246. Behrendt U., Schumann P., Ulrich A. *Agrococcus versicolor* sp. nov., an actinobacterium associated with the phyllosphere of potato plants // IJSEM. 2008. 58: 2833-2838.
247. Belimov A., Safronova V., Sergeyeva T., Egorova T., Matveyeva V., Tsyganov V., Borisov A., Tikhonovich I., Kluge C., Preisfeld A., Dietz K., Stepanok V. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase // Can J Microbiol. 2001. 47 (7): 642-652.
248. Beneduzi A., Peres D., Vargas L.K., Bodanese-Zanettini M.H., Passaglia L.M.P. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing *Bacilli* isolated from rice fields in South Brazil // Appl Soil Ecol. 2008. 39: 311-320.
249. Benjamins R., Scheres B. Auxin: the looping star in plant development // Annu Rev Plant Biol. 2008. 59: 443-465.
250. Belnap J. Factors influencing nitrogen fixation and nitrogen release in biological soil crusts. In: Belnap J., Lange O.L. (eds.). Biological soil crusts: structure, function, and management. Ecological studies (analysis and synthesis). Berlin, Heidelberg: Springer. 2001, pp. 241-261.
251. Benzing D.H., Ott D.W. Vegetative reduction in epiphytic Bromeliaceae and Orchidaceae: its origin and significance // Biotropica 1981. 13: 131-140.
252. Benzing D.H. Why is Orchidaceae so large, its seeds so small, and its seedlings mycotrophic // Selbyana. 1981. 5: 241-224.
253. Benzing D.H. Mycorrhizal infection of epiphytic orchids in South Florida // Amer Orch Soc Bull. 1982. 51 (6): 618-622.
254. Benzing D.H. The genesis of orchid diversity: emphasis on floral biology lead misconceptions // Lindleyana. 1986. 1 (2): 73-89.
255. Benzing D.H. Vascular epiphytism: taxonomic participation and adaptive diversity // Ann Miss Botan Garden. 1987. 74 (2): 183-204.
256. Benzing D.H., Friedman W.E. Mycotrophy: its occurrence and possible significance among epiphytic Orchidaceae // Selbyana. 1981. 5: 243-247.
257. Berg G., Krechel A., Ditz M., Sikora R. A., Ulrich A., Hallmann J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi // FEMS Microbiol Ecol. 2005. 51 (2): 215-229.
258. Berg G., Rybakova D., Grube M., Köberl M. The plant microbiome explored: implications for experimental botany // J Exp Bot. 2016. 67 (4): 995-1002.
259. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edn. NY: Springer. 2001-2012. 5 vs.
260. Bergman B., Rai A.N., Johansson C., Söderback E. Cyanobacteria-plant symbioses // Symbioses. 1993. 14: 61-81.
261. Bergman B., Rai A.N., Rasmussen U. Cyanobacterial Associations. In: Elmerich C., Newton W.E. (eds.) / Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial

- associations. Nitrogen fixation: origins, applications, and research progress. Dordrecht: Springer. 2007 (5), pp. 257-301.
262. Berliner M. Hormone effects on *Cosmarium botrytis* cell division // Cytobios. 1981. 30 (118): 89-99.
 263. Berrocal-Lobo M., Molina A. Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum* // Mol Plant Microbe Interact. 2004. 17 (7): 763-770.
 264. Besserer A., Puech-Pagés V., Kiefer P. et al. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria // PLoS Biol. 2006. 4: 1239–1247.
 265. Bertaux J.; Schmid M., Prevost-Boure N., Churin J.L., Hartmann A., Garbaye J. Frey-Klett P. In situ identification of intracellular bacteria related to *Paenibacillus* spp. in the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N // Appl Environ Microbiol. 2003. 69: 4243-4248.
 266. Beyrle H.F., Smith S.E., Peterson R.L., Franco C.M.M. Colonization of *Orchis morio* protocorms by mycorrhizal fungus: effects of nitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses // Can J Bot. 1995. 73: 1128-1140.
 267. Bhargava P., Khan M., Verma A., Singh A. et al. Metagenomics as a tool to explore new insights from plant-microbe interface. In: Varma A., Tripathi S., Prasad R. (eds.) / Plant microbe interface. Cham: Springer. 2019, pp. 271-289.
 268. Bharucha U., Patel K. Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*) // Agric Res. 2013. 2(3): 215-221.
 269. Bhat M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology // Biotechnol Adv. 2000. 18: 355–383.
 270. Bhattacharyya P.N., Jha D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World J Microbiol Biotechnol. 2012. 28: 1327-1350.
 271. Bianco C., Defez R. Medicago truncatula improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. J Exp Bot. 2009. 60 (11): 3097–3107.
 272. Bianco C., Imperlini E., Calogero R., Senatore B. et al. 2006a. Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress // Arch Microbiol. 185: 373–382.
 273. Bianco C., Imperlini E., Calogero R., Senatore B. et al. Indole-3-acetic acid regulates the central metabolic pathways in *Escherichia coli* // Microbiol. 2006b. 152 (8): 2421-2431.
 274. Bidartondo M.I., Burghardt B., Gebauer G., Bruns T.D., Read D.J. Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees // Proc R Soc Lond B. 2004. 271: 1799–1806.
 275. Bidartondo M.I., Read D.J. Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development // Mol Ecol. 2008. 17: 3707–3716.
 276. Billington D., Golding B., Primrose S. Biosynthesis of ethylene from methionine. Isolation of the putative intermediate 4-methylthio-2-oxobutanoate from culture fluids of bacteria and fungi // Biochem J. 1979. 182 (3): 827-836.
 277. Blakeman J.P., Mokahel M.A., Hadley G. Effect of mycorrhizal infection on respiration and activity of some oxidase enzymes of orchid protocorms. 1976. New Phytol. 77 (3): 697-704.
 278. Bloemberg G.V., Wijffjes A.H.M., Lamers G.E.M., Stuurman N., Lugtenberg B.J.J. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities // Mol Plant Microbe Interact. 2000. 13: 1170–1176.
 279. Bottomley P.J., Maggard S.P. Determination of viability within serotypes of a soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* // Appl Environ Microbiol. 1990. 56 (2): 533–40.

280. Böhm G. A., Pfeleiderer W., Böger P., Scherer S.J. Structure of a novel oligosaccharide-mycosporine-amino acid ultraviolet A/B sunscreen pigment from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* // Biol Chem. 1995. 270: 8536-8539.
281. Bömke C., Tudzynski B. Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria // Phytochem. 2009. 70: 1876–1893.
282. Bömke C., Rojas M.C., Gong F., Hedden P., Tudzynski B. Isolation and characterization of the gibberellin biosynthetic gene cluster in *Sphaceloma manihoticola* // Appl Environ Microbiol. 2008a. 74: 5325–5339.
283. Bömke C., Rojas M.C., Hedden P., Tudzynski B. Loss of gibberellin production in *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A) is due to a deletion in the gibberellic acid gene cluster // Appl Environ Microbiol. 2008b. 74: 7790–7801.
284. Bonnardeaux Y., Brundrett M., Batty A., Dixon K., Koch J., Sivasithamparam K. Diversity of mycorrhizal fungi in terrestrial orchids: compatability webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions // Mycol Res. 2007. 111: 51–61.
285. Boot K.J.M., van Brussel A.A.N., Tak T., Spaink H.P., Kijne J.W. Lipochitin oligosaccharides from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* reduce auxin transport capacity in *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots // Mol Plant Microbe Interact. 1999. 12 (10): 839-844.
286. Bottini M., Pearce D., Pharis R.P. Identification of gibberellins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum* // Plant Physiol. 1989. 90. 45–47.
287. Bougoure J.J., Brundrett M., Grierson P.F. Carbon and nitrogen supply to the underground orchid // New Phytologist. 2010. 186: 947– 956.
288. Bougoure J., Ludwig M., Brundrett M., Cliff J. et al. High-resolution secondary ion mass spectrometry analysis of carbon dynamics in mycorrhizas formed by an obligately myco-heterotrophic orchid // Plant Cell Environ. 2014. 37: 1223-1230.
289. Boutte C., Grubisic S., Balthasart P. Testing of primers for the study of cyanobacterial Wilmutte molecular diversity by DGGE /// J Microbiol Meth. 2006. 65 (3): 542-550.
290. Buyun L., Tkachenko H., Osadowski Z., Kovalska L., Gyrenko O. The antimicrobial activity of ethanolic extract obtained from leaves of *Coelogyne brachyptera* Rchb. F.(*Orchidaceae*) // Agrobiologiya. 2017 (1): 171-177.
291. Brandl M., Lindow S. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola* // Appl Environ Microbiol. 1996. 62 (11): 4121-4128.
292. Broeckling C.D., Broz A.K., Bergelson J., Manter D.K., Vivanco J.M.. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity // Appl Environ Microbiol. 2008. 74 (3): 738-744.
293. Brückner B., Blechschmidt D. Nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. Appl Microbiol Biotechnol. 1991. 53: 646-650.
294. Bulpitt C.J., Li Y., Bulpitt P.F., Wang J. The use of orchids in Chinese medicine // J Royal Soc Medicine. 2007. 100 (12): 558-563
295. Burgeff H. Mycorrhiza of orchids. In: Wither K. (ed.) / The orchids – scientific observe. 1959, pp. 361-395.
296. Büdel B. Ecology and diversity of rock-inhabiting cyanobacteria in tropical regions. Europ J Phycol. 1999. 34 (4): 361-370.
297. Cacciari I., Lippi D., Pietrosanti T., Pietrosanti W. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter* // Plant and Soil. 1989. 115: 151-153.
298. Cameron D.D., Leake J.R., Read D.J. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens* // New Phytol. 2006. 171: 405-416.

299. Campbell E.L., Meeks J.C. Characteristics of hormogonia formation by symbiotic *Nostoc* spp. in response to the presence of *Anthoceros punctatus* or its extracellular products // Appl Environ Microbiol. 1989. 55: 125–131.
300. Carlsen T., Aas A.B., Lindner D., Vrålstad T., Schumacher T., Kausrud H. Don't make a mistake: is tag switching an overlooked source of error in amplicon pyrosequencing studies? // Fungal Ecol. 2012. 5 (6): 747–749
301. Carlswald B.S., Whitten W.M., Williams N.H., Bytner B. Molecular phylogenetics of *Vandaeae* (Orchidaceae) and the evolution of leaflessness // Amer J Bot. 2006. 93: 770–786.
302. Casamatta D.A., Johansen J.R., Vis M.L., Broadwater S.T. Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the *Oscillatoriales* (Cyanobacteria) // J Phycol. 2005. 41: 421–438.
303. Casamatta D., Hašler P. Blue-green algae (Cyanobacteria) in rivers // River Algae. 2016. 5–34.
304. Cassán F., Perrig D., Sgroi V., Luna V. Basic and technological aspects of phytohormone production by microorganisms: *Azospirillum* sp. as a model of plant growth promoting rhizobacteria. In: Maheshwari DK (ed.) / Bacteria in agrobiol. Plant nutrient management. Berlin, Heidelberg: Springer. 201 pp. 141–182.
305. Chagué V., Danit L.V., Siewers V., Schulze-Gronover C., Tudzynski P., Tudzynski B., A. Sharon. Ethylene sensing and gene activation in *Botrytis cinerea*: a missing link in ethylene regulation of fungus-plant interactions? // Mol Plant Microbe Interact. 2006. 19: 33–42.
306. Chalutz E., Kapulnik E., Chet I. Fermentative production of ethylene by *Penicillium digitatum* from citrus fruit peel. Eur J Appl Microbiol Biotechnol. 1983. 18: 293–297.
307. Chan K.G., Atkinson S., Mathee K., Sam C.K. et al. Characterization of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria associated with the *Zingiber officinale* (ginger) rhizosphere: co-existence of quorum quenching and quorum sensing in *Acinetobacter* and *Burkholderia* // BMC microbiology. 2011. 11: 51.
308. Chanclud E., Morel J-B. Plant hormones: a fungal point of view // Mol Plant Pathol. 2016. 17 (8): 1289–1297.
309. Chang D.C.N. The screening of orchid mycorrhizal fungi (OMF) and their applications. In: Chen WH, Chen HH (eds.) / Orchid biotechnology. Singapore: World Scientific Publishing. 2007, pp. 77–98.
310. Chaparro J., Badri D., Vivanco J. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development // ISME J. 2014. 8: 790–803.
311. Chen A., Kroon P.A., Poulter C.D. Isoprenyl diphosphate synthases: protein sequence comparison, a phylogenetic tree, and predictions of secondary structure // Prot Sci. 1994. 3: 600–607.
312. Chen Z., Chen S., Lu G. et al. Phosphorus limitation for the colony formation, growth and photosynthesis of an edible cyanobacterium, *Nostoc sphaeroides* // Biotechnol Lett. 2012. 34: 137–143.
313. Chen X.M., Dong H.L., Hu K.X., Sun Z.R., Chen J., Guo S.X. Diversity and antimicrobial and plant-growth-promoting activities of endophytic fungi in *Dendrobium loddigesii* Rolfe. // Plant Growth Regul. 2010. 29:328–337.
314. Chen C.A., Chen C.C., Shen C.C., Chang H.H., Chen Y.J. Moscatilin induces apoptosis and mitotic catastrophe in human esophageal cancer cells // J Med Food. 2013. 16 (10): 869–877.
315. Chen J., Hu K.X., Hou X.Q., Guo S.X. Endophytic fungi assemblages from 10 *Dendrobium* medicinal plants (Orchidaceae) // World J Microbiol Biotechnol. 2011. 27: 1009–1016.
316. Chen J., Wang H., Guo S.X. Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae). Mycorrhiza 2012. 22: 297–307.

317. Choi W.Y., Rim S.O., Lee J.H., Lee J.M., Lee I.J., et al. Isolation of gibberellins producing fungi from the root of several *Sesamum indicum* plants // J Microbiol Biotechnol. 2005. 15: 22–28.
318. Choi J., Choi D., Lee S., Ryu C.-M., Hwang I. Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? // Trends Plant Sci. 2011. 16: 388–39.
319. Chomicki G., Bidel L.P.R., Ming F., Coiro M., Zhang X., et al. The velamen protects photosynthetic orchid roots against UV-B damage, and a large dated phylogeny implies multiple gains and losses of this function during the Cenozoic. 2015. 205 (3): 1330-1341.
320. Chou T., Yang S. The biogenesis of ethylene in *Penicillium digitatum* // Arch Biochem Biophys. 1973. 157 (1): 73-82.
321. Chugh S., Guha S., Rao I. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants // Scientia Horticulturae. 2009.122: 507-520.
322. Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc Nat Acad Sci USA. 1989. 86: 2172–2175.
323. Chung K., Shilts T., Erturk U., Timmer L., Ueng P. Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus // FEMS Microbiol Lett. 2003. 226 (1): 23-30.
324. Church G.M., Gilbert W. Genomic sequencing // Proc Nat Acad Sci USA. 1984. 81: 1991–1995.
325. Cihangir N., Aksoz N. Production of gibberellic acid by *Aspergillus niger* using some food industry wastes // Acta-Microbiol-Pol. 1993. 45: 291-297.
326. Cingel N.A.V.D. An atlas of orchid pollination: America, Africa, Asia and Australia. Rotterdam: A. A. Balkema Publishers. 2001. 296 p.
327. Clements M.A. Orchid mycorrhizal associations // Lindleyana. 1988. 3 (2): 73-86.
328. Clements M.A., Muir H., Cribb P.J. A preliminary report on the symbiotic germination of european terrestrial orchids // Kew Bulletin. 1986. 41 (2): 437-445.
329. Cobban A., Edgcomb V.P., Burgaud G., Repeta D., Leadbetter E.R. Revisiting the pink-red pigmented basidiomycete mirror yeast of the phyllosphere // Microbiol. 2016. 5: 846-855.
330. Cocolin L., Bisson L. F., Mills D.A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations // FEMS Microbiol Lett. 2000. 189 (1): 81–87.
331. Cohen Y., Jørgensen B.B., Revsbech N.P., Poplawski R. Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria. Appl Environ Microbiol. 1986. 51: 398–407.
332. Cohen A., Travaglia C., Bottini R., Piccoli P. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize // Botany. 2009. 87: 455–462.
333. Colby J., Zatman L.J. Trimethylamine metabolism in obligate and facultative methylotrophs. Biochem J. 1973. 132: 101–112.
334. Colin Y., Nicolitch O., Van Nostrand J.D. et al. Taxonomic and functional shifts in the beech rhizosphere microbiome across a natural soil toposequence // Sci Rep. 2017. 7: 9604.
335. Comai L., Surico G., Kosuge T. Relations of plasmid DNA to indoleacetic acid production in different strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* // J Gen Microbiol. 1982. 128: 2157-2163.
336. Compton M.E., Preece J.B. Exudation and explant establishment // Int Assoc Plant Tissue Cult Newslett. 1986. 50: 9-18.
337. Coolbaugh R.C., Al-Nimri L.F., Nester J.E. Evidence for gibberellins in culture filtrates of *Cercospora rosicola*. 12th Int conf Plant Growth Substances, Heidelberg, Abstr 12. 1985
338. Costa E., Evangelista A., Medeiros A., Dametto F.R., Carvalho R.A.D. In vitro evaluation of the root canal cleaning ability of plant extracts and their antimicrobial action // Brazilian oral research. 2012. 26 (3): 215-221.

339. Costacurta A., Vanderleyden J. Synthesis of phytohormones by plant associated bacteria // Crit Rev Microbiol. 1995. 21 (1): 1-18.
340. Cristescu S., De Martinis D., Te Lintel Hekkert S., Parker D., Harren F. Ethylene production by *Botrytis cinerea* in vitro and in tomatoes // Appl Environ Microbiol. 2002. 68 (11): 5342-5350.
341. Crocoll C., Kettner J. Dörffling K. Absciscic acid in saprophytic and parasitic species of fungi // Phytochem. 1991. 30: 1059-1060.
342. Currah R.S., Zettler L.W., Hambleton S., Richardson K.A. Fungi from orchid mycorrhizae. In J. Arditti and A. M. Pridgeon (eds.) / Orchid biology: reviews and perspectives. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1997, VII vol. , pp. 117– 170.
343. Curtis J.T. The germination of native orchid seeds // Amer Orch Soc Bull. 1936. 5 (3): 42– 47.
344. D'Alessandro M., Erb M., Ton J., Brandenburg A., Karlen D. et al. Volatiles produced by soil-borne endophytic bacteria increase plant pathogen resistance and affect tritrophic interactions. Plant Cell Environ. 2014. 37: 813–826.
345. da Silva Vieira M.R., Citadini V., Lima G.P.P., de Souza A.V., de Souza A.L. Use of gibberellin in floriculture. Afr J Biotechnol. 2010. 9: 9118–9121.
346. Dakora F.D, Phillips D.A. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments // Plant Soil. 2002. 245: 35–47.
347. Dalton D.A., Kramer S., Azios N., Fusaro S., Cahill E., Kennedy C. Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria* and *Elymus mollis*) from Oregon // FEMS Microbiol Ecol. 2004. 49 (3): 469– 479.
348. Dan Y., Yu X.-M., Guo S.-X., Meng Z.-X. Effects of forty-two strains of orchid mycorrhizal fungi on growth of plantlets of *Anoectochilus roxburghii* // Afr J Microbiol Res. 2012. 6: 1411–1416.
349. Dart P.J. Nitrogen fixation associated with non-legumes in agriculture // Plant Soil. 1986. 90: 303–334.
350. Dashtban M., Schraft H., Syed T. A., Qin W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin // Int J Biochem Mol Biol. 2010. 1 (1). 36-50.
351. Datta C., Basu P. Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan* // Microbiol. Res. 2000. 155 (2): 123-127.
352. Davidson E.A., Carvalho J.R., Vieira I.C.G., Figueiredo P.M., Ishida F.Y. et al. Nitrogen and phosphorus limitation of biomass growth in a tropical secondary forest // Ecol Appl. 2004. 14: 154-163.
353. Davies P.J. The hormones: their nature, occurrence, and function. In: Davies PJ (ed.) /Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1995, pp. 1-13.
354. de Azeredo L.A.I., Gomes E.A.T., Mendonça-Hagler L.C., Hagler A.N. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil // Int Microbiol. 1998. 1 (3): 205-208.
355. de Cano M.M.S., de Mule M.C.Z., de Caire G.Z., de Halperin D.R. Inhibition of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* by phenolic compounds from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc muscorum* // J Appl Phycol. 1990. 2:79–81.
356. Dębowski M., Zieliński M., Grala A., Dudek M. Algae biomass as an alternative substrate in biogas production technologies – Review // Ren Sustain Energy Rev. 2013. 27: 596–604.
357. Degnan P.H., Ochman H. Illumina-based analysis of microbial communitydiversity // ISME J. 2012. 6: 183–194.
358. del Castillo D.S., Parra D., Noceda C., Pérez-Martínez S. Co-occurrence of pathogenic and non-pathogenic *Fusarium decemcellulare* and *Lasiodiplodia theobromae* isolates in cushion galls disease of cacao (*Theobroma cacao* L.) // J Pl Protec Res. 2016. 56: 129–138.

359. De Melo Pereira G.V., Magalhães K.T., Lorenzetti E.R., Souza T.P., Schwan R.F. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. *Microb Ecol.* 2012. 63: 405-417.
360. De Meyer G., Höfte M. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean // *Phytopathol.* 1997. 87: 588-593.
361. Deng Z., Wang W., Tan H., Cao L. Characterization of heavy metal-resistant endophytic yeast *Cryptococcus* sp. CBSB78 from rapeseeds (*Brassica chinensis*) and its potential in promoting the growth of *Brassica* spp. in metal-contaminated soils // *Water Air Soil Pollut.* 2012. 223 (8): 5321–5329.
362. De Philippis R., Paperi R., Sili C. et al. Assessment of the metal removal capability of two capsulated cyanobacteria, *Cyanospira capsulata* and *Nostoc* PCC7936 // *J Appl Phycol.* 2003. 15: 155–161.
363. Dearnaley J.D.W. Further advances in orchid mycorrhizal research // *Mycorrhiza.* 2007. 17: 475–486.
364. Dearnaley J.W.D., Perotto S., Selosse M.A. Structure and development of orchid mycorrhizas. *Molecular mycorrhizal symbiosis* (Chap. 5). Wiley, Hoboken. 2016: 63–86.
365. Dębowski D., Dębowski M., Zieliński M., Grala A., Dudek M. Algae biomass as an alternative substrate in biogas production technologies. Review // *Ren. Sustain. Energy Rev.* 2013. 27: 596–604.
366. Delaquis P., Stanich K., Toivonen P. Effect of pH on the inhibition of *Listeria* spp. by vanillin and vanillic acid. *J Food Protection.* 2005. 68: 1472-1476.
367. Denny T.P. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis // *Annu Rev Phytopathol.* 1995. 33: 173-197.
368. Deng D., Xie P., Zhou Q. et al. Field and experimental studies on the combined impacts of cyanobacterial blooms and small algae on crustacean zooplankton in a large, eutrophic, subtropical, Chinese lake // *Limnology.* 2008. 9: 1–11.
369. Desjardins A.E. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and biology. St. Paul Minnesota: American Phytopathological Society (APS Press). 2006.
370. Deveau A., Bonito G., Uehling J., Paoletti M., Becker M. et al. Bacterial–fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges // *FEMS Microbiol Rev.* 2018. 42 (3): 335–352.
371. Dickinson C.H., Austin B., Goodfellow M. Quantitative and qualitative studies of phylloplane bacteria from *Lolium perenne* // *J Gen Microbiol.* 1975. 91: 157–166.
372. Di Pietro A., Roncero, M.I.G. Cloning, expression, and role in pathogenicity of *pg1* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* // *Mol Plant Microbe Interact.* 1998. 11: 91-98.
373. Dijk E., Eck N.D. Effects of mycorrhizal fungi on in vitro nitrogen response of some Dutch indigenous orchid species // *Can J Bot.* 1995. 73: 1203-1211.
374. Dillon J.G., Tatsumi C.M., Tandingan P.G. et al. Effect of environmental factors on the synthesis of scytonemin, a UV-screening pigment, in a cyanobacterium (*Chroococcidiopsis* sp.) // *Arch Microbiol.* 2002. 177: 322–331.
375. Dimpka C.O., Merten D., A Svatos., G Büchel., Kothe E. Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *J Appl Microbiol.* 2009. 107: 1687-1696.
376. Dojani S., Lakatos M., Rascher U., Wanek W., Lüttge U., Büdel B. Nitrogen input by cyanobacterial biofilms of an inselberg into a tropical rainforest in French Guiana // *Flora.* 2007. 202 (7): 521-529
377. Domsch K.H., Jams W., Anderson T. H. *Compendium of soil fungi.* London: Academic Press. 1980. 860 p.
378. Donderski W., Gluchowska M. Production of cytokinin-like substances by planktonic bacteria isolated from Lake Jeziorak // *Pol J Environ Stud.* 2000. 9: 369–376.

379. Donn S., Kirkegaard J.A., Perera G., Richardson A.E., Watt M. Evolution of bacterial communities in the wheat crop rhizosphere // *Environ Microbiol.* 2015. 17 (3): 610-621.
380. Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I., Krausova V.I., Karpov A.V., Subbotin S.A., Tiedje J.M. *Rathayibacter caricis* sp. nov. and *Rathayibacter festucae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of *Carex* sp. and the leaf gall induced by the nematode *Anguina graminis* on *Festuca rubra* L., respectively // *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002. 52 (6): 1917-1923.
381. Doty S.L., Oakley B., Xin G., Kang J.W., Singleton G. et al. Diazotrophic endophytes of native black cottonwood and willow // *Symbiosis.* 2009. 47.(1): 23-33.
382. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochem Bull.* 1987. 19: 11-15.
383. Drüge U., Schonbeck F. Effect of vesicular–arbuscular mycorrhizal infection on transpiration, photosynthesis and growth of flax (*Linum usitatissimum* L.) in relation to cytokinin levels // *J Plant Physiol.* 1993. 141: 40–48.
384. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton F.K., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances // *Anal Chem.* 1956. 28 (3): 350-356.
385. Duineveld B.M., Rosado A.S., van Elsas J.D., van Veen J.A. Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns // *Appl Environ Microbiol.* 1998. 64: 4950–4957.
386. Duineveld B.M., Kowalchuk G.A., Keijzer A., van Elsas J.D., van Veen J.A. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of *Chrysanthemum* via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA // *Appl Envir Microbiol.* 2001. 67 (1): 172-178.
387. Dycus A., Knudson L. The role of the velamen of the aerial roots of orchids // *Bot. Gazette.* 1957. 119 (2): 78-87.
388. Egamberdieva D. Plant growth promoting properties of rhizobacteria isolated from wheat and pea grown in loamy sand soil // *Turkish J Biol.* 2008. 32 (1): 9-15.
389. Egas C., Barroso C., Froufe H.J.C., Pacheco J., Albuquerque L., da Costa M.S. Complete genome sequence of the radiation-resistant bacterium *Rubrobacter radiotolerans* RSPS-4 // *Stand Genomic Siences.* 2014. 9 (3): 1062.
390. Egebo L.A., Nielsen S.V.S., Jochimsen B.U. Oxygen dependent catabolism of indole-3-acetic acid in *Bradyrhizobium japonicum* // *J Bacteriol.* 1991. 173: 4897– 490.
391. Ehling-Schulz M., Bilger W., Scherer S. UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J Bacteriol.* 1997. 179: 1940–1945.
392. Ehmann A. The van urk-Salkowski reagent – a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives // *J Chromatogr.* 1977. 132: 267–276.
393. Ek M., Ljunquist P.O., Stenstrom E. Indole-3-acetic acid production by mycorrhizal fungi determined by gas chromatography-mass spectrometry // *New Phytol.* 1983. 94: 401-407.
394. El-Tarabily K.A., Sivasithamparam K. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters // *Soil Biol Biochem.* 2006. 38 (7): 1505-1520.
395. Elevitch C., Wilkinson K., Mathews B. Mulch from hedgerows of nitrogen fixing trees affects soil nutrient levels in a jackfruit orchard // *Forest Farm Comm Tree Res Rep.* 1998. 3: 21-25.
396. Ellis M.B. Dematiaceous hyphomycetes. Kew: Commonwealth Mycological Inst. 1971. 609 p.
397. Eng F., Zienkiewicz K., Gutiérrez-Rojas M., Favela-Torres E., Feussner I. Jasmonic acid biosynthesis by microorganisms: derivatives, first evidences on biochemical pathways and culture conditions for production // *PeerJ Preprints.* 2018. 6:e26655v1 <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.26655v1>

398. Enya J., Shinohara H., Yoshida S., Tsukiboshi T., Negishi H. et al. Culturable leaf-associated bacteria on tomato plants and their potential as biological control agents // *Microbial Ecol.* 2007. 53 (4): 524–536.
399. Faria R.T., , Dias A., Melo I., de Carvalho Costa F. In vitro *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations // *Horticultura Brasileira.* 2004. 22 (4): 780–783.
400. Faria D.C., Dias A.C.F., Melo I.S., de Carvalho Costa F.E. Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth // *World J Microbiol Biotechnol.* 2013. 29: 217–221.
401. Fay M.F., Krauss S.L. Orchid conservation genetics in the molecular age. In: Dixon K.W., Kell S.P., Barrett R.L., Cribb P.J. (eds.) / *Orchid conservation.* Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publications. 2003. pp. 91–112.
402. Fazli M., Rybtke M., Steiner E., Weidel E., Berthelsen J. et. al. Regulation of *Burkholderia cenocepacia* biofilm formation by RpoN and the c-di-GMP effector BerB // *Microbiology Open.* 2017. 6(4):e00480.
403. Felsenstein J. PHYLIP-phylogeny inference package (Version 3.2) // *Cladistics.* 1989. 5: 164–166.
404. Fernando W.G.D., Ramarathnam R., Krishnamoorthy A.S., Savchuk S.C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles // *Biocontrol.* 2005. 37:955–964.
405. Ferrari S., Plotnikova J., De Lorenzo G., Ausubel F. Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4 // *Plant J.* 2003. 35 (2): 193–205.
406. Fierer N., Leff J.W., Adams B.J. et al.. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbes. *PNAS.* 2012. 109 (52): 21390–21395.
407. Finkelstein R.R., Zeevaart J.A.D. Gibberellin and abscisic acid biosynthesis and response. In: Arabidopsis, EM Meyerowitz, CR Somerville (eds.) / *Arabidopsis.* NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994, pp. 523–553.
408. Fisch M.H., Flick B.H., Arditti J. Structure and antifungal activity of hercinol, loroglossol and orchinol // *Phytochem.* 1973. 12: 437–441.
409. Fitzgerald D.J., Stratford M., Gasson M.J., Ueckert J., Bos A., Narbad A. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua* // *J Appl Microbiol.* 2004. 97: 104–113.
410. Fonnesbech M. Growth hormones and propagation of *Cymbidium in vitro* // *Physiol Plant.* 1972. 27: 310–316.
411. Fonseca Á., Boekhout T., Fell J.W., Kurtzman C.P. The yeasts, a taxonomic study. 2011: 1661–1737.
412. Forchetti G., Masciarelli O., Alemano S., Alvarez D., Abdala G. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium // *Applied Microbiol Biotechnol.* 2007. 76: 1145–1152.
413. Forni C., Gentili S., Van Hove C., Grilli Caiola M. Isolation and characterization of the bacteria living in the sporocarps of *Azolla filiculoides* Lam. // *Ann Microbiol.* 1990. 40: 235–243.
414. Forsyth L.M., Smith L.J., Aitken E.A. Identification and characterization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* capable of increasing and decreasing *Fusarium* wilt severity. *Mycol Res.* 2006. 110: 929–935.
415. Frankland B., Wareing F.A. Effect of gibberellic acid on hypocotyls growth of lettuce seedlings // *Nature.* 1960. 185: 255.
416. Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., P.Galuszka. Darwin Review. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation // *J Exp Bot.* 2011. 62: 2431–2452.
417. Freiberg C., Fellay R., Bairoch A., Broughton W.J., Rosenthal A., Perret X. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes // *Nature.* 1997. 387: 394–401.

418. Frey-Klett P., Garbaye J., Tarkka M. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.* 2007. 176: 22–36.
419. Fries J., Pfeiffer S., Kuffner M., Sessitsch A. *Spirosoma endophyticum* sp. nov., isolated from Zn- and Cd-accumulating *Salix caprea* // *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013. 63 (12): 4586–4590.
420. Fry S.C.. Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship // *Physiol Plant.* 1989. 75: 532–536.
421. Fukazawa J., Sakai T., Ishida S., Yamaguchi I., Kamiya Y., Takahashi Y. Repression of shoot growth, a bZIP transcriptional activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins // *Plant Cell.* 2000. 12: 901–915.
422. Fukuda H., Ogawa T., Tanase S. Ethylene production by micro-organisms // *Adv Microb Physiol.* 1993. 35: 275–306.
423. Furukawa T., Koga J., Takashi A., Kishi K., Syono K. Efficient conversion of L-tryptophan to indole-3-acetic acid and/or tryptophol by some species of *Rhizoctonia* // *Plant Cell Physiol.* 1996. 37: 899–905.
424. Galdiano R.F. Jr., Lemos E.G.M., Faria R.T., Vendrame W.A. Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000 // *Sci Hortic.* 2011. 148:154–160.
425. Gallert C., Winter J. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: effect of ammonia on glucose degradation and methane production // *Appl. Microbiol. Biotechnol. J.* 1997. 48: 405–410.
426. Gama Jr. W.A., Laughinghouse H.D. IV, Sant'Anna C.L. How diverse are coccoid cyanobacteria? A case study of terrestrial habitats from the Atlantic Rainforest (São Paulo, Brazil) // *Phytotaxa.* 2014. 178: 61–97.
427. Garbeva P., Overbeek L., Vuurde J., Elsas J. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments // *Microb Ecol.* 2001. 41: 369–383.
428. Garcia de Salamone I., Hynes R., Nelson L. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants // *Can J Microbiol.* 2001. 47 (5): 404–411.
429. Gebauer G., Meyer M. ¹⁵N and ¹³C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association // *New Phytol.* 2003. 160: 209–223.
430. Gasanova L.G., Netrusov A.I., Teplyakov V.V., Modigell M. Fuel gases from organic wastes using membrane bioreactors // *Desalination.* 2006. 198 (1–3): 56–66.
431. Gaskin P., MacMillan J. GC-MS of the gibberellins and related compounds: methodology and a library of spectra. Bristol: Cantocks Enterprises. 1992, 949 p.
432. Geissman T.A., Verbiscar A.J., Phinney B.O., Cragg G. Studies on the biosynthesis of gibberellins from (-)-kaurenoic acid in cultures of *Gibberella fujikuroi* // *Phytochem.* 1966. 5: 933–947.
433. Gerlach W., Nirenberg H. The genus *Fusarium* – a pictorial atlas. Berlin: Kommissionsverlag Paul Parey. 1982, 406 p.
434. Ghisalberti E. L., Sivasithamparan K. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. // *Soil Biol Biochem.* 1991. 11: 1011–1020.
435. Ghorbani A., Gravendeel B., Naghibi F. et al. Wild orchid tuber collection in Iran: a wake-up call for conservation // *Biodivers Conserv.* 2014. 23, 2749–2760.
436. Givinish T.J., Spalink D., Ames M., Lyon S.P., Hunter S.J. et al. Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal // *J Biogeography.* 2016. 43: 1905–1916.
437. Glick B.R., Todorovic B., Czarny J., Cheng Z., Duan J., McConkey B. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase // *Crit Rev Plant Sci.* 2007. 26: 227–242.
438. Glick B.R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica. 2012. ID 963401.

439. Glick B.R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world // *Microbiol Res.* 2014. 169: 30–39.
440. Glickmann E., Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria // *Appl Environ Microbiol.* 1995. 61: 793-796.
441. Glushakova A.M., Kachalkin A.V. Endophytic yeasts in *Malus domestica* and *Pyrus communis* fruits under anthropogenic impact // *Microbiology.* 2017. 86: 128–135.
442. Goh C.J., Sim A., Lim G. Mycorrhizal associations in some tropical orchids // *Lindleyana.* 1992. 7: 13-17.
443. Goh C.J., Arditti J., Avadhani P.N. Carbon fixation in orchid aerial roots // *New Phytol.* 1983. 95: 367–374.
444. Golubev W.I., Sampaio J.P. New filobasidiaceous yeasts found in the phylloplane of a fern // *J Gen Appl Microbiol.* 2009. 55 (6): 441-446.
445. Gonzalez E., Galvez L., Arrese-Igor C. Abscissic acid induces a decline in nitrogen fixation that involves leghaemoglobin, but is independent of sucrose synthase activity // *J Exp Bot.* 2001. 52 (355): 285-293.
446. Gopinathan S., Raman N. Indole 3-acetic acid production by ectomycorrhizal fungi // *Indian J Exp Biol.* 1992. 30 (2): 142-143.
447. Gordon S.A., Weber R.P. Colorimetric estimation of indole acetic acid // *Plant Physiol.* 1951. 26: 192–195.
448. Goswami D., Thakker J.N., Dhandhukia P.C., Tejada Moral M. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review // *Cogent Food Agric.* 2016. 2:1, 127500.
449. Goto S. On a new yeast genus *Naganishia* // *J Fermentation Technol.* 1963. 41: 459-62.
450. Graham J., Linderman R. Ethylene production by ectomycorrhizal fungi, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pini*, and by aseptically synthesized ectomycorrhizae and *Fusarium*-infected Douglas-fir roots // *Can J Microbiol.* 1980. 26 (11): 1340-1347.
451. Gray J., Gelvin S., Meilan R., Morris R. Transfer RNA is the source of extracellular isopentenyladenine in a Ti-plasmidless strain of *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Physiol.* 1996. 110 (2): 431-438.
452. Griesbach R.J. Development of *Phalaenopsis* orchids for the mass-market. In: Janick J., Whipkey A. (eds.) / *Trends in new crops and new uses.* Alexandria: ASHS. 2002, pp. 458-465.
453. Grime J.P. Plant strategies, vegetation processes and ecosystem properties. Chichester: Wiley. 2nd edn. 2001, 417 p.
454. Grobbelaar N. Scott W.E., Hattingh W. Marshall J. The identification of the coralloid endophytes of the southern African cycads and the ability of the isolates to fix dinitrogen // *S Afr J Bot.* 1987. 53: 111–118.
455. Gu Z., Arditti J., Nyman L.P. *Vanilla planifolia*: callus induction and plantlet production *in vitro* // *Lindleyana.* 1987. 2 (1): 48-52.
456. Guerrero R., Margulis L., Berlanga M. Symbiogenesis: the holobiont as a unit of evolution // *Int Microbiol.* 2013. 16 (2013): 133-143.
457. Guinel F.C., Geil R.D. A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its use to understand the roles of ethylene in the establishment of these two symbioses // *Can J Bot.* 2002. 80: 695–720.
458. Gunasekaran M., Weber D.J. Auxin production of three phytopathogenic fungi // *Mycologia.* 1972. 64: 1180-1183.
459. Gunasekaran M. Physiological studies on *Phymatotrichum omnivorum*. IX. Synthesis of indole acetic acid *in vitro* // *Microbios.* 1978. 22 (88): 85-91.
460. Gusev M.V., Baulina O.I., Gorelova O.A., Lobakova E.S., Korzhenevskaya T.G. Artificial Cyanobacterium-Plant Symbioses. In: Rai A.N., Bergman B., Rasmussen U. (eds.) / *Cyanobacteria in symbiosis.* Dordrecht: Springer. 2002, pp. 253-312.

461. Gutiérrez RMP. Orchids: A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology // J Med Plants Res. 2010. 4: 592–638.
462. Gutiérrez-Mañero F.J., Ramos-Solano B., Probanza A., Mehouchi J., Tadeo F.R., Talon M. The plant-growthpromoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins // Physiol Plant. 2001. 111: 206–211.
463. Gutierrez-Miceli F.A., Ayora-Talavera T., Abud-Archila M., Salvador-Figueroa M., Adriano-Anaya L. et al. Acclimatization of micropropagated orchid *Guarianthe skinnerii* inoculated with *Trichoderma harzianum* // Asian J Plant Sci. 2008. 7: 327–330.
464. Habibi S., Djedidi S., Prongjunthuek K., Mortuza Md., Ohkama-Ohtsu N. et al. Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops // Plant Soil. 2014. 379: 51-66.
465. Hadley G., Williamson B. Features of mycorrhizal infection in some malayan orchids // New Phytol. 1972. 71 (6): 1111-1118.
466. Haichar F., Marol C., BERGE O., Rangel-Castro J.I., Prosser J.I. et al. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. ISME J. 2008. (2): 1221-1230.
467. Halda-Alija L. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effuses* L. // Can J Microbio. 2003. 49: 781-787.
468. Hall J., Black G.W., Ferreira L.M.A., Millward-Sadler S.J., Ali B.R.S. et al. The non-catalytic cellulose-binding domain of a novel cellulase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* is important for the efficient hydrolysis of Avicel // Biochem J. 1995. 309 (3): 749–756.
469. Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F., Kloepper J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops // Canad J Microbiol. 1997. 43 (10): 895-914.
470. Halo B.A., Khan A.L., Waqas M., Al-Harrasi A., Hussain J. et al. Endophytic bacteria (*Sphingomonas* sp. LK11) and gibberellin can improve *Solanum lycopersicum* growth and oxidative stress under salinity // J Plant Interact. 2015. 10: 117–125.
471. Hansen H., Grossmann K. Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition // Plant physiology. 2000. 124 (3): 1437-1448.
472. Harley J.L., Harley E.L. A check-list of mycorrhiza in the british flora // New Phytol. 1987. 105 (2): 1-102.
473. Hartung W. The evolution of abscisic acid (ABA) and ABA function in lower plants, fungi and lichen // Funct Plant Biol. 2010. 37: 806–812.
474. Harvais G. Growth requirements and development of *Cypripedium reginae* in axenic culture // Can J Bot. 1973. 51. (2): 327-445.
475. Hasan H. Gibberellin and auxin-indole production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction // Acta Microbiol Immunol. 2002. 49: 105–118.
476. Hashtroudi, M.S., Ghassempour, A., Riahi H. et al. Endogenous auxins in plant growth-promoting cyanobacteria—*Anabaena vaginicola* and *Nostoc calcicola* // J Appl Phycol. 2013. 25: 379–386.
477. Hassani M.A., Durán P., Hacquard S. Microbial interactions within the plant holobiont // Microbiome. 2018. 6: 58.
478. Hauer T., Bohunická M., Johansen J., Mareš J., Berrendero-Gomez E. Reassessment of the cyanobacterial family *Microchaetaceae* and establishment of new families *Tolypothrichaceae* and *Godleyaceae* // J Phycol. 2014. 50: 1089–1100.
479. Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., Ahmed I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review // Annal Microbiol. 2010. 60 (4): 579-598.
480. Hazarika B.N. Acclimatization of tissue cultured plants // Curr Sci. 2003. 85: 1704-1712.
481. Hedden P., Phillips A.L., Rojas M.C., Carrera E., Tudzynski B. Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: a case of convergent evolution? J Plant Growth Reg. 2002. 20: 317–331.

482. Hedden P., Phillips A.L. Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants // *Curr Opin Biotechnol.* 2000. 11: 130–137.
483. Hedden P., Thomas S.G. Gibberellin biosynthesis and its regulation // *Biochem J.* 2012. 444: 11–25.
484. Henfling J., Bostock R., Kuc J. Effects of abscisic acid on rishitin and lubimin accumulation and resistance to *Phytophthora infestans* and *Cladosporium cucumerinum* in potato tuber tissue slices // *Phytopathol.* 1980. 70: 1074–1078.
485. Hentschke G., Johansen J., Pietrasiak N., Rigonato J., Fiore M., Sant’Anna C., 2017. *Komarekiella atlantica* gen. et sp. nov. (Nostocaceae, Cyanobacteria): a new subaerial taxon from the Atlantic rainforest and Kauai, Hawaii // *J Czech Phycol Soc.* 17 (2): 178–190.
486. Herrera P., Suarez J.P., Kottke I. Orchids keep the ascomycetes outside: a highly diverse group of ascomycetes colonizing the velamen of epiphytic orchids from a tropical mountain rain Pridgeon forest in Southern Ecuador // *Mycology.* 2010. 1: 262–268.
487. Hershey D.M., Lu X., Zi J., Peters V. Functional conservation of the capacity for entkaurene biosynthesis and an associated operon in certain rhizobia // *J Bacteriol.* 2014. 196: 100–106.
488. Hew C.S., Young J.W. The physiology of tropical orchids in relation to the industry. Singapore: World Scientific. 2004, 388 p.
489. Hinsch J., Vrabka J., Oeser B., Novak O., Galuszka P., Tudzynski P. De novo biosynthesis of cytokinins in the biotrophic fungus *Claviceps purpurea*. *Environ Microbiol.* 2015. 17: 2935–2951.
490. Hirai N., Yoshida R., Todoroki Y., Ohigashi H. Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi // *Biosci Biotechnol. Biochem.* 2000. 64 (7): 1448–5148.
491. Hirano K., Ueguchi-Tanaka M., Matsuoka M. GID1-mediated gibberellin signaling in plants. *Trends Plant Sci.* 2008. 13: 192–199.
492. Hirano S. S., Upper C.D. Diel variation in population size and ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* on snap bean leaflets // *Appl Environ Microbiol.* 1989. 55: 623–630.
493. Hirsch R., Hartung W., Gimmler H. Absciscic acid content of algae under stress // *Bot Acta.* 1989. 102: 326–334.
494. Hoff B., Kück U. Use of bimolecular fluorescence complementation to demonstrate transcription factor interaction in nuclei of living cells from the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum*. *Curr Genet.* 2005. 47: 132–138.
495. Hoffman M.T., Arnold A.E. Diverse bacteria inhabit living hyphae of phylogenetically diverse fungal endophytes // *Appl Environ Microbiol.* 2010. 76 (12): 4063–4075.
496. Hottiger T., Boller T. Ethylene biosynthesis in *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae* proceeds from glutamate/2-oxoglutarate and requires oxygen and ferrous ions *in vivo* // *Arch Microbiol.* 1991. 157: 18–22.
497. Huang Z., Liu, Y., Paulsen B.S., Klaveness D. Studies on polysaccharides from three edible species of Nostoc (Cyanobacteria) with different colony morphologies: comparison of monosaccharide compositions and viscosities of polysaccharides from field colonies and suspension cultures. // *J Phycol.* 1998. 34: 962–968.
498. Hue A.G., Voldeng H.D., Savard M.E., Fedak G., Tian X., Hsiang T. Biological control of fusarium head blight of wheat with *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Can J Plant Pathol.* 2009. 31 (2): 169–179.
499. Hueck C.J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants // *Microbiol Mol Biol.* 1998. 62: 379–433.
500. Hussain A., Krischke M., Roitsch T. et al. Rapid determination of cytokinins and auxin in cyanobacteria // *Curr Microbiol.* 2010. 61: 361–369.
501. Hynson N.A., Madsen T.P., Selosse M.-A., Adam I.K.U., Ogura-Tsujita Y. et al.. The physiological ecology of mycoheterotrophic plants. In: Merckx V.S.F.T. (ed.) /

- Mycoheterotrophy: the biology of plants living on fungi. NY: Springer-Verlag. 2013. 2: 97–342.
502. Ince J., Knowles C. Ethylene formation by cell-free extracts of *Escherichia coli* // Arch Microbiol. 1986. 146: 151–158.
 503. Innerebner G., Knief C., Vorholt J.A. Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system // Appl Environ Microbiol. 2011. 77 (10): 3202–3210.
 504. Ishida S., Fukazawa J., Yuasa T., Takahashi Y. Involvement of 14–3–3 signaling protein binding in the functional regulation of the transcriptional activator repression of shoot growth by gibberellins // Plant Cell. 2004. 16: 2641–2651.
 505. Jadulco R., Brauers G., Edrada R., Ebel R., Wray V., Sudarsono S., Proksch P. New metabolites from sponge-derived fungi *Curvularia lunata* and *Cladosporium herbarum* // J Nat Prod. 2002. 65 (5): 730–733.
 506. Jaeger C.H., Lindow S.E., Miller W., Clark E., Firestone M.K. Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan // Appl Environ Microbiol. 1999. 65 (6): 2685–2690.
 507. James E.K., Gyaneshwar P., Mathan N., Barraquio W.L. et al. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67 // Mol Plant Microbe Interact. 2002. 15 (9): 894–906.
 508. Jameson P. Cytokinins and auxins in plant-pathogens interactions—an overview // Plant Growth Regul. 2000. 32: 369–380.
 509. Jacobs W.P. A search for some angiosperm hormones and their metabolites in *Caulerpa paspaloides* (Chlorophyta) // J Phycol. 1993. 29: 595–600.
 510. Jan A., Yang G., Nakamura H., Ichikawa H., Kitano H., Matsuoka M., et al. Characterization of a xyloglucan endotransglucosylase gene that is up-regulated by gibberellin in rice // Plant Physiol. 2004. 136: 3670–3681.
 511. Janssen P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. Appl Environ Microbiol. 2006. 72: 1719–1728.
 512. Janitor A. Growth of mycelia of phytopathogenic fungi after application of abscisic acid in vitro conditions // Plant Protec Sci. 2002. 38 (3): 94–97.
 513. Jeffries D.L., Klopatek J.M., Link S.O., Bolton H. Jr. Acetylene reduction by cryptogamic crusts from a black brush community as related to re-saturation and dehydration // Soil Biol Biochem. 1992. 24: 1101–1105.
 514. Jensen J.B., Egsgaard H., Van Onckelen H., Jochimsen B.U. Catabolism of indole-3-acetic acid and 4- and 5-chloroindole-3-acetic acid in *Bradyrhizobium japonicum* // J Bacteriol. 1995. 177: 5762–5766.
 515. Jestoi M. Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin – a review // Crit Rev Food Sci Nutr. 2008. 48: 21–49.
 516. Jeyanthi V., Kanimozhi S. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) - prospective and mechanisms: a review // J Pure Appl Microbiol. 2018. 12 (2): 733–749
 517. Jha P.N., Gupta G., Jha P., Mehrotra R. Association of rhizospheric/endophytic bacteria with plants: a potential gateway to sustainable agriculture // Greener J Agric Sci. 2013. 3: 73–84.
 518. Jiang C., Fu X. 2007. GA action: turning on de-DELTA repressing signaling // Curr Opin Plant Biol. 2007. 10: 461–465.
 519. Jiang Z., Tuo L., Huang D., Osterman I.A., Tyurin A.P. et al. Diversity, novelty, and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from mangrove plants in Beilun estuary National Nature Reserve of Guangxi, China // Front Microbiol. 2018. 9: 1–11.
 520. Jimoh F.O., Adedapo A.A., Aliero A.A., Afolayan A.J. Polyphenolic contents and biological activities of *Rumex ecklonianus* // Pharmaceut Biol. 2008. 46: 333–340.

521. John M.C., Amasino R.M.. Expression of an *Agrobacterium* Ti plasmid gene involved in cytokinin biosynthesis is regulated by virulence loci and induced by plant phenolic compounds // *J Bacteriol.* 1988. 170: 790–95.
522. Joo G., Kim Y., Lee I. et al. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus* // *Biotechnol Lett.* 2004. 26: 487–491.
523. Jourand P., Renier A., Rapior S., de Faria S.M., Prin Y. et al. Role of methylotrophy during symbiosis between *Methylobacterium nodulans* and *Crotalaria podocarpa*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2005. 18 (10): 1061-1068.
524. Jordan C.F. Nutrient cycling in tropical forest ecosystems: principles and their application in conservation and management // John Wiley and Sons, Chichester, England. 1985. 179 pp.
525. Kakimoto T. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases // *Plant Cell Physiol.* 2001. 42: 677–85.
526. Kakimoto T. Perception and signal transduction of cytokinins // *Annu Rev Plant Biol.* 2003. 54: 605–27.
527. Kamemoto H., Kuehnle A.R., Amore T.D. Breeding *Dendrobium* orchids in Hawaii. University of Hawai'i Press, Honolulu, USA. 1999. 166 pp.
528. Kamilova F., Kravchenko L.V., Shaposhnikov A.I., Azarova T., Makarova N., Lugtenberg B. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stone wool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.* 2006. 19: 250–256.
529. Kaneshiro T., Slodki M.E., Plattner R.D. Tryptophan catabolism to indolepyruvic and indoleacetic acids by *Rhizobium japonicum* L-259 mutants // *Curr Microbiol.* 1983. 8: 301-306.
530. Kapoor K., Sharma V. Effect of growth-promoting chemicals on growth, nitrogen fixation and heterocyst frequency of a blue-green alga // *Z Allg Mikrobiol.* 1981. 21 (4): 305-311.
531. Kardos A.J., Palkó G., Oláh J., Barkács K., Zárny G. Comparing of mesophilic and thermophilic anaerobic fermented sewage sludge based on chemical and biochemical tests // *Appl. Ecol. Environ. Res.* 2011. 9: 293–302.
532. Kasahara H., Takei K., Ueda N., Hishiyama S., Yamaya T., et al. Distinct isoprenoid origins of cis- and trans-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis* // *J Biol Chem.* 2004. 279: 14049–14054.
533. Katiyar R.S., Sharma G.D., Mishra R.R. Mycorrhizal infections of epiphytic orchids in tropical forests of Meghalaya (India) // *J Ind Bot Soc.* 1986. 65: 329-334.
534. Kavroulakis N, Ntougias S, Zervakis GI, Ehalotis C, Haralampidis K, Papadopoulou K (2007) Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *J Exp Bot* 58:3853-3864.
535. Kawaide H., Imai R.T., Sassa R., Kamiya Y. *ent*-Kaurene synthase from the fungus *Phaeosphaeria* sp. L487. *J Biol Chem.* 272: 199721706-21712.
536. Kawaide H. Biochemical and molecular analyses of gibberellin biosynthesis in fungi // *Bioscience Biotechnol Biochem.* 2006. 70: 583–590.
537. Kawanabe Y., Yamane H., Takahashi N. et al. Identification of GA₃ in *Neurospora crassa* and its changes during conidial germination and mycelial growth // *Agric Biol Chem.* 1985. 49: 2447-2450.
538. Kazmierczak A., Kwiatkowska M., Poplonska K. GA₃ content in antheridia of *Chara vulgaris* at the proliferative stage and in spermiogenesis estimated by capillary electrophoresis // *Folia Histochem Cytobiol.* 1999. 37 (1): 49-52.
539. Kefeli V.I., Kutacek M. Phenolic substances and their possible role in plant growth regulation. *Plant Growth Regul.* 1977. 6: 181–188.
540. Keister D.L., Tully R.E., van Berkum P.. A cytochrome P450 gene cluster in the *Rhizobiaceae* // *J Gen Appl Microbiol.* 1999. 45: 301–303.

541. Kembel S.W., O'Connor T.K., Arnold H.K., Hubbell S.P., Wright S.J., Green J.L.. Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2014. 111 (38): 13715-13720.
542. Kepczynski J., Kepczynska E. Effect of ethylene on germination of fungal spores causing fruit rot. *Fruit Sci Rep*. 1977. 4: 31-35.
543. Kerényi Z., K Zeller., Hornok L., Leslie J.F. Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex // *Appl Environ Microbiol*. 1999. 65 (9): 4071-4076.
544. Kettner J., Dörffling K. Biosynthesis and metabolism of abscisic acid in tomato leaves infected with *Botrytis cinerea* // *Planta*. 1995. 196: 627-634.
545. Khaldi N., Collemare J., Lebrun M.H., Wolfe K.H. Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi // *Genome Biol*. 2008. 9: R18.
546. Khalid A., Arshad M., Zahir Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat // *J Appl Microbiol*. 2004.96 (3): 473-480.
547. Khalifa A.Y.Z., Alsyeeh A.-M., Almalki M.A., Saleh F.A. Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa* // *Saudi J Biol Sci*. 2016. 23: 79–86.
548. Khalmuratova I., Kim H., Nam Y.J., Oh Y., Jeong M.J et al. Diversity and plant growth promoting capacity of endophytic fungi associated with halophytic plants from the west coast of Korea // *Mycobiology*. 2015. 43: 373–383.
549. Khan A.L., Jung H.Y., Lee I.J., Lee J.H., Hamayun M. et al. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10 // *BMC Microbiol*. 2012a. 12, 3.
550. Khan A.L., Shinwari Z.K., Kim Y., Waqas M., Hamayun M., Kamran M., Lee I.J. Role of endophyte *Chaetomium globosum* LK4 in growth of *Capisum annuum* by production of gibberellins and indole acetic acid // *Pak J Bot*. 2012b. 44: 1601–1607.
551. Khan A.L., Waqas M., Khan A.R., Hussain J., Kang S.M. et al. Fungal endophyte *Penicillium janthinellum* LK5 improves growth of ABA-deficient tomato under salinity // *World J Microbiol Biotechnol*. 2013. 29: 2133–2144.
552. Khan A.L., Waqas M., Kang S.M., Al-Harrasi A., Hussain J. et al. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *J Microbiol*. 2014. 52 (8): 689-695.
553. Khan M.R., Omoloso A.D. Antibacterial activity of *Galeola foliata* // *Fitoterapia*. 2004. 75: 494-486.
554. Khan S.A., Hamayun M., Yoon H., Kim H.Y., Suh S.J. et al.. Plant growth promotion and *Penicillium citrinum* // *BMC Microbiol*. 2008. 8, 231.
555. Khunnamwong P., Jindamorakot S., Limtong S. Endophytic yeast diversity in leaf tissue of rice, corn and sugarcane cultivated in Thailand assessed by a culture-dependent approach // *Fung Biol*. 2018. 122 (8): 785–799.
556. Kieber J.J. The ethylene response pathway in arabidopsis // *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1997. 48: 277-296.
557. Kim H., Nishiyama M., Kunito T., Senoo K., Kawahara K. et al. High population of *Sphingomonas* species on plant surface. *J Appl Microbiol*. 1998. 85 (4): 731–736.
558. Kishor R., Valli Khan P.S., Sharma G.L. Hybridization and in vitro culture of an orchid hybrid *Ascocenda* // *Kangla'Sci Hortic*. 2006. 108: 66-73.
559. Kiss T., Farkas E. Metal-binding ability of desferrioxamine B // *J Inclus Phenom*. 1998. 32: 385–403.
560. Kloepper J.W., Leong,J., Teintze M. et al. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils // *Curr Microbiol*. 1980. 4: 317–320.
561. Knoll A.H. Proterozoic and early Cambrian protists: evidence for accelerating evolutionary tempo // *PNAS*. 1994. 91 (15): 6743-6750.

562. Knudson L. Physiological study of the symbiotic germination of orchid seeds // Bot Gaz. 1925. 79 (4): 345–379.
563. Knudson L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds // Bot Gaz. 1922. 73 (1): 1-25.
564. Kobayashi M., Gaskin P., Spray C.R., Suzuki Y., Phin-ney B.O., MacMillan J. Metabolism and biological activity of gibberellin A4 in vegetative Shoots of *Zea mays*, *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiol. 1993. 102: 379-386.
565. Kobayashi M., Izui H., Nagasawa T., Yamada H. Nitrilase in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile: cloning of the *Alcaligenes* gene and site-directed mutagenesis of cystein residues // Proc Nat Acad Sci USA. 1993. 90: 247-251.
566. Kobayashi K., Okada M., Nouchi I. Effects of ozone on dry matter partition and yield of Japanese cultivar of rice (*Oryza saliva* L.). Agricult Ecosys Environ. 1995. 53: 109-122.
567. Koenig RL, Morris RO, Polacco JC (2002) *tRNA* is the source of low-level *trans*-Zeatin production in *Methylobacterium* spp. // J Bacteriol. 184: 1832–1842.
568. Koga J., Syono K., Ichikawa T., Adachi T. Involvement of L-tryptophan aminotransferase in indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae* // Biochim Biophys Acta. 1994. 1209 (2): 241-247.
569. Kohler J., Hernández J.A., Caravaca F., Roldán A. Induction of antioxidant enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress // Environ Experim Bot. 2009. 65 (2-3): 245-252.
570. Kohler A., Kuo A., Nagy LG., Morin E., Barry KW. et al. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists // Nat Genet. 2015. 47: 410–41.
571. Kolattukudy P.E., Kim Y., Li D., Liu Z.M., Rogers L. Early molecular communication between *Colletotrichum gloeosporioides* and its host. In: Dickman M., Freeman S., Prusky D. (eds.) / Host specificity, pathology and host pathogen interaction of *Colletotrichum*. MN: The American Phytopathol Soc. St. Paul. 2000. pp. 87-79.
572. Kolomeitseva G.L., Ryabchenko A.S., Babosha A.V. Features of the embryonic development of *Dienia ophrydis* (Orchidaceae) // Cell Tiss Biol. 2017. 11: 314–323.
573. Kolomeitseva G.L., Ryabchenko A.S., Babosha A.V., **Tsavkelova** E.A. Megasporogenesis, megagametogenesis, and embryogenesis in *Dendrobium nobile* (Orchidaceae) // Protoplasma. 2020. 257 (6). <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01573-2>.
574. Komárek J., Křtovsky J., Mareš J., Johansen J. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) using a polyphasic approach // Preslia. 2014. 86: 295–335.
575. Korolev N., Rav David D., Elad Y. The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma*-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana* // Bio Control. 2008. 53: 667–683.
576. Kozhevin P.A., Zhebrak I.S., Maslova O.A. The role of soil microorganisms in environmental and food security // Moscow Univ Soil Sci Bull. 2017. 72: 191–198.
577. Krall L., Raschke M., Zenk M.H., Baron C. The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP // FEBS Lett. 2002. 527: 315–318.
578. Kubicek C.P. Release of carboxymethyl-cellulase and β -glucosidase from cell walls of *Trichoderma reesei* // European J Appl Microbiol Biotechnol. 1981. 13 (4): 226-231.
579. Kubicek C.P., Mach R.L., Peterbauer C.K., Lorito M. *Trichoderma*: from genes to biocontrol // J Plant Pathol. 2001. 83 (2): 11-23.
580. Kudla B., Caddick M.X., Langdon T., Martinez-Rossi N.M., Bennett C.F. et al. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger // EMBO J. 1990. 9: 1355-1364.

581. Kuffner M., De Maria S., Puschenreiter M., Fallmann K., Wieshammer G. et al. Culturable bacteria from Zn- and Cd- accumulating *Salix caprea* with differential effects on plant growth and heavy metal availability // J Appl Microbiol. 2010. 108 (4): 1471-1484.
582. Kuga Y., Sakamoto N., Yurimoto H. Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms // New Phytol. 2014. 202: 594-605.
583. Kukla M., Płociniczak T., Piotrowska-Seget Z. Diversity of endophytic bacteria in *Lolium perenne* and their potential to degrade petroleum hydrocarbons and promote plant growth. // Chemosphere. 2014. 117: 40–46.
584. Kügler J.H., Le Roes-Hill M., Syldatk C., Hausmann R. Surfactants tailored by the class Actinobacteria // Front Microbiol. 2015. 6 (212): 1-23.
585. Kuklinski-Sorbal J., Araujo W.L., Mendes R., Geraldi I.O., Pizzirani-Kleiner A.A., Azevedo J.L. Isolation and characterisation of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion // Environ Microbiol. 2004. 6 (12): 1244–1251.
586. Kulkarni G.B., Sanjeevkumar S., Kirankumar B. et al. Indole-3-Acetic acid biosynthesis in *Fusarium delphinoides* Strain GPK, a causal agent of wilt in chickpea // Appl Biochem Biotechnol. 2013. 169: 1292–1305.
587. Kumar P., Rawat G.S., Wood H.P. Diversity and ecology of *Dendrobiums* (Orchidaceae) in Chotanagpur plateau, India // Taiwan. 2011. 56 (1): 23–36.
588. Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M. et al. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme // Nature. 2007. 445: 652–655.
589. Kutschera U. Plant-associated methylobacteria as co-evolved phytosymbionts // Plant Signal Behav. 2007. 2 (2): 74–78.
590. Kwak M.J., Jeong H., Madhaiyan M., Lee Y., Sa T.-M. et al. Genome information of *Methylobacterium oryzae* a plant-probiotic methylotroph in the phyllosphere // PLoS One. 2014. 9 (9): 106704.
591. Lakon G. Topographischer nachweis der keimfähigkeit der getreidefrüchte durch tetrazoliumsalze // Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft. 1942. 60: 299–305 (in German).
592. Lakshmi A. S., Narasimha G. Production of cellulases by fungal cultures isolated from forest litter soil // Annals of forest research. 2012. 55 (1): 85-92.
593. Landell M.F., Mautone J.N., Valente P. Biodiversity of yeasts associated to bromeliads in Itapuã park, Viamão // RS. Biociencias. 2006. 14: 144-149.
594. Lange A., Moreira F.M.S. Detection of *Azospirillum amazonense* in roots and rhizosphere of orchidaceae and other plant families. R Bras Ci Solo. 2002. 26 (2): 529-533.
595. Laten H. Cytokinins affect spore formation but not cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Biochim Biophys Acta. 1995. 1266 (1): 45-49.
596. Latiffah Z., Nur-Hayati M., Baharuddin S., Maziah Z. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with root rot and stem rot of *Dendrobium* // Asian J Plant Pathol. 2009. 3: 14-21.
597. Laurans F., Pepin R., Gay G. Fungal auxin overproduction affects the anatomy of *Hebeloma cylindrosporum*-*Pinus pinaster* ectomycorrhizas // Tree Physiol. 2001. 21 (8): 533-540.
598. Leclerc-Potvin C., Balmas V., Charest P.M., Jabaji-Hare S. Development of reliable molecular markers to detect non-pathogenic binucleate *Rhizoctonia* isolates (AG-G) using PCR // Mycol Res. 1999. 103: 1165–1172.
599. Legard D.E., McQuilken M.P., Whipps J.M., Fenlon J.S., Fermor T.R. et al. Studies of seasonal changes in the microbial populations on the phyllosphere of spring wheat as a prelude to the release of a genetically modified microorganism // Agricult Ecosyst Environ. 1994. 50 (2): 87-101.
600. Leslie J.F. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits // Can J Bot. 1995. 73: 282–291.

601. Leslie J.F., Anderson L.L., Bowden R.L., Lee Y. Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium* // Int J Food Microbiol. 2007. 119: 25–32.
602. Leslie J.F., Zeller K.A., Wohler M., Summerell B.A. Interfertility of two mating populations in the *Gibberella fujikuroi* species complex. In: Mulè G., Bailey J.A., Cooke B.M., Logrieco A. (eds.) / Molecular diversity and PCR-detection of toxigenic *Fusarium* species and ochratoxigenic fungi. Dordrecht: Springer. 2004, pp. 611-618.
603. Leveau J.H., Gerards S. Discovery of a bacterial gene cluster for catabolism of the plant hormone indole 3-acetic acid // FEMS Microbiol Ecol. 2008. 65: 238–250.
604. Leveau J.H., Lindow S.E. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. Proc Nat Acad Sci USA. 2001. 98: 3446–3453.
605. Leveau J.H., Lindow S.E. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290 // Appl Environ Microbiol. 2005 71: 2365–2371.
606. Li J., Kudo C., Tonouchi A. Description of *Deinococcus populi* sp. nov. from the trunk surface of a Japanese aspen tree // Arch Microbiol. 2017. 200 (2): 291-297.
607. Li O., Xiao R., Sun L., Guan C., Kong D., Hu X. Bacterial and diazotrophic diversities of endophytes in *Dendrobium catenatum* determined through barcoded pyrosequencing // PLoS One. 2017b. 12 (9): e0184717.
608. Li G., Kusari S., Golz C., Strohmman C., Spiteller M. Three cyclic pentapeptides and a cyclic lipopeptide produced by endophytic: *Fusarium decemcellulare* LG53 // RSC Adv. 2016. 6: 54092–54098.
609. Li J., Zhao G.Z., Huang H.Y., Qin S., Zhu W.Y. et al. Isolation and characterization of culturable endophytic actinobacteria associated with *Artemisia annua* L. // Antonie Van Leeuwenhoek. 2012. 101 (3): 515-527.
610. Liaimer A. Molecular communication and responses in *Nostoc*-plant symbioses // Doctoral thesis in plant physiology. Stockholm Univ. All-Duplo Offsettryck AB, Stockholm, Sweden. 2002: 1-62.
611. Lian B., Prithiviraj B., Souleimanov A., Smith D. Evidence for the production of chemical compounds analogous to nod factor by the silicate bacterium *Bacillus circulans* GY92 // Microbiol Res. 2001. 156 (3): 289-292.
612. Libbert E., Risch H. Interactions between plants and epiphytic bacteria regarding their auxin metabolism. V. Isolation and identification of the IAA-producing and destroying bacteria from pea plants // Physiol Plantarum. 1969. 22: 51-58.
613. Lichter A., Barash I., Valinsky L., Manulis S. The genes involved in cytokinin biosynthesis in *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae*: characterization and role in gall formation // J Bacteriol. 1995. 177: 4457–4465.
614. Limtong S., Kaewwichian R., Yongmanitchai W. et al. Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid // World J Microbiol Biotechnol. 2014. 30: 1785–1796.
615. Lindblad P. Cyanobacteria in symbiosis with cycads. In: Pawlovski K (ed.) / Prokaryotic endosymbionts in plants, vol 8, Microbiology monographs. Berlin, Heidelberg: Springer. 2009, pp. 225–233.
616. Lindow S.E., Brandl M.T. Microbiology of the phyllosphere // Appl Environ Microbiol. 2003. 69 (4): 1875-1883.
617. Lindow S.E., Desurmont V., Elkins C. R., McGourty G., Clark E., Brandl M.T. Occurrence of indole-3-acetic acid-producing bacteria on pear trees and their association with fruit russet // Phytopathol. 1998. 88: 1149-1157.
618. Liu Y., Guo J., Li L., Asem M.D., Zhang Y. et al. Endophytic bacteria associated with endangered plant *Ferula sinkiangensis* KM Shen in an arid land: diversity and plant growth-promoting traits // J Arid Land. 2017. 9 (3): 432-445.
619. Liu H.X., Luo Y.B., Liu H. Studies of mycorrhizal fungi of Chinese orchids and their role in orchid conservation in China – a review // Bot Rev. 2010. 76: 241–262.

620. Liu P., Nester E.W. Indoleacetic acid, a product of transferred DNA, inhibits vir gene expression and growth of *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2006. 103: 4658–4662.
621. Liu X.Z., Wang Q.M., Theelen B., Groenewald M., Bai F.Y., Boekhout T. Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses // *Studies in mycology*. 2015. 81: 1-26.
622. Liu F., Ying G.-G., Tao R., Zhao J.-L., Yang J.-F., Zhao L.-F. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities // *Environ Pollut*. 2009. 157: 1636–1642.
623. Loiret F., Ortega E., Kleiner D., Ortega-Rodes P., Rodes R., Dong Z. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane // *J Appl Microbiol*. 2004. 97: 504-511.
624. Locascio A., Blázquez M.A., Alabadí D. Dynamic regulation of cortical microtubule organization through prefoldin-DELLA interaction // *Curr Biol*. 2013. 23: 804–809.
625. Lodewyckx C., Vangronsveld J., Porteous F., Moore E.R.B., Taghavi S et al. Endophytic bacteria and their potential applications // *Crit Rev Plant Sci*. 2002. 21: 583-606.
626. Long R., Morris R., Polacco J. Cytokinin production by plant-associated methylotrophic bacteria // *Plant Physiol*. 1997, Abstr. no. 1168.
627. López-Berges M.S., Rispall N., Prados-Rosales R.C., Di Pietro A. A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase tor and the bZIP protein MeaB // *Plant Cell*. 2010. 22: 2459–2475.
628. Lorito M., Woo S.L., Fernandez I.G., Colucci G., Harman G.E., Pinter-Toro J.A., Fillipone E., Lawrence C.B., Zoina A., Tuzun S., Scala F. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens // *Proc Natl Acad Sci*. 1998. 95 (14): 7860-7865.
629. Lu J., Lamikanra O., Leong S. Effects of gibberellic acid on muscadine grape production. In: Florida State Hort Soc / Proceed Florida State Hort Soc. 1995. 108, pp. 360.
630. Lu X., Hershey D.M., Wang L., Bogdanove A.J., Peters R.J. An *ent*-kaurene-derived diterpenoid virulence factor from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* // *New Phytol*. 2015. 206: 295–302.
631. Lugtenberg B., Kamilova F. Plant growth-promoting rhizobacteria // *Ann Rev Microbiol*. 2009. 63: 541-556.
632. Lugtenberg B.J., Chin-A-Woeng T.F., Bloemberg G.V. Microbe–plant interactions: principles and mechanisms // *Antonie Leeuwenhoek*. 2002. 81: 373–383.
633. Lynd L.R., Weimer J.P., van Zyl W.H., Isak S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology // *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002. 66 (3): 506-577.
634. Lyte M. The microbial organ in the gut as a driver of homeostasis and disease // *Medical Hypotheses*. 2010. 74: 634–638.
635. Ma F., Peterson C.A. Recent insights into the development, structure and chemistry of the endodermis and exodermis // *Can J Bot*. 2003. 81: 405-421.
636. MacMillan J. Biosynthesis of the gibberellin plant hormones // *Nat Prod Rep*. 1997. 14: 221–244.
637. Madhaiyan M., Alex T.H.H., Ngoh S.T., Prithiviraj B., Ji L. Leaf-residing *Methylobacterium* species fix nitrogen and promote biomass and seed production in *Jatropha curcas* // *Biotechnol for Biofuels*. 2015. 8 (1): 222.
638. MacMillan J. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria // *J Plant Growth Regul*. 2002. 20: 387–442.
639. Maheshwari D.K., Dheeman S., Agarwal M. Phytohormone-producing PGPR for sustainable agriculture // *Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem*. 2015: 159-182.
640. Malakhova D.V., Egorova M.A., Prokudina L.I., Netrusov A.I., **Tsavkelova E.A.** The biotransformation of brewer's spent grain into biogas by anaerobic microbial communities // *World J Microbiol Biotechnol*. 2015. 31 (12): 2015–2023.

641. Malam Issa O., Défarge C., Trichet J. et al. Microbiotic soil crusts in the Sahelian part of Western Niger and their influence on soil porosity and water dynamics // *Catena*. 2009. 77: 48–55.
642. Malonek S., Rojas M.C., Hedden P., Gaskin P., Hopkins P., Tudzynski B. The NADPH:cytochrome P450 reductase gene from *Gibberella fujikuroi* is essential for gibberellin biosynthesis // *J Biol Chem*. 2004. 279: 25075–25084.
643. Malonek S., Rojas M.C., Hedden P., Gaskin P., Hopkins P., Tudzynski B. Functional characterization of two cytochrome P450 monooxygenase genes, P450–1 and P450–4, of the gibberellic acid gene cluster in *Fusarium proliferatum* (*Gibberella fujikuroi* MP-D) // *Appl Environ Microbiol*. 2005a. 71: 1462–1472.
644. Malonek S., Rojas M.C., Hedden P., Hopkins P., Tudzynski B. Restoration of gibberellin production in *Fusarium proliferatum* by functional complementation of enzymatic blocks // *Appl Environ Microbiol*. 2005b. 71: 6014–6025.
645. Manimala M.R.A., Murugesan R. In vitro antioxidant and antimicrobial activity of carotenoid pigment extracted from *Sporobolomyces* sp. isolated from natural source // *J Appl Nat Sci*. 2014. 6: 649–653.
646. Mancuso-Nichols C.A., Garon S., Bowman J.P., Raguenes G., Guezennec J. Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates // *J Appl Microbiol*. 2004. 96: 1057–1066.
647. Mano H., Tanaka F., Nakamura C., Kaga H., Morisaki H. Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field // *Microb Environ*. 2007. 22: 175–185.
648. Mansouri S., Bunch A. Bacterial ethylene synthesis from 2-oxo-4-thiobutyric acid and from methionine // *J Gen Microbiol*. 1989. 135 (11): 2819–2827.
649. Manulis S., Haviv-Chesner A., Brandl M.T., Lindow S.E., Barash I. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae* // *Mol Plant Microbe Interact*. 1998. 11: 634–642.
650. Manulis S., Shafrir H., Epstein E., Lichter A., Barash I. Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. // *Microbiology*. 1994. 140 (5): 1045–1050.
651. Maor R., Haskin S., Levi-Kedmi H., Sharon A. In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* // *Appl Environ Microbiol*. 2004. 70 (3): 1852–1854.
652. Marasini R., Joshi S. Antibacterial and antifungal activity of medicinal orchids growing in Nepal // *J Nepal Chem Soc*. 2012. 29: 104–109.
653. Margulis L. Symbiogenesis and symbiogenesis. In: Margulis L., Fester R. (eds.) / *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis*. Cambridge, MA: MIT Press. 1991, pp. 1–14.
654. Marsalek B., Simek M. Abscissic acid and its synthetic analog in relation to growth and nitrogenase activity of *Azotobacter chroococcum* and *Nostoc muscorum* // *Folia Microbiol*. 1992. 37 (2): 159–160.
655. Marsalek B., Zahradnickova H., Hronkova M. Extracellular production of abscissic acid by soil algae under salt, acid or drought stress // *Zeitschrift für Naturforschung*. 1992b. 47c: 701–704.
656. Marschner P., Yang C.H., Lieberei R., Crowley D.E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere // *Soil Biol Biochem*. 2001. 33 (11): 1437–1445.
657. Martos F., Munoz F., Paillet T., Kottke I., Gonneau C., Selosse M.-A. The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids // *Molecular Ecology*. 2012. 21: 5098–5109.

658. Martınez-Medina A., Roldán A., Albacete A., Pascual Jose A. The interaction with arbuscular mycorrhizal fungi or *Trichoderma harzianum* alters the shoot hormonal profile in melon plants // *Phytochem.* 2011. 72 (2–3): 223–229.
659. Marques J.M., da Silva T.F., Vollú R.E., de Lacerda J.R.M., Blank A.F. et al. Bacterial endophytes of sweet potato tuberous roots affected by the plant genotype and growth stage // *Applied Soil Ecology.* 2015. 96: 273–281.
660. Masalha J., Kosegarten H., Elmaci Ö. et al. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower // *Biol Fertil Soils.* 2000. 30: 433–439.
661. Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review // *Renew Sust Energ Rev.* 2010. 14: 217–232.
662. Mata-Alvarez J., Macé S., Llabrés P. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives // *Biores. Technol.* 2000. 74: 3–16.
663. Mauch-Mani B., Mauch F. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions // *Curr Opin Plant Biol.* 2005. 8: 409–414.
664. Maurhofer M., Hase C., Meuwly P., Métraux J. -P., Défago G. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production // *Phytopathol.* 1994. 84: 139–146.
665. McBride R.P., Hayes A.J. Phylloplane of European larch // *Transact British Mycol Soc.* 1977. 69: 39–46.
666. McCormack P.J., Wildman H.G., Jeffries P. Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeasts and yeastlike fungi // *Appl Environ Microbiol.* 1994. 60 (3): 927–931.
667. McHatton R. Orchid pollination: exploring a fascinating world // *Orch Pollin Ecol.* 2011: 338– 349.
668. Mcinroy J.A., Kloepper J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn // *Plant Soil.* 1995. 173 (2): 337–342.
669. McKendrick S.L, Leake J.R., Read D.J. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorrhiza trifida* through shared hyphal connections // *New Phytol.* 2000a. 145: 539–548.
670. Mckendrick S.L. In vitro germination of orchids: a manual // Ceiba Foundation for Tropical Conservation. 2000b, 17pp.
671. Meeks J.C., Elhai J. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states// *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002. 66: 94–121.
672. Meixner C., Ludwig-Müller J., Miersch O., Gresshoff P., Staehelin C., Vierheilig H. Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant nts1007 // *Planta.* 2005. 222: 709–715.
673. Mendez C., Baginsky C., Hedden P., Gong F., Caru M., Rojas M.C. Gibberellin oxidase activities in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids // *Phytochem.* 2014. 98: 101–109.
674. Mehnaz S., Lazarovits G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions // *Microb Ecol.* 2006. 51: 326–335.
675. Mercado-Blanco J., Prieto P. Bacterial endophytes and root hairs // *Plant Soil.* 2012. 361: 301–306.
676. Mercier J., Lindow S.E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes // *Appl Environ Microbiol.* 2000. 66: 369–374.
677. Merckx V.S., Janssens S.B., Hynson N.A., Specht C.D., Bruns T.D., Smets E.F. Mycoheterotrophic interactions are not limited to a narrow phylogenetic range of arbuscular mycorrhizal fungi // *Molecular Ecology.* 2012. 21 (6): 1524–1532.

678. Merrick M.J., Gibbins J.R., Postgate J.R. A rapid and efficient method for plasmid transformation of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* // J Gen Microbiol. 1987. 133: 2053–2057.
679. Meuwley P., Pilet P.E. Local treatment with indole-3-acetic acid induces differential growth responses in *Zea mays* L. roots // Planta. 1991. 185: 58–64.
680. Michelena G.L., Martínez A., Bell A., Carrera E., Valencia R. Scale-up of dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* in fed batch fermentation // Braz Arch Biol Technol. 2003. 46 (3): 455-459.
681. Micheneau C., Fournel J., Warren B.H., Hugel S., Gauvin-Bialecki A. et al. Orthoptera, a new order of pollinators // Ann Bot. 2010. 105: 355– 364.
682. Michielse C.B., Pfannmueller A., Macios V. et al. The interplay between the GATA transcription factors AreA, the global nitrogen regulator and AreB in *Fusarium fujikuroi* Mol Microbiol. 2014. 91: 472-493.
683. Mihlan M., Homann V., Liu T.-WD., Tudzynski B. AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR // Mol Microbiol. 2003. 47: 975-991.
684. Miersch O., Bohlmann H., Wasternack C. Jasmonates and related compounds from *Fusarium oxysporum* // Phytochem. 1999. 50 (4): 517-523.
685. Miersch O., Brückner B., Schneider G., Sembdner G. Cyclopentane fatty acids from *Gibberella fujikuroi* // Phytochem. 1992. 31: 3835–3877.
686. Miersch O., Günther T., Fritsche W., Sembdner G. Jasmonates from different fungal species // Nat Prod Lett. 1993. 2 (4): 293-299.
687. Mihlan M., Homann V., Liu T.W., Tudzynski B. AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR // Mol Microbiol. 2003. 47: 975–991.
688. Milborrow B.V., Lee H.S.. Endogenous biosynthetic precursors of (+)-abscisic acid. VI—Carotenoids and ABA are formed by the ‘non-mevalonate’ triose-pyruvate pathway in chloroplasts // Aust J Plant Physiol. 1998. 25: 507–512.
689. Miller G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // Analytical chemistry. 1959. 31(3): 426-428.
690. Miller C.O., Skoog F., Saltz vN.H., Strong M.. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. J Am Chem Soc. 1955. 77: 1329–1334.
691. Miller W.G., Leveau J.H.J., Lindow S.E. Improved gfp and inaZ broad-host-range promoter-probe vectors // Mol Plant Microbe Interact. 2000. 13: 1243–1250.
692. Millonig G. Advantages of phosphate buffer for OsO₄ solution in fixation // J Appl Physiol. 1961. 32: 1637-1639.
693. Mills L.J., Van Staden J. Extraction of cytokinins from maize, smut tumors of maize and *Ustilago maydis* cultures // Physiol Plant Pathol. 1978. 13: 73–80.
694. Mohan M., Mukerji K.G. Some biologically active extracellular products of blue-green algae // Phycos. 1979. 18: 73-82.
695. Mok D.W., Mok M.C. Cytokinin metabolism and action // Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 2001. 52: 89–118.
696. Mollenhauer H. A comparison of root cap cells of epiphytic, terrestrial and aquatic plants // Am J Bot. 1967. 54: 1249–1259.
697. Montañez A., Abreu C., Gill P.R. et al. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by 15N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs // Biol Fertil Soils. 2009. 45: 253–263.
698. Montingelli M.E., Tedesco S., Olabi A.G. Biogas production from algal biomass: a review // Ren Sustain Energy Rev. 2015. 43: 961–972.
699. Moore R.T. The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Asorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis* and *Rhizoctonia* // Mycotaxon. 1987. 29: 91-99.

700. Moreira A.S.P., Isaias R.M.S. Comparative anatomy of the absorption roots of terrestrial and epiphytic orchids // Braz Arch Biol Technol. 2008. 51: 83–93.
701. Morohoshi T., Wang W.Z., Someya N., Ikeda T.. Genome sequence of *Microbacterium testaceum* StLB037, an N-acylhomoserine lactone-degrading bacterium isolated from potato leaves // J Bacteriol. 2011. 193 (8): 2072–2073.
702. Morris C.E., Kinkel L.L. Fifty years of phyllosphere microbiology: significant contributions to research in related fields. In: Lindow S.E., Hecht-Poinar I., Elliot V. (eds.) /Phyllosphere Microbiology. Minneapolis: APS Press. 2002, pp. 353–363.
703. Morris C., Monier J.-M. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria // Ann Rev Phytopathol. 2003. 41 (1): 429–453.
704. Morrison E.N., Emery R.J.N., Saville B.J. Phytohormone involvement in the *Ustilago maydis*–*Zea mays* pathosystem: relationships between abscisic acid and cytokinin levels and strain virulence in infected cob tissue // PLoS One. 2015. 10:e0130945.
705. Morrone D., Chambers J., Lowry L., Kim G., Anterola A. et al. Gibberellin biosynthesis in bacteria: separate ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum* // FEBS Lett. 2009. 583: 475–480.
706. Mosquera-Espinosa A.T., Bayman P., Prado G.A., Gómez-Carabali A., Otero J.T. The double life of *Ceratobasidium* orchid mycorrhizal fungi and their potential for biocontrol of *Rhizoctonia solani* sheath blight of rice // Mycologia. 2013. 205: 141–150.
707. Mukhtar I., Mushtaq S., Ali A., Khokhar I. Phyllospheric microflora of *Cuscuta pedicillata* Ledeb. and its host *Trifolium alexandrinum* L // Sarhad J Agricult. 2012. 28 (3): 437–441.
708. Müller M., Deigle C., Ziegler H. Hormonal interaction in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) and their effects on plant development. Zeit Pflanzen Bodenkunde. 1989. 152: 247–254.
709. Muñoz G.A., Agosin A. Glutamine involvement in nitrogen control of gibberellic acid production in *Gibberella fujikuroi* // Appl Environ Microbiol. 1993. 59: 4317–4322.
710. Murakami-Mizukami Y., Yamamoto Y., Yamaki S. Analysis of indole acetic acid and abscisic acid contents in nodules of soybean plants bearing VA mycorrhizas // Soil Sci Plant Nutr. 1991. 37: 291–298.
711. Nagahama K., Ogawa T., Fujii T., Tazaki M., Tanase S. et al. Purification and properties of an ethylene-forming enzyme from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* PK2 // J Gen Microbiol. 1991. 137 (10): 2281–2286.
712. Nagahama K., Yoshino K., Matsuoka M., Sato M., Tanase S. et al. Ethylene production by strains of the plant-pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* depends upon the presence of indigenous plasmids carrying homologous genes for the ethylene-forming enzyme // Microbiology. 1994. 140: 2309–2313.
713. Nagel R., Peters R.J. Investigating the phylogenetic range of gibberellin biosynthesis in bacteria. Mol Plant Microbe Interact. 2017. 30 (4): 343–349.
714. Nagel R., Bieber J.E., Schmidt-Dannert M.G., Nett R.S., Peters R.J. A third class: functional gibberellin biosynthetic operon in beta-proteobacteria // Front Microbiol. 2018. 9: 2916.
715. Nair D.N., Padmavathy S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans // Sci World J. 2014: 1–11.
716. Nakamura T., Tomita K., Kawanabe Y., Murayama T. Effect of auxin and gibberellin on conidial germination in *Neurospora crassa* II. "Conidial density effect" and auxin // Plant Cell Physiol. 1982. 23: 1363–1369.
717. Nakashita H., Yasuda M., Nitta T., Asami T., Fujioka S. et al. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice // Plant J. 2003. 33 (5): 887–898.
718. Nambara E., Marion-Poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism // Annu Rev Plant Biol. 2005. 56: 165–185.

719. Nutaratat P., Srisuk N., Duangmal K., Yurimoto H., Sakai Y. *Roseomonas musae* sp. nov., a new bacterium isolated from a banana phyllosphere // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2012. 103 (3): 617–624.
720. Nemecek-Marshall M., MacDonald R.C., Franzen J.J., Wojciechowski C.L., Fall R. Methanol emission from leaves (enzymatic detection of gas-phase methanol and relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development) // *Plant Physiol*. 1995. 108 (4): 1359-1368.
721. Neill S.J., Burnett E.C., Desikan R., Hancock J.T. Cloning of a wilt-responsive cDNA from an *Arabidopsis thaliana* suspension culture cDNA library that encodes a putative 9-cis-epoxy carotenoid dioxygenase // *J Experim Bot*. 1987. 49: 1893-1894.
722. Nett R.S., Contreras T., Peters R.J. Characterization of CYP115 as a gibberellin 3-oxidase indicates that certain rhizobia can produce bioactive gibberellin A4. *ACS // Chem Biol*. 2017a. 12: 912–917.
723. Nett R.S., Montanares M., Marcassa A., Lu X., Nagel R. et al. Elucidation of gibberellin biosynthesis in bacteria reveals convergent evolution // *Nat Chem Biol*. 2017b. 13: 69–74.
724. Neubauer U., Nowack B., Furrer G., Schulin R. Heavy metal sorption on clay minerals affected by the siderophore desferrioxamine B // *Environ Sci Technol*. 2000. 34: 2749-2755.
725. Neustupa J., Škaloud P. Diversity of subaerial algae and cyanobacteria on tree bark in tropical mountain habitats // *Biologia*. 2008. 63: 806–812.
726. Niehaus E.-M., Münsterkötter M., Proctor R.H., Brown D.W., Sharon A., Idan Y., Oren-Young L., Sieber C.M., Novák O., Pěňčík A., Tarkowská D., Hromadová K., Freeman S., Maymon M., Elazar M., Youssef S.Y., El-Shabrawy El S.M., Shalaby A.B.A., Houterman P., Brock N.L., Burkhardt I., **Tsavkelova** E.A., Dickschat J.S., Galuszka P., Güldener U., Tudzynski B. Comparative “Omics” of the *Fusarium fujikuroi* Species Complex Highlights Differences in Genetic Potential and Metabolite Synthesis // *Gen Biol Evol*. 2016. 8 (11): 3574–3599.
727. Niemi K., Vuorinen T., Ernstsén A., Haggman H. Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cuttings in vitro // *Tree Physiol*. 2002. 22 (17): 1231-1239.
728. Nieto K., Frankenberger W. Biosynthesis of cytokinins by *Azotobacter chroococcum* // *Soil Biol Biochem*. 1989. 21 (7): 967-972.
729. Nilsson M., Bhattacharya J., Rai A.N., Bergman B. Colonization of roots of rice (*Oryza sativa*) by symbiotic *Nostoc* strains // *New Phytol*. 2002. 156: 517–525.
730. Nixon B.T., Ronson C.W., Ausubel F.M. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntxB* and *ntxC*. *PNAS*. 1986. 83 (20): 7850-7854.
731. Nobles D.R., Romanovicz D.K., Brown Jr. R.M. Cellulose in Cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase? // *Plant Physiol*. 2001. 127: 529–542.
732. Noel T., Sheng C., Yost C., Pharis R., Hynes M. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce // *Can J Microbiol*. 1996. 42 (3): 279-283.
733. Noel T.C., Sheng C., Yost C.K., Pharis R.P., Hynes M.F. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce // *Can J Microbiol*. 1996. 42: 279-283
734. Nontachaiyapoom S., Sasirat S., Manoch L. Isolation and identification of *Rhizoctonia*-like fungi from roots of three orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium* and *Cymbidium*, collected in Chiang Rai and Chiang Mai provinces of Thailand // *Mycorrhiza*. 2010. 20: 459–471.
735. Nontachaiyapoom S., Sasirat S., Manoch L. Symbiotic seed germination of *Grammatophyllum speciosum* Blume and *Dendrobium draconis* Rchb. f., native orchids of Thailand // *Sci Hortic*. 2011. 130: 303–308.

736. Nowak J., Sonaike B., Lawson G. Auxin induced stress tolerance in algae // *Environ Pollut.* 1988. 51 (3): 213-218.
737. Nurfadilah S., Swarts N.D., Dixon K.W., Lambers H., Merritt D.J. Variation in nutrient-acquisition patterns by mycorrhizal fungi of rare and common orchids explains diversification in a global biodiversity hotspot // *Ann Bot.* 2013. 111: 1233-1241.
738. Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria // *Appl Environ Microbiol.* 1997. 63 (8): 3327-3332.
739. Nygren K., Dubey M., Zapparata A., Iqbal M., Tzelepis G. D. et al. The mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea* responds with both common and specific gene expression during interspecific interactions with fungal prey // *Evol Appl.* 2018. 11: 931–949.
740. O'Donnell K., Cigelnik E., Nirenberg H.I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex // *Mycologia.* 1998. 90: 465–493.
741. Oberhansli T., Defago G., Haas D. Indole-3-acetic-acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens* – role of tryptophan side-chain oxidase // *J Gen Microbiol.* 1991. 137: 2273– 2279.
742. Ohnishi T. Recent advances in brassinosteroid biosynthetic pathway: insight into novel brassinosteroid shortcut pathway // *J Pestic Sci.* 2018. 43(3): 159–167.
743. Olivain C., Alabouvette C. Colonization of tomato by a nonpathogenic strain of *Fusarium oxysporum* // *New Phytol.* 1997. 137: 481–494.
744. Omacini M., Eggers T., Bonkowski M., Gange A.C., Jones T.H. Leaf endophytes affect mycorrhizal status and growth of co-infected and neighbouring plants // *Funct Ecol.* 2006. 20: 226-232.
745. Opreș O., Copaciu F., Loredana Soran M., Ristoiu D., Niinemets Ü., Copolovici L. Influence of nine antibiotics on key secondary metabolites and physiological characteristics in *Triticum aestivum*: leaf volatiles as a promising new tool to assess toxicity // *Ecotox Environ Safety.* 2013. 87: 70-79.
746. Ona O., Van Impe J., Prinsen E., Vanderleyden J. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled// *FEMS Microbiol Lett.* 2005. 246: 125-132.
747. Ordentlich A., Elad Y., Chet I. The role of chitinase of *Serratia marcescens* for control of *Sclerotium rolfsii* // *Soil Boil Biochem.* 1988. 19: 747-751.
748. Ördög Ördög V., Stirk W.A., van Staden J., Novak O., Strnad M. Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the Chlorophyta // *J Phycol.* 2004. 40: 88–95.
749. Oren L., Ezrati S., Cohen D., Sharon A. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate // *Appl Environ Microbiol.* 2003. 69 (3): 1695-1701.
750. Otero J.T., Ackerman J.D., Bayman P. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids // *Am J Bot.* 2002. 89: 1852–1858.
751. Otero J.T., Mosquera T.A., Flanagan N.S. Tropical orchid mycorrhizae: potential applications in orchid conservation, commercialization, and beyond // *Lankesteriana.* 2013. 13 (1–2): 57–63.
752. Padmavathi T., Nandy V., Agarwal P. Optimization of the medium for the production of cellulases by *Aspergillus terreus* and *Mucor plumbeus* // *Europ J Exp Biol.* 2012. 2 (4): 1161-1170.
753. Palumbo J.D., Yuen G.Y., Jochum C.C., Tatum K., Kobayashi D.Y. Mutagenesis of beta-1,3-glucanase genes in *Lysobacter enzymogenes* strain C3 results in reduced biological control activity toward bipolaris leaf spot of tall fescue and *Pythium* damping-Off of sugar beet // *Phytopathol.* 2005. 95 (6): 701-707.
754. Paparu P., Dubois T., Coyne D., Viljoen A. Defense-related gene expression in susceptible and tolerant bananas (*Musa* spp.) following inoculation with non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes and challenge with *Radopholus similis* // *Physiol Mol Plant Pathol.* 2007. 71 (4–6): 149-157.

755. Park K-H., Lee O-M., Jung H.-I., Jeong J.-H., Jeon Y.-D. et al. Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil // Appl Microbiol Biotechnol. 2010. 86 (3): 947–955.
756. Parthibhan S., Franklin B.J.H., Muthukumar M., Sherif N.A., Senthil Kumar T., Rao M.V. Influence of nutritional media and photoperiods on in vitro asymbiotic seed germination and seedling development of *Dendrobium aqueum* Lindley // African J Plant Sci. 2012. 6: 383–393.
757. Patten C., Glick B. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid // Can J Microbiol. 1996. 42 (3): 207-220.
758. Patten C., Glick B. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system // Appl Environ Microbiol. 2002. 68 (8): 3795-3801.
759. Pavlova A.S., Leontieva M.R., Smirnova T.A., Kolomeitseva G.L., Netrusov A.I., **Tsavkelova E.A.** Colonization strategy of the endophytic plant growth promoting strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Klebsiella oxytoca* on the seeds, seedlings and roots of the epiphytic orchid, *Dendrobium nobile* Lindl // J Appl Microbiol. 2017. 123: 217-232.
760. Pažout J., Pažoutová S. Ethylene is synthesized by vegetative mycelium in surface cultures of *Penicillium cyclopium* Westling // Can J Microbiol. 1989. 35: 384-387.
761. Pedrosa F., Elmerich C. Regulation of nitrogen fixation and ammonium assimilation in associative and endophytic nitrogen fixing bacteria. In: Elmerich C., Newton W.E. (eds.) /Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. Nitrogen fixation: origins, applications, and research progress. Dordrecht: Springer. 2007, vol 5, pp. 41-71.
762. Peiffer J.A., Spor A., Koren O., Jin Z., Tringe S.G. et al. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. Proc Nat Acad Sci USA. 2013. 110: 6548–6553.
763. Peitersen N. Production of cellulase and protein from barley straw by *Trichoderma viride* // Biotechnol Bioeng. 1975. 17 (3). 361-374.
764. Peix A., Rivas-Boyer A.A., Mateos P.F., Rodriguez-Barrueco C., MartiNez-Molina E., Velazquez E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions // Soil Biol Biochem. 2001. 33 (1): 103–10.
765. Peleg Z., Blumwald E. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants // Curr Opin Plant Biol. 2011. 14: 290–295.
766. Peng X., Bruns M.A. Development of a nitrogen-fixing cyanobacterial consortium for surface stabilization of agricultural soils // J Appl Phycol. 2019. 31: 1047–1056.
767. Peng X., Wang Y., Tang L.J., Li X.X., Xiao Y.W. et al. Yeasts from Nanfeng mandarin plants: occurrence, diversity and capability to produce indole-3-acetic acid // Biotech Biotechnol Equip. 2018: 1–11.
768. Penrose D., Glick B. Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of ACC deaminase containing bacteria on roots of canola seedlings // Can J Microbiol. 2001. 47 (1): 77-80.
769. Pereira S.I.A., Castro P.M.L. Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils // Environ Sci Pollut Res. 2014. 21 (24): 14110–14123.
770. Pereira I., Ortega R., Barrientos L. et al. Development of a biofertilizer based on filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria for rice crops in Chile // J Appl Phycol. 2009. 21: 135–144.
771. Perotto S., Rodda M., Benetti A., Sillo F., Ercole E. et al. Gene expression in mycorrhizal orchid protocorms suggests a friendly plant-fungus relationship // Planta. 2014. 239 (6): 1337–1349.
772. Peterson R.L., Currah R.S. Synthesis of mycorrhizae between protocorms of *Goodyera repens* (Orchidaceae) and *Ceratobasidium cereale* // Can J Bot. 1990. 68: 1117-1125.

773. Peterson R.L., Farquhar M.L. Mycorrhizas—Integrated development between roots and fungi // *Mycologia*. 1994. 86 (3): 311-326.
774. Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves. Microbial ecology of leaves: In: Andrews J.H., Hirano S.S. (eds.) / *Microbial ecology of leaves*. Brock, Springer Series in Contemporary Bioscience. NY: Springer. 1991, pp. 179-197.
775. Pham V.T.K., Rediers H., Ghequire M.G.K. et al. The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15 // *Arch Microbiol*. 2017. 199: 513–517.
776. Piccoli P., Masciarelli O., Bottini R. Metabolism of 17, 17[2H₂]-gibberellins A4, A9, and A20 by *Azospirillum lipoferum* in chemically-defined culture medium // *Symbiosis*. 1996. 21:167–178.
777. Pierson L.S. 3rd, Wood D.W., Pierson E.A. Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria // *Annu Rev Phytopathol*. 1998. 36: 207-225
778. Pinaria A.G., Liew E.C.Y., Burgess L.W. *Fusarium* species associated with vanilla stem rot in Indonesia // *Australas Plant Pathol*. 2010. 39: 176-183.
779. Pishchik V., Vorobyev N., Chernyaeva I. et al. Experimental and mathematical simulation of plant growth promoting rhizobacteria and plant interaction under cadmium stress // *Plant and Soil*. 2002. 243: 173–186.
780. Pontecorvo G.V., Poper J.A., Hemmonns L.M., MacDonald K.D., Buften A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans* // *Adv Genet*. 1953. 141: 141–238
781. Poonguzhali S., Madhaiyan M., Sa T. Cultivation-dependent characterization of rhizobacterial communities from field grown Chinese cabbage *Brassica campestris* ssp *pekinensis* and screening of traits for potential plant growth promotion // *Plant Soil*. 2006. 286 (1-2): 167-180.
782. Powell G., Hommes N., Kuo J., Castle L., Morris R. Inducible expression of cytokinin biosynthesis in *Agrobacterium tumefaciens* by plant phenolics // *Mol Plant Microbe Interact*. 1988. 1 (6): 235-242.
783. Prasanna R., Chaudhary V., Gupta V. et al. Cyanobacteria mediated plant growth promotion and bioprotection against *Fusarium* wilt in tomato // *Eur J Plant Pathol*. 2013. 136: 337–353.
784. Prasanna R., Joshi M., Rana A., Nain L. Modulation of IAA Production in Cyanobacteria by tryptophan and light // *Polish J Microbiol*. 2010. 59 (2): 99-105.
785. Press C.M., Wilson M., Tuzun S., Kloepper J. W. Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco // *Mol Plant Microbe Interact*. 1997. 10: 761-768.
786. Pridgeon A.M. Anatomical adaptations in Orchidaceae // *Lindleyana*. 1986a. 1(2): 96-101.
787. Pridgeon A.M. Hollow females? // *Amer Orch Soc Bull*. 1986b. 55 (6): 572-574.
788. Pridgeon A.M. The velamen and exodermis of orchid roots. In: Arditti J (ed.) / *Orchid biology: reviews and perspectives*. NY: Cornell University Press. 1987, 349 p.
789. Prinsen E., Costacurta A., Michiels K., Vanderleyden J., Van Onckelen H. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Mol Plant Microbe Interact*. 1993. 6: 609– 615.
790. Prior R., Mittelbach M., Begerow D. Impact of three different fungicides on fungal epiphytic and endophytic communities of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and broad bean (*Vicia faba*) // *J Environ Sci Health. Part B*. 2017. 52 (6): 376-386.
791. Prusty R., Grisafi P., Fink G. The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae* // *PNAS*. 2004. 101 (12): 4153-4157.
792. Puri A., Padda K.P., Chanway C.P. Seedling growth promotion and nitrogen fixation by a bacterial endophyte *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R and its GFP derivative in corn in a long-term trial // *Symbiosis*. 2016. 69: 123–129.

793. Qadir A., Hewett E.W., Long P.G. Ethylene production by *Botrytis cinerea*. Postharvest Biol Technol. 1997. 11: 85-91.
794. Qin S., Chen H.-H., Zhao G.-Z., Li J., Zhu W.-Y. et al. Abundant and diverse endophytic actinobacteria associated with medicinal plant *Maytenus austroyunnanensis* in Xishuangbanna tropical rainforest revealed by culture-dependent and culture-independent methods // Environ Microbiol Rep. 2012. 4 (5): 522–531.
795. Qin Y., Wu J., Xiao B., Hojo T., Li Y.Y. Biogas recovery from two-phase anaerobic digestion of food waste and paper waste: optimization of paper waste addition // Sci Total Environ. 2018. 634: 1222-1230.
796. Rademacher W., Graebe J.E. Gibberellin A4 produced by *Sphaceloma manihoticola*, the cause of the superelongation disease of cassava (*Manihot esculenta*) // Biochem Biophys Res Commun. 1979. 91: 35–40.
797. Rademacher W. Occurrence of gibberellins in different species of the fungal genera *Sphaceloma* and *Elsinoe* // Phytochem. 1992. 31: 4155–4157.
798. Radhakrishnan R., Lee I.J. Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. Plant Physiol Biochem. 2016. 109: 181–189.
799. Rai A.N., SÖderback E., Bergman B. Cyanobacterium–plant symbioses // New Phytol. 2000. 147: 449-481.
800. Rai A.N., Bergman B. Creation of new nitrogen-fixing cyanobacteria associations // Proc Royal Irish Acad. 2002. 102B: 65–68.
801. Rai A.N., Singh A.K., Syiem M.B. Plant growth-promoting abilities in cyanobacteria. In Mishra A.K., Tiwari D.N., Rai A.N. (eds.) /Cyanobacteria. Academic Press. 2019, pp. 459-476.
802. Ram A.T., Shamina M. New reports of the cyanobacterial association on the roots of epiphytic orchid, *Dendrobium crumenatum* Sw. Int J Chem Biol Sci. 2015a. 1 (12): 19-21.
803. Ram A.T., Shamina M. Identification of cyanobacterial association from the roots of the terrestrial orchid, *Spathoglottis plicata* Blume. // Int J. 2015b. 3 (5): 1477-1479.
804. Ramey B.E., Koutsoudis M., von Bodman SB., Fuqua C. Biofilm formation in plant-microbe associations // Curr Opin Microbiol. 2004. 7: 602-609.
805. Rana A., Joshi M., Prasanna R., Shivay Y.S., Nain L. Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria // Eur J Soil Biol. 2012. 50: 118–126.
806. Rao P., Hunter A., Kashpur O., Normanly J. Aberrant synthesis of indole-3-acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* triggers morphogenic transition, a virulence trait of pathogenic fungi // Genetics. 2010. 185: 211-220.
807. Rasmussen H.N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza // Plant and Soil. 2002. 244: 149–163.
808. Rasmussen H.N., Dixon K.W., Jersáková J., Těšitelová T. Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements // Ann Bot. 2015. 116 (3): 391–402.
809. Rasmussen H.N., Rasmussen F.N. Climatic and seasonal regulation of seed plant establishment in *Dactylorhiza majalis* interfered from symbiotic experiments *in vitro* // Lindleyana. 1991. 6: 221-227.
810. Rasmussen H.N. Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): requirements for germination and establishment of mycorrhiza // Physiol Plant. 1992. 86: 161–167.
811. Rasmussen H.N. Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press, Cambridge UK. 1995. 444p.
812. Rasmussen H.N., Whigham D.F. Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids // Amer J Bot. 1993. 80: 1374–1378.

813. Rasmussen U., Nilsson M. Cyanobacterial diversity and specificity in plant symbioses. In: Rai A.N., Bergman B., Rasmussen U. (eds.) / *Cyanobacteria in symbiosis*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2002, pp. 313–328.
814. Reineke G., Heinze B., Schirawski J., Buettner H., Kahmann R., Basse C.W. Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation // *Mol Plant Pathol*. 2008. 9: 339-355.
815. Rezzonico F., Defago G., Moenne-Loccoz Y. Comparison of ATPase-encoding type III secretion system hrcN genes in biocontrol fluorescent *Pseudomonads* and in phytopathogenic proteobacteria // *Appl Environ Microbiol*. 2004. 70: 5119–5131.
816. Rim S.-O., Lee J.-H., Choi W.-Y. et al *Fusarium proliferatum* KGL0401 as a new gibberellin-producing fungus // *J Microbiol Biotechnol*. 2005. 15: 809–814.
817. Rim S.-O., You Y.-H., Yoon H. et al. Characterization of gibberellin biosynthetic gene cluster from *Fusarium proliferatum*. *J Microbiol Biotechnol*. 2013. 23: 623–629.
818. Rinaudi L.V., Giordano W. An integrated view of biofilm formation in rhizobia // *FEMS Microbiol Lett*. 2010. 304 (1): 1–11.
819. Rincon A., Priha O., Sotta B., Bonnet M., Le Tacon F. Comparative effects of auxin transport inhibitors on rhizogenesis and mycorrhizal establishment of spruce seedlings inoculated with *Laccaria bicolor* // *Tree Physiol*. 2003. 23 (11): 785-791.
820. Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.J. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria // *J Gen Microbiol*. 1979. 111: 1-61.
821. Rizk M.A. Growth activities of the sugarbeet pathogens *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Rhizoctonia solani* Kuhn. and *Fusarium verticillioides* Sacc. under cyanobacterial filtrates stress // *Plant Pathogol J*. 2006. 5: 212–215.
822. Robbs P.G., Hagler A.N., Mendonça-Hagler L.C. Yeasts associated with a pineapple plantation in Rio de Janeiro, Brazil // *Yeast*. 1989. 5: 485-489.
823. Roberts D.L., Dixon K.W. Orchids *Curr Biol*. 2008. 18 (8): 325–329.
824. Robinson M., Riov J., Sharon A. Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* // *App Environ Microbiol*. 1998. 64: 5030-5032.
825. Rocchi S., Valot B., Reboux G., Millon L. DNA metabarcoding to assess indoor fungal communities: lectrostatic dust collectors and Illumina sequencing // *J Microbiol Meth*. 2017. 139: 107-112.
826. Rodrigues K. R., Samuels G. J. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm // *Mycol Res*. 1990. 94 (6): 827-830.
827. Rodriguez C., Alaswad A., El-Hassan Z., Olabi A.G. Mechanical pretreatment of waste paper for biogas production // *Waste Manag*. 2017. 68: 157-164.
828. Rodrigues C., Vandenberghe L.P.D., de Oliveira J., Socol C.R. New perspectives of gibberellic acid production: a review // *Crit Rev Biotechnol*. 2012. 32: 263–273.
829. Rojas M.C., Hedden P., Gaskin P., Tudzynski B. The P450–1 gene of *Gibberella fujikuroi* encodes a multifunctional enzyme in gibberellin biosynthesis // *Proc Nat Acad Sci USA*. 2001. 98: 5838–5843.
830. Rosas S., Soria R., Correa N., Abdala G. Jasmonic acid stimulates the expression of nod genes in *Rhizobium* // *Plant Mol Biol*. 1998. 38 (6): 1161-1168.
831. Rossi F., Olguin E.J., Diels L., De Philippis R. Microbial fixation of CO₂ in water bodies and in drylands to combat climate change, soil loss and desertification // *Nat Biotechnol*. 2015. 32: 109–120.
832. Roth U., Friebe A., Schnabl H. Resistance Induction in plants by a brassinosteroid-containing extract of *Lychnis viscaria* L. // *Zeit Naturforsch*. 2000. 55 (7-8): 552-559.
833. Roy A., Tripathy P., Adhikary S.P. UV protecting pigment of epilithic cyanobacteria occurring on the various regions of India. In: Subramanian G., Kaushik B.D., Venkataraman

- G.S. (eds.) / Cyanobacterial biotechnology. Proceed Int Sympos (Sep 18-21). New Delhi: Oxford & IBH publishing. 1998, pp. 439–447.
834. Rupp L.A., DeVries H.E.II, Mudge K.W. Effect of aminocyclopropane carboxylic acid and aminoethoxyvinylglycine on ethylene production by ectomycorrhizal fungi // *Can J Bot.* 1989. 67: 483-485.
 835. Russow R., Veste M., Böhme F. A natural ¹⁵N approach to determine the biological fixation of atmospheric nitrogen by biological soil crusts of the Negev Desert // *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005. 19: 3451-3456.
 836. Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D.J., Dowling D.N Bacterial endophytes: recent developments and applications // *FEMS Microbiol Lett.* 2008. 278: 1-9.
 837. Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Kloepper J.W. et al. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis* // *Plant Physiol* 2004. 134: 1017–1026.
 838. Ryu R.J., Patten C.L. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5 // *J Bacteriol.* 2008. 190: 7200–7208.
 839. Sachdev S., Singh R.P. *Trichoderma*: a multifaceted fungus for sustainable agriculture. In: Baudahh K., Kumar S., Singh R.P., Korstad J. (eds) / Ecological and practical applications for sustainable agriculture: Springer. 2020, pp. 261–292.
 840. Saharan B.S., Nehra V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review // *Life Sci Med Res* 2011. LSMR-21.
 841. Sakakibara H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation // *Annu Rev Plant Biol.* 2006. 57: 431–449.
 842. Salazar-Cerezo S., Martínez-Montiela N., García-Sánchez J., Pérez-y-Terrón R., R.D. Martínez-Contrerasa. Gibberellin biosynthesis and metabolism: a convergent route for plants, fungi and bacteria // *Microbiol Res.* 2018. 208: 85-98.
 843. Salt S., Tuzun S., Kuo J. Effects of β -ionone and abscisic acid on the growth of tobacco and resistance to blue mold: mimicry of effects of stem infection by *Peronospora tabacina* // *Adam Physiol Mol Plant Biol.* 1986. 28: 287-297.
 844. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. cold spring harbor laboratory. NY. 1989.
 845. Samuels G.J. *Trichoderma* – a review of biology and systematics of the genus // *Mycol Res.* 1996. 100: 923-935.
 846. Sandrasagaran U., Subramaniam S., Murugaiyah V. New perspective of *Dendrobium crumenatum* orchid for antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria // *Pakistan J Bot.* 2014. 46 (2): 719-724.
 847. Sanford W.W., Adanlawo I. Velamen and exodermis characters of West African epiphytic orchids in relation to taxonomic grouping and habitat tolerance // *Bot J Linn Soc.* 1973. 66 (4): 307-321.
 848. Saravanakumar K., Fan L.L., Fu K.H., Yu C.J., Wang M., Xia H., Sun J.A., Li Y.Q., Chen J. Cellulase from *Trichoderma harzianum* interacts with roots and triggers induced systemic resistance to foliar disease in maize // *Sci Rep.* 2016. 6:35543.
 849. Sattayasai N., Sudmoon R., Nuchadomrong S., Chaveerach A., Kuehnle A.R., et al. *Denidrobium findleyanum* agglutinin: production, localization, anti-fungal activity and gene characterization // *Plant Cell Rep.* 2009. 28: 1243–1252.
 850. Saul-Tcherkas V., Steinberger Y. Soil microbial diversity in the vicinity of a Negev Desert shrub-Reaumuria negevensis // *Microb Ecol.* 2011. 61 (1): 64-81.
 851. Sawmya K., Vasudevan T.G., Murali T.S. Fungal endophytes from two orchid species pointer towards organ specificity // *Czech Mycol.* 2013. 65: 89–101.
 852. Schirmböck M., Lorito M., Wang Y.L., Hayes C.K., ArisanAtac I., Scala F., Harman G.E., Kubicek C.P. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma*

- harzianum against phytopathogenic fungi. Appl Environ Microbiol. 1994. 60 (12): 4364–4370.
853. Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation // Microbiol Mol Biol Rev. 1997. 61 (2): 262-280.
 854. Schlaeppi K., Bulgarelli D. The plant microbiome at work // Mol Plant Microbe Interact. 2015. 28 (3): 212–217.
 855. Schmülling T., Werner T., Riefler M. et al. Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species // J Plant Res. 2003. 116: 241–252.
 856. Sciuto S., Chillemi R., Piattelli M., Puglisi G. Gibberellin- and cytokinin-like activities in marine algae from central Mediterranean // Boll Soc Ital Biol Sper. 1981. 57 (15): 1590-1595.
 857. Schöning B., Brown D.W., Oeser B., Tudzynski B. Cross-species hybridization with *Fusarium verticillioides* microarrays reveals new insights in *Fusarium fujikuroi* nitrogen regulation and the role of AreA and NMR // Eukaryotic Cell. 2008. 7: 1831–1846.
 858. Schüßler A., Kluge M. *Geosiphon pyriforme*, an endocytosymbiosis between fungus and cyanobacteria, and its meaning as a model system for arbuscular mycorrhizal research. In: Hock B. (ed.) / Fungal associations. The Mycota (a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research). Berlin, Heidelberg: Springer. 2001, vol 9, pp. 151-169.
 859. Sessitsch A., Reiter B., Berg G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities // Can J Microbiol. 2004. 50: 239-249.
 860. Sekine M., Weltanabe K., Soyono K. Nucleotide sequence of a gene for indole-3-acetamide hydrolase from *Bradyrhizobium japonicum* // Nucleic Acids. 1989. 17: 6400.
 861. Selig M. J., Knoshaug E. P., Adney W. S., Himmel M. E., Decker S. R. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities // Bioresource technology. 2008. 99 (11): 4997-5005.
 862. Selosse M.A., Martos F., Perry B., Maj P., Roy M, Pailler T. Saprotrophic fungal symbionts in tropical achlorophyllous orchids // Plant Signal Behavior. 2010. 5 (4): 349-353.
 863. Selosse M-A, Weiss M, Jean-Luc J., Tillier A. Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae // Mol Ecol. 2002. 11: 1831-1844.
 864. Semenov A.M., Van Brugen A.H.C., Zelenev V.V. Moving waves of bacterial populations and total organic carbon along roots of wheat // Microb Ecol. 1999. 37: 116-128.
 865. Sergeeva E., Liaimer A., Bergman B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria // Planta. 2002. 215: 229-238.
 866. Sezik E. Turkish orchids and salep // Acta Pharma Turcica. 2002. 44: 151–157.
 867. Shahab S., Ahmed N., Khan N.S. Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs // Afr J Ag Agr Res. 2009. 4: 1312-1316.
 868. Sharma M., Schmid M., Rothballer M. et al. Detection and identification of bacteria intimately associated with fungi of the order *Sebacinales* // Cell Microbiol. 2008. 10 (11): 2235-2246.
 869. Shaul O., Elad Y., Zieslin N. Suppression of *Botrytis* blight in cut rose flowers with gibberellic acid. Effects of exogenous application of abscisic acid and paclobutrazol // Postharvest biol Technol. 1996. 7: 145-150.
 870. Shekhovtsova N.V., Marakaev O.A., Pervushina K.A., Osipov G.A. The underground organ microbial complexes of moorland spotted orchid *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (*Orchidaceae*) // Adv Bioscie Biotechnol. 2013. 4: 35-42.
 871. Shepherd R., Rockey J., Sutherland I.W., Roller S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods // J Biotechnol. 1995. 40: 207-217.

872. Shimada A., Takeuchi S., Nakajima A., Tanaka S., Kawano T., Kimura Y. Phytotoxicity of indole-3-acetic acid produced by the fungus, *Pythium aphanidermatum* // Biosci Biotechnol Biochem. 2000. 64 (1): 187-189.
873. Shimura H., Matsuura M., Takada N., Koda Y. An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Orchidaceae) // Phytochem. 2007. 68: 1442-1447.
874. Shin M., Shinguu T., Sano K., Umezawa C. Metabolic fates of L-tryptophan in *Saccharomyces uvarum* // Chem Pharm Bull. 1991. 39: 1792-1795.
875. Shushan S., Withner CL. Developmental anatomy of an orchid, *Cattleya*×*Trimos*, The orchids: a scientific survey, New York, Wiley. 1959, pp. 45-72.
876. Shokri D., Emtiazi G. Indole-3-acetic acid (IAA) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogen fixing bacteria and its optimization by Taguchi design // Curr Microbiol. 2010. 61: 217-225.
877. Shores M., Yedidia I., Chet I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203 // Phytopathol. 2005. 95. 76-84.
878. Sieber J.R., McInerney M.J., Plugge C.M., Schink B., Gunsalus R.P. K. Degradation of long-chain fatty acids by sulfate-reducing and methanogenic communities. In: Timmis K.N. (ed.) / Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Berlin: Springer. 2010, pp. 338-350.
879. Siddique S., Radakovic Z.S., De La Torre C.M., Chronis D., Novák, O. et al. A parasitic nematode releases cytokinin that controls cell division and orchestrates feeding site formation in host plants. Proc Nat Acad Sci USA. 2015. 112: 12 669-12 674.
880. Siemens J., Keller I., Sarx J., Kunz S., Schuller A. et al. Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots indicates a key role for cytokinins in disease development // Mol Plant Microbe Interact. 2006. 19: 480-494.
881. Silveira-Schrank I., Drozdowicz A. The behaviour of *Azospirillum* spp. in the presence of plant growth hormones // Ann Rev Microbiol. 1983. 134A (3): 411-414.
882. Singh A., Duggal S. Medicinal orchids: An overview // Ethnobot Leaflets. 2009. 13: 351-363.
883. Singh A., Singh K. Effect of surfactants on lignin modifying enzyme activity of *Ganoderma* species KX879638 and *Lentinus* species KY006984 under solid state fermentation // Afr J Microbiol Res. 2017. 11 (41): 1520-1527.
884. Sipiczki M., Selim S.A. Antagonistic yeasts from a salt-lake region in Egypt: identification of a taxonomically distinct group of phylloplane strains related to *Sporisorium* // Antonie van Leeuwenhoek. 2019. 112 (4): 523-541.
885. Slot J.C., Rokas A. Horizontal transfer of a large and highly toxic secondary metabolic gene cluster between fungi // Current Biol. 2011. 21: 134-139.
886. Smith S.E. Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition // New Phytol. 1966. 65 (4): 488-499.
887. Smith D.C., Douglas A.E. The biology of symbiosis. London: Edward Arnold. 1987, 240 p.
888. Smith S., Read D. Mycorrhizal symbiosis. 3d edition London: Academic press. 2008. 800 p.
889. Smith W.H. Forest occurrence of *Trichoderma* species – emphasis on potential organochlorine (xenobiotic) degradation // Ecotoxicol Environ Safety. 1995. 32 (2): 179-183.
890. Smresiu E.A., Currah R.S. Symbiotic germination of seed of terrestrial orchids of North America and Europe // Lindleyana. 1989. 1: 6-15.
891. Soares J.S., Rosa Y.B.C.J., Suzuki R.M., Scalón S.P.Q., Rosa Junior E.J. Cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile* com uso de água de coco no meio de cultura // Horticultura Brasileira. 2013. 31: 63-67.

892. Somers E., Vanderleyden J., Srinivasan M. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet // *Crit Rev Microbiol.* 2004. 30: 205–240.
893. Sommer J., Pausch J., Brundrett MC., Dixon KW., Bidartondo MI., Gebauer G. Limited carbon and mineral nutrient gain from mycorrhizal fungi by adult Australian orchids // *Amer J Bot.* 2012. 99: 1133–1145.
894. Song J.I., Kang Y.J., Yong H.Y., Kim Y.C., Moon A. Denbinobin, a phenanthrene from *Dendrobium nobile*, inhibits invasion and induces apoptosis in SNU-484 human gastric cancer cells // *Oncol Rep.* 2012. 27 (3): 813–818.
895. Soussi A., Ferjani R., Marasco R. Plant-associated microbiomes in arid lands: diversity, ecology and biotechnological potential // *Plant and Soil.* 2016. 405 (1–2): 357–370.
896. Spaepen S., Vanderleyden J. Auxin and plant-microbe interactions // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011. 3 (4).
897. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews.* 2007. 31 (4): 425–448.
898. Spaepen S. Plant hormones produced by microbes. In: Lugtenberg B. (ed.) / *Principles of plant-microbe interactions.* NY: Dordrecht; London: Springer Int. Publishing. 2015, pp. 247–256.
899. Spallek T., Gan P., Kadota Y., Shirasu K. Same tune, different song — cytokinins as virulence factors in plant–pathogen interactions? // *Curr Opin Plant Biol.* 2018. 44: 82–87.
900. Speranskaya A.S., Khafizov K., Ayginin A.A., Krinitsina A.A., Omelchenko D.O. et al. Comparative analysis of Illumina and Ion Torrent high-throughput sequencing platforms for identification of plant components in herbal teas // *Food Control.* 2018. 93: 315–324.
901. Spiller H., Stallings W. Jr., Woods T. Gunasekaran M. Requirement for direct association of ammonia-excreting *Anabaena variabilis* mutant (SA-1) with roots for maximal growth and yield of wheat // *Appl Microbiol Biotechnol.* 1993. 40: 557–66.
902. Sponsel V.M., Hedden P. Gibberellin biosynthesis and inactivation. In: Davies P.J. (ed.) / *Plant hormones. Biosynthesis, signal transduction, action.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2004, pp. 63–94.
903. Sponsel V.M., Hedden P. Gibberellin Biosynthesis and Inactivation. In: Davies P.J. (eds.) / *Plant hormones.* Dordrecht: Springer. 2010.
904. Stams A.J.M. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments // *Antonie van Leeuwenhoek.* 1994. 66 (1–3): 271–294.
905. Stępień L., Waśkiewicz A., Wilman K. Host extract modulates metabolism and fumonisin biosynthesis by the plant-pathogenic fungus *Fusarium proliferatum* // *Int J Food Microbiol.* 2015. 193: 74–81.
906. Stern W.L., Aldrich H.C., McDowell L.M., Morris M.W., Pridgeon A.M. Amyloplasts from cortical root cells of *Spirantheidae* (Orchidaceae) // *Protoplasma.* 1993. 172:49–55.
907. Stewart W.D.P., Rowell P., Ray A.N. Cyanobacteria-eukaryotic plant symbiosis // *Ann de Microbiol.* 1983. 134B: 205–228.
908. Stirk W.A., Novak O., Strnad M., van Staden J. Cytokinins in Macroalgae // *Plant Growth Regul.* 2003. 41: 13–24.
909. Stirk W.A., Ördög V., Novák O., Rolčik J., Strnad M., Bálint P., van Staden J. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains // *J Phycol.* 2013a. 49: 459–467.
910. Stirk W.A., Bálint P., Tarkowská D., Novák O., Strnad M. et al. Hormone profiles in microalgae: gibberellins and brassinosteroids. *Plant Physiol Biochem* 2013b. 70: 348–353.
911. Stoessl A., Arditti J. Orchid phytoalexins. In: Arditti J. (ed.) / *Orchid biology: reviews and perspectives.* NY: Cornell University Press. 1984, pp. 151–175.
912. Sturz A.V., Christie B.R., Nowak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production // *CRC Crit Rev Plant Sci.* 2000. 19: 1–30.
913. Sukphan P., Sritularak B., Mekboonsonglarp W., Lipipun V., Likhitwitayawuid K. Chemical constituents of *Dendrobium venustum* and their antimalarial and anti-herpetic properties // *Nat Prod Commun.* 2014. 9 (6): 825–827.

914. Summers J.E., Voeseinek L.A.C.J., Blom C.W.P.M., Lewis M.J., Jackson M.B. *Potamogeton pectinatus* is constitutively incapable of synthesizing ethylene and lacks 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase // *Plant Physiol.* 1996. 111 (3): 901-908.
915. Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review // *Bioresource technology.* 2002. 83 (1): 1-11.
916. Sun P.-F., Fang W.-T., Shin L.-Y., Wei J.-Y., Fu S.-F., Chou J.-Y. Indole-3-acetic acid-producing yeasts in the phyllosphere of the carnivorous plant *Drosera indica* L. // *PLoS ONE.* 2014. 9 (12): e114196.
917. Sundin G.W., Jacobs J.L. Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaeae* L.) // *Microb Ecol.* 1999. 38: 27–38.
918. Sutherland I.W. Biofilms – formation, structure and interactions // *Abstr. of Euresco conf. Bacterial neural networks (intracellular signaling).* Obernai, France. 2002, 61.
919. Suzuki S., He Y., Oyaizu H. Indole-3-acetic acid production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch // *Curr Microbiol.* 2003. 47 (2): 138-143.
920. Svircev Z., Tamas I., Nenin P., Drobac A. Co-cultivation of N₂-fixing cyanobacteria and some agriculturally important plants in liquid and sand cultures // *Appl Soil Ecol.* 1997. 6: 301–308.
921. Swarts N.D., Dixon K.W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction // *Annals of Botany.* 2009a. 104: 543–556.
922. Swarts N.D., Dixon K.W. Perspectives on orchid conservation in botanic gardens // *Trends in Plant Science.* 2009b. 14: 590–598.
923. Szlachetko D.L. Genera et species *Orchidarium*. 1. Polish Bot J. 2009. 46:11-26.
924. Traiwan J., Park M.H., Kim W. *Serinicoccus chungangensis* sp. nov., isolated from tidal flat sediment, and emended description of the genus *Serinicoccus* // *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011. 61 (6): 1299-1303.
925. Takei K., Ueda N., Aoki K., Kuromori T., Hirayama T. et al.. *AtIPT3* is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis* // *Plant Cell Physiol.* 2004. 45: 1053–62.
926. Tamaru Y., Takani Y., Yoshida T., Sakamoto T. Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* // *Appl Environ Microbiol.* 2005. 71: 7327-7333.
927. Tan X.M., Wang C.L., Chen X.M. et al. In vitro seed germination and seedling growth of an endangered epiphytic orchid, *Dendrobium officinale*, endemic to China using mycorrhizal fungi (*Tulasnella* sp.) // *Scientia Horticulturae.* 2014. 165: 62–68.
928. Tanaka M., Kumara M., Goi M. Optimal conditions for shoot production from *Phalaenopsis* flower stalk cuttings cultured *in vitro* // *Sci Hortic.* 1988. 35: 117-126.
929. Taylor D.L., Bruns T.D., Leake J.R., Read D.J. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: Van der Heijden S.I. (ed.)/ *Mycorrhizal ecology.* Berlin: Springer-Verlag. 2002, pp. 375–413.
930. Teichert S., Wottawa M., Schöning B., Tudzynski B. Role of the *Fusarium fujikuroi* TOR kinase in nitrogen regulation and secondary metabolism // *Eukaryotic Cell.* 2006. 5: 1807–1819.
931. Teichert S., Schöning B., Richter S., B. Tudzynski. Deletion of the *Gibberella fujikuroi* glutamine synthetase gene has significant impact on transcriptional control of primary and secondary metabolism // *Mol Microbiol.* 2004. 53 (6): 1661-1675.
932. Teichert S., Rutherford J.C., Wottawa M., Heitman J., Tudzynski B. The impact of the ammonium permeases MepA, MepB and MepC on nitrogenregulated secondary metabolism in *Fusarium fujikuroi* // *Eukaryotic Cell.* 2008. 7: 187–201.
933. Teixeira da Silva J.A. Orchids: Advances in tissue culture, genetics, phytochemistry and transgenic biotechnology // *Floricult Ornament Biotech.* 2013. 7: 1-52.

934. Teixeira da Silva J.A., **Tsavkelova E.A.**, Zeng S., Ng T.B., Parthibhan S. et al. Symbiotic in vitro seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. *Planta*. 2015a. 242 (1): 1-22.
935. Teixeira da Silva J.A., **Tsavkelova E.A.**, Ng T.B., Parthibhan S., Dobránszki J. et al. Asymbiotic in vitro seed propagation of *Dendrobium* // *Plant Cell Reports*. 2015b. 34: 1685-1706.
936. Tempesta S., Rubini A., Franco P., Rambelli A. Pestalotiopsis Endophytes from leaves of two orchid species collected in Costa Rica // *Cryptogam Mycol*. 2011: 32 (3): 315-321.
937. Thakur M., Vyas K. Production of plant growth regulators by some *Fusarium* species // *Folia Microbiol*. 1983. 28: 124-129.
938. Theunis M., Kobayashi H., Broughton W.J., Prinsen E. Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234 // *Mol Plant Microbe Interact*. 2004. 17: 1153–1161.
939. Thomas A.D., Hoon S.R., Linton P.E. Carbon dioxide fluxes from cyanobacteria crusted soils in the Kalahari // *Appl Soil Ecol*. 2008. 39: 254-263.
940. Thomas S.G., Phillips A.L., Hedden P. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation // *Proc Nat Acad Sci USA*. 1999. 96: 4698–4703.
941. Thompson I.P., Bailey M.J., Fenlon J.S., Fermor T.R., Lilley A.K. et al. Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*) // *Plant Soil*. 1993. 150: 177–191.
942. Tien T., Gaskina M., Hubbell D. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.) // *Appl Envir Microb*. 1979. 37 (5): 1016-1024.
943. Timmusk S., Wagner G.H. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses // *Mol Plant Microbe Interact*. 1999. 12: 951–959.
944. Toledo G., Bashan Y., Soeldner A. Cyanobacteria and black mangroves in Northwestern Mexico: colonization, and diurnal and seasonal nitrogen fixation on aerial roots // *Can J Microbiol*. // 1995. 41: 999-1011.
945. Tsang J., Hoover T.R. Themes and variations regulation of RpoN-dependent flagellar genes across diverse bacterial species // *Scientifica*. 2014: 681754.
946. **Tsavkelova E.A.** Bacteria associated with orchid roots. In: Maheshwari D.K (ed.) / *Bacteria in agrobiolgy: plant growth responses*. Springer. 2011, pp. 221-259.
947. **Tsavkelova E.** The biosynthesis of gibberellic acids by the transformants of orchid-associated *Fusarium oxysporum* // *Mycological Progress*. 2016. 15 (2): 1-8.
948. **Tsavkelova E.A.**, Bömke C., Netrusov A.I., Weiner J., Tudzynski B. Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain // *Fung Genet Biol*. 2008. 45 139-1403.
949. **Tsavkelova E.A.**, Cherdyntseva T.A., Botina S.G., Netrusov A.I. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin // *Microbiol Res*. 2007a. 162: 69-76.
950. **Tsavkelova E.A.**, Cherdyntseva T.A., Klimova S. Yu., Shestakov A.I., Botina S.G., Netrusov A.I. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin // *Arch Microbiol*. 2007b. 188 (6): 655-664.
951. **Tsavkelova E.A.**, Egorova M.A., Leontieva M.R., Malakho S.G., Kolomeitseva G.L., Netrusov A.I. *Dendrobium nobile* Lindl. seed germination in co-cultures with diverse associated bacteria // *Plant Growth Reg*. 2016. 80 (1): 79-91.
952. **Tsavkelova E.**, Oeser B., Oren-Young L., Israeli M., Sasson Y., Tudzynski B., Sharon A. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species// *Fungal Gen Biol*. 2012. 49 (1): 48-57.

953. **Tsavkelova E.**, Prokudina L., Egorova M., Leontieva M., Malakhova D., Netrusov A. The structure of the anaerobic thermophilic microbial community for the bioconversion of the cellulose-containing substrates into biogas // *Proc Biochem.* 2018. 66 (1): 183-196.
954. Tsukada K., Takahashi K., Nabeta K. Biosynthesis of jasmonic acid in a plant pathogenic fungus, *Lasiodiplodia theobromae* // *Phytochem.* 2010. 71: 2019–2023.
955. Tudzynski B. Fungal phytohormones in pathogenic and mutualistic associations. In: Carroll G.C., Tudzynski P. (eds.) / *The mycota V.* Berlin Heidelberg New York: Springer. 1997, pp. 167–184.
956. Tudzynski B. *Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology* // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005. 66: 597–611.
957. Tudzynski B. *Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi* // *Front Microbiol.* 2014. 5: 1-15.
958. Tudzynski B., Höltter K. The gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster // *Fung Genet Biol.* 1998. 25: 157-170.
959. Tudzynski B., Sharon A. Biosynthesis, biological role and application of fungal hormones. In: Osiewacz H.D. (ed.) / *The mycota X Industrial applications.* Berlin Heidelberg New York: Springer. 2002, pp. 183–211.
960. Tudzynski B., Hedden P., Carrera E., Gaskin P. The P450–4 gene of *Gibberella fujikuroi* encodes ent-kaurene oxidase in the gibberellin biosynthetic pathway // *Appl Environ Microbiol.* 2001. 67: 3514–3522.
961. Tudzynski B., Homann V., Feng B., Marzluf G. Isolation, characterization and disruption of the *areA* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi* // *Mol Gen Genet.* 1999. 261: 106–114.
962. Tudzynski B., Mihlan M., Rojas M.C., Linnemannstöns P., Gaskin P., Hedden P. Characterization of the final two genes of the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi*: *des* and P450–3 encode GA₄ desaturase and the 13-hydroxylase respectively // *J Biol Chem.* 2003. 278: 28635–28643.
963. Tudzynski B., Rojas M.C., Gaskin P., Hedden P. 2002. The gibberellin 20-oxidase of *Gibberella fujikuroi* is a multifunctional monooxygenase // *J Biol Chem.* 2002. 277: 21246–21253.
964. Tudzynski P., Tudzynski B. Genetics of phytopathogenic fungi. In: Behnke H.D., Lüttge U., Esser K., Kadereit J.W., Runge M. (eds.) / *Progress in Botany / Fortschritte der Botanik.* Berlin, Heidelberg: Springer. 1996, 57, pp. 232-252.
965. Tully R.E., Keister D.L. Cloning and mutagenesis of a cytochrome *P-450* locus from *Bradyrhizobium japonicum* that is expressed anaerobically and symbiotically // *Appl Environ Microbiol.* 1993. 59: 4136–4142.
966. Tully R., van Berkum P., Lovins K., Keister D. 1998. Identification and sequencing of a cytochrome P450 gene cluster from *Bradyrhizobium japonicum* // *Biochim Biophys Acta.* 1998. 1398: 243–255.
967. Turnbull G. A., Morgan J.A.W., Whipps J.M., Saunders J.R. The role of motility in the *in vitro* attachment of *Pseudomonas putida* PaW8 to wheat roots // *FEMS Microbiol Ecol.* 2001. 35: 57-65.
968. Turner T.R., James E.K., Poole P.S. The plant microbiome. *Genome Biol.* 2013. : 14: 209.
969. Tzeng D.D., DeVay J.E. Ethylene production and toxigenicity of methionine and its derivatives with riboflavin in cultures of *Verticillium*, *Fusarium*, and *Collectotrichum* species exposed to light // *Physiol Plant.* 1984. 62: 545–552.
970. Uhlig H. *Industrial enzymes and their applications.* New York: John Wiley & Sons, Inc. 1998, pp. 435.
971. Uhlig D.J., White D.C. Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica* // *Appl Environ Microbiol.* 1983. 45: 64-70.

972. Upadhyaya N., Letham D., Parker C., Hocart C., Dart P. Do rhizobia produce cytokinins? // *Biochem Int.* 1991. 24 (1): 123-30.
973. Upreti K., Murti G. Effects of brassinosteroids on growth, nodulation, phytohormone content and nitrogenase Activity in french bean under water stress // *Biologia Plantarum.* 2004. 48: 407–411.
974. Urbanova T., Tarkowska D., Novak O., Hedden P., Strnad M. Analysis of gibberellins as free acids by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Talanta.* 2013. 112: 85-94.
975. Urrutia O., Hedden P., Rojas M.C. Monooxygenases involved in GA12 and GA14 synthesis in *Gibberella fujikuroi* // *Phytochem.* 2001. 56: 505–511.
976. Uroz S., Courty P.E., Oger P. Plant symbionts are engineers of the plant-associated microbiome // *Trends Plant Sci.* 2019. 24: 905–916.
977. Usuki F., Narisawa K. A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*, and a nonmycorrhizal plant, Chinese cabbage // *Mycologia.* 2007. 99 (2): 175-184.
978. Valadares R.B., Perotto S., Santos E.C., Lambais M.R. Proteome changes in *Oncidium sphacelatum* (Orchidaceae) at different trophic stages of symbiotic germination // *Mycorrhiza.* 2014. 24 (5): 349-360.
979. Valadares R.B.D.S., Otero J.T., Pereira M.C., Cardoso E.J.B.N. The epiphytic orchids *Ionopsis utricularioides* and *Psychmorchis pusilla* associate with different *Ceratobasidium* lineages at Valle del Cauca, Colombia // *Acta Bot Bras.* 2015. 29: 40–44.
980. Valls M., Genin S., Boucher C. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum* // *PLOS.* 2006. 2: 798–807.
981. van Bruggen A.H., Semenov A.M., Zelenev V.V., Semenov A.V., Raaijmakers J.M. et al. Wave-like distribution patterns of gfp-marked *Pseudomonas fluorescens* along roots of wheat plants grown in two soils // *Microb Ecol.* 2008. 55: 466–475.
982. van de Broek A., Gysegom P., Ona O. et al Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-acting sequence involved in auxin responsive expression // *Mol Plant Microbe Interact.* 2005. 18: 311–323.
983. van Liere L., Walsby A.E. Interactions of cyanobacteria with light. In: Carr NG and Whitton BA (eds.) / *The biology of cyanobacteria.* Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1982, pp. 9–45.
984. Vasilenko O.V., Starodumova I.P., Tarlachkov S.V., Dorofeeva L.V., Avtukh A.N., Evtushenko L. I. Draft genome sequence of “*Rathayibacter tanacetii*” strain VKM Ac-2596 isolated from *Tanacetum vulgare* infested by a foliar nematode // *Genome Announc.* 2016. 4 (3): e00512-16.
985. Vendrame W.A., Vendrame V.S., Carvalho J.M.M., Dias I. Maguire . Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen // *Hort Science.* 2008. 43: 264-267.
986. Verkley G.J.M., Zijlstra J.D., Summerbell R.C., Berendse F. Phylogeny and taxonomy of root-inhabiting *Cryptosporiopsis* species, and *C. rhizophila* sp. nov., a fungus inhabiting roots of several Ericaceae // *Mycol Res.* 2003. 107: 689–698.
987. Verma M., Mishra J., Arora N.K. Plant growth-promoting rhizobacteria: Diversity and Applications. In: Sobti R., Arora N., Kothari R. (eds.) / *Environmental biotechnology: for sustainable future.* Singapore: Springer. 2019.
988. Verma P., Yadav A.N., Kazy S.K., Saxena A.K., Suman A. Evaluating the diversity and phylogeny of plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum*) growing in central zone of India // *Int J Curr Microbiol. Appl Scie.* 2014. 3 (5): 432-447.
989. Videira S.S., Araujo J.L.S.D., Rodrigues L.D.S., Baldani V.L.D., Baldani J.I. Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil // *FEMS Microbiol Lett.* 2009. 293 (1): 11–19.
990. Visca P., Ciervo A., Sanfilippo V., Orsi N. Iron-regulated salicylate synthesis by *Pseudomonas* spp. // *J Gen Microbiol.* 1993. 139: 1995-2001.

991. Viswanathan R., Samiyappan R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria against red rot disease in sugarcane // Sugar Tech. 1999. (1): 67-76.
992. Vivas A., Barea J.M., Azcón R. *Brevibacillus brevis* isolated from cadmium- or zinc-contaminated soils improves *in vitro* spore germination and growth of *Glomus mosseae* under high Cd or Zn concentrations // Microbial Ecol. 2005. 49 (3): 416–424.
993. von Bargen S., Martinez O., Schadock I., Eisold A., Gossmann M., Büttner C. Genetic variability of phytopathogenic *Fusarium proliferatum* associated with crown rot in *Asparagus officinalis* / J Phytopathol. 2009. 157: 446-456.
994. Vu T., Hauschild R., Sikora R.A. *Fusarium oxysporum* endophytes induced systemic resistance against *Radopholus similis* on banana // Nematol. 2006. 8: 847–852.
995. Vujanovic V., St-Arnaud M., Barabé D., Thibeault G. Viability testing of orchid seed and the promotion of coloration and germination // Ann Bot London. 2000. 86: 79–86.
996. Walker T.S., Bais H.P., Deziel E., Schweitzer H.P., Rahme L.G., Fall R., Vivanco J.M.. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formations, and root exudation // Plant Physiol. 2004. 134: 3210–3331.
997. Wang B., Brewer P.E., Shugart H.H., Lerdau M.T., Allison S.D. Soil aggregates as biogeochemical reactors and implications for soil–atmosphere exchange of greenhouse gases — a concept // Glob Change Biol. 2019. 25: 373– 385.
998. Wang H., Fang H., Wang Y., Duan L., Guo S. In situ seed baiting techniques in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and *Dendrobium nobile* Lindl.: the endangered Chinese endemic *Dendrobium* (Orchidaceae) // World J Microbiol Biotechnol. 2011. 27: 2051–2059.
999. Wang H.F., Zhang Y.G., Chen J.Y., Guo J.W., Li L. et al. *Frigoribacterium endophyticum* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the root of *Anabasis elatior* (CA Mey.) Schischk // Int J Sys Evol Microbiol. 2015. 65 (4): 1207-1212.
1000. Wang Q.-M., Yurkov A.M., Göker M., Lumbsch H.T., Leavitt S.D. et al. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within *Pucciniomycotina* // Stud Mycol. 2015. 81: 149–189.
1001. Waqas M., Khan A.L., Kamran M., Hamayun M., Kang S.M. et al. Endophytic fungi produce gibberellins and indole acetic acid and promotes host-plant growth during stress // Molecules. 2012. 17: 10754–10773.
1002. Warcup J.H. Specificity of mycorrhizal association in some australian terrestrial orchids // New Phytol. 1971. 70: 41-46.
1003. Ward E., Cahill D., Bhattacharyya M. Absciscic acid suppression of phenylalanine ammonia lyase activity and mRNA, and resistance of soybeans to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* // Plant Physiol. 1989. 91: 23-27.
1004. Waskiewicz A., Golinski P., Karolewski Z., Irzykowska L., Bocianowski J. et al. Formation of fumonisins and other secondary metabolites by *Fusarium oxysporum* and *F. proliferatum*: a comparative study // Food Addit Contam. 2010. 27 (5): 608–615.
1005. Waterman R.J., Bidartondo M.I. Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids // J Experim Bot. 2008. 59: 1085-1096.
1006. Watson A., Haywood D., Celia L. How diverse are coccoid cyanobacteria? A case study of terrestrial habitats from the Atlantic Rainforest (São Paulo, Brazil) // Phytotaxa. 2014, 178 (2): 61–97.
1007. Weingart H., Völksch B. Ethylene production by *Pseudomonas syringae* pathovars in vitro and in planta // Appl Environ Microbiol. 1997. 63 (1): 156–161.
1008. Weingart H., Völksch B., Ullrich M. Comparison of ethylene production by *Pseudomonas syringae* and *Ralstonia solanacearum* // Phytopathol. 1999. 89 (5): 360-365.
1009. Weiler E., Schröder J. Hormone genes and the crown gall disease // Trends Biochem Sci. 1987. 12: 271-275.
1010. Weiss D., Ori N. Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones // Plant Physiol. 2007. 144: 1240–1246.

1011. Went F.W.. Soziologie de epiphyten eines tropischen urwaldes // Annal Jard Botan Buitenzorg. 1940. 50: 1–98.
1012. Werther T., Spinka M., Tittmann K., Schütz A., Golbik R. et al. Amino acids allosterically regulate the thiamine diphosphate-dependent alpha-keto acid decarboxylase from *Mycobacterium tuberculosis* // J Biol Chem. 2008. 283: 5344–5354.
1013. West N.E., Skujins J. The nitrogen cycle in North American cold-winter semi-desert ecosystems // Oecol Plant. 1977. 12: 45–53.
1014. Weyers J.D.B., Paterson N.W. Plant hormones and the control of physiological processes // New Phytol. 2001. 152: 375–407.
1015. Wiemann P., Sieber C.M., von Barga K.W., Studt L., Niehaus E.M., et al. Deciphering the cryptic genome: genome-wide analyses of the rice pathogen *Fusarium fujikuroi* reveal complex regulation of secondary metabolism and novel metabolites // PLoS Pathol. 2013. 9 (6): e1003475.
1016. Wilkinson K.G., Dixon K.W., Sivasithampam K. Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of australian orchids // New Phytol. 1989. 112: 429–435.
1017. Wilkinson K., Dixon K., Sivasithampam K., Ghisalberti E. Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria // Plant Soi. 1994a. 159: 291–295.
1018. Wilkinson K., Sivasithampam K., Dixon K., Fahy P., Bradley J. Identification and characterization of bacteria associated with western Australian orchids // Soil Biol Biochem. 1994b. 26: 137–142.
1019. Wilson M., Hirano S., Lindow S.E. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf // Appl Environ Microbiol. 1999. 65: 1435–1443.
1020. Woodward A.W., Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction // Ann Bot (Lond). 2005. 95: 707–735.
1021. Wu B., He S., Pan Y.J. New dihydrodibenzoxepins from *Bulbophyllum kwangtungense* // Planta Medica. 2006. 72: 1244–1247.
1022. Wu J., Qian J., Zheng S. A preliminary study on ingredient of secretion from fungi of orchid mycorrhiza // Ying Yong Sheng Tai Xue Bao. 2002. 13 (7): 845–848.
1023. Yamada T. The role of auxins in plant disease development // Ann Rev Phytopathol. 1993. 31: 253–273.
1024. Xin G., Glawe D., Doty S.L. Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid-producing yeasts occurring in *Populus* trees // Mycol Res. 2009. 113: 973–980.
1025. Yamaguchi S. Gibberellin metabolism and its regulation // Annu Rev Plant Biol. 2008. 59: 225–251.
1026. Yamamoto H., Oritani T. Incorporation of farnesyl pyrophosphate derivatives into abscisic acid and its biosynthetic intermediates in *Cercospora cruenta* // Biosci Biotech Biochem. 1997. 61: 821–824.
1027. Yamamoto H., Inomata M., Tsuchiya S., Nakamura M., Oritani T. Metabolism of chiral ionylideneacetic acids on the abscisic acid biosynthetic pathway in *Cercospora* // Biosci Biotechnol Biochem. 2000. 64 (12): 2644–2650.
1028. Yanagishima N., Shimoda C., Kamisaka S., Takahashi T. Auxin-induced heritable variants in yeast with special reference to physiological and genetic characters // Plant Cell Physiol. 1968. 9 (2): 323–331.
1029. Yadav A.N. Agriculturally important microbiomes: biodiversity and multifarious pgp attributes for amelioration of diverse abiotic stresses in crops for sustainable agriculture // Biomed J Sci Tech Res. 2017. 1: 1–4.
1030. Yadav A.N., Sachan S.G., Verma P., Saxena A.K. Prospecting cold deserts of north western Himalayas for microbial diversity and plant growth promoting attributes // J Bioscie Bioeng. 2015. 119 (6): 683–693.

1031. Yang G., Li C. General description of *Rhizoctonia* species complex. In: Cumagun C.J. (ed.) / Plant pathology. 2012, pp. 41–52.
1032. Yang J., Kloepper J.W., Ryu C.-M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress // Trends Plant Sci. 2009. 14: 1-4.
1033. Yang J., Giné-Bordonaba J., Vilanova L., Teixidó N., Usall J. An insight on the ethylene biosynthetic pathway of two major fruit postharvest pathogens with different host specificity: *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum* // Eur J Plant Pathology. 2017. 149: 575–585.
1034. Yang Y.L., Liu Z.-Y., Zhu G.-S. Study on symbiotic seed germination of *Pleione bulbocodioides* (Franch) Rolfe // Microbiol. 2008. 35: 909–912.
1035. Yang S., Zhang X., Cao Z., Zhao K., Wang S. et al. Growth-promoting *Sphingomonas paucimobilis* ZJSH 1 associated with *Dendrobium officinale* through phytohormone production and nitrogen fixation // Microbial biotechnol. 2014. 7 (6): 611-620.
1036. Yasmin S., Rahman B., Malik K.A., Hafeez F.Y. Isolation, characterization and beneficial effects of rice associated plant growth promoting bacteria from Zanzibar soils // J Basic Microbiol. 2004. 44: 241-252.
1037. Yin C., Park J.J., Gang D.R., Hulbert S.H. Characterization of a tryptophan 2-monooxygenase gene from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* involved in auxin biosynthesis and rust pathogenicity // Mol Plant Microbe Interact. 2014. 27: 227-235.
1038. Yoon J.H., Lee H.B., Yeo S.H., Choi J.E. *Janibacter melonis* sp. nov., isolated from abnormally spoiled oriental melon in Korea // Int J Sys Evol Microbiol. 2004. 54 (6): 1975-1980.
1039. You Y.H., Yoon H., Kang S.-M., Woo J.-R., Choo Y.-S. et al. *Cadophora malorum* Cs-8-1 as a new fungal strain producing gibberellins isolated from *Calystegia soldanella* // J Basic Microbiol. 2013. 53: 630–634.
1040. You Y.H., Kwak T.W., Kang S.-M., Lee M.-C., Kim J.-G. *Aspergillus clavatus* Y2H0002 as a new endophytic fungal strain producing gibberellins isolated from *Nymphoides peltata* in fresh water // Mycobiol. 2015. 43 (1): 87–91.
1041. Yu J, Zhou X.F., Yang S.J., Liu W.H., Hu X.F. Design and application of specific 16S rDNA-targeted primers for assessing endophytic diversity in *Dendrobium officinale* using nested PCR-DGGE // Appl Microbiol Biotechnol. 2013. 97 (22): 9825-9836.
1042. Yuan Z.L., Chen Y.C., Yang Y. Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization // World J Microbiol Biotechnol. 2009. 25: 295–303.
1043. Yuan Z., Druzhinina I., Labbé J., Redman R. et al. Specialized microbiome of a halophyte and its role in helping non-host plants to withstand salinity // Sci Rep. 2016. 6: 32467.
1044. Yurekli F., Geckil H., Topcuoglu F. The synthesis of indole-3-acetic acid by the industrially important white-rot fungus *Lentinus sajor-caju* under different culture conditions // Mycol Res. 2003. 107 (3): 305-309.
1045. Zamost B.L., McClary D.O. The effects of plant growth regulators on cellulase production by *Trichoderma reesei* // Biotechnol Lett. 1983. 5: 179–184.
1046. Zeevaart J.A.D. Absciscic acid metabolism and its regulation. In: Hooykaas P.J.J., Hall M.A., Libbenga K.R (eds.) / Biochemistry and molecular biology of plant hormones. Elsevier, Science. 1999, pp. 189-207.
1047. Zeilinger S., Omann M. *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism // Gene Regul Syst Biol. 2007. 1: 227–234.
1048. Zeller K.A., Summerell B.A., Leslie J.F. *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp.nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberella fujikuroi* species complex. 2003. Mycologia. 95: 943–954.
1049. Zelmer C.D., Currah R.S. Evidence for a fungal liaison between *Corallorhiza trifida* (Orchidaceae) and *Pinus contorta* (Pinaceae) // Can J Bot. 1995. 73: 862-866.

1050. Zettler L.W., McInnis J.T.H. Propagation of *Platanthera integrilabia* (Correll) Luer, an endangered terrestrial orchid, through symbiotic seed germination // *Lindleyana*. 1992.. 7: 154-161.
1051. Zhang Q., Zhang W., 2016. Regulation of developmental and environmental signaling by interaction between microtubules and membranes in plant cells // *Protein Cell*. 7: 81–88.
1052. Zhang L., Chen J., Lv Y., Gao C., Guo S. *Mycena* sp., a mycorrhizal fungus of the orchid *Dendrobium officinale* // *Mycol Progress*. 2012. 11 (2): 395–401.
1053. Zhang H., Kim M., Krishnamachari V. et al. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis* // *Planta*. 2007. 226 (4): 839-851.
1054. Zhao M.-M., Zhang G., Zhang D.-W., Hsiao Y.-Y., Guo S.-X. ESTs analysis reveals putative genes involved in symbiotic seed germination in *Dendrobium officinale* // *PLoS One*. 2013. 8:e72705.
1055. Zhu Y., Nomura T., Xu Y., Zhang Y., Peng Y. et al.. Elongated uppermost internode encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice *Plant Cell*. 2006. 18: 442–456.
1056. Zielińska M., Michniewicz M. The effect of calcium on the production of ethylene and abscisic acid by fungus *Fusarium culmorum* and by wheat seedlings infected with that pathogen // *Acta Physiol Plant*. 2001. 23 (1): 79–85.
1057. Zinder S.H. Physiological ecology of methanogens. In: Ferry J.G. (ed.) / *Methanogenesis*. Chapman & Hall Microbiology Series (Physiology / Ecology / Molecular Biology / Biotechnology). Boston: Springer. 1993, 128-206.
1058. Zinniel D., Lambrecht P., Harris B., Feng Zh., Kuczmarski D. et al. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants // *Appl Environ Microbiol*. 2002. 68: 2198–2208.
1059. Zots G. What are Backshoots good for? Seasonal changes in mineral, carbohydrate and water content of different organs of the epiphytic orchid, *Dimerandra emarginata* // *Annal of Bot*. 1999. 84: 791-798.
1060. Zotz G. The systematic distribution of vascular epiphytes – a critical update // *Bot J Linn Soc*. 2013. 171: 453-481.
1061. Zotz G. *Plants on plants: the biology of vascular epiphytes*. Fascinating life sciences. Springer, Basel. 2016, 282 p.

БЛАГОДАРНОСТИ

Я бесконечно благодарна родителям и сыну Максиму за жизнь в её лучших проявлениях. Спасибо отцу, А.Г. Цавкелову, за идею этой работы и смену парадигмы с угольных терриконов на орхидеи и маме, к.м.н. Е.Б. Поповой, за любовь, долготерпение и неоценимый вклад в моё научное становление, включая школьные домашние задания и редакторскую правку научных изданий. С большим теплом и сердечностью я искренне признательна за дружбу, всестороннюю поддержку в жизни и в научных исследованиях, за бесценное общение моим близким по духу подругам: кандидатам биологических наук Т.А. Ханиной, М.А. Егоровой, Д.В. Малаховой и М.Р. Леонтьевой. Мария Романовна, первый шаг к тропическим орхидным случился именно благодаря тебе.

Хочу выразить благодарность учителям и преподавателям МГУ имени М.В. Ломоносова. Я глубоко признательна моим научным консультантам: д.б.н. проф. А.И. Нетрусову за многолетнее сотрудничество и за возможность реализации этой научно-исследовательской работы и д.б.н. проф. П.А. Кожевину за мировоззрение, внимание к моей работе и ценные комментарии. Сердечно благодарю к.б.н. И.В. Ботвинко и к.б.н. Т.А. Чердынцеву за руководство и наставления, за общение и помощь в науке и по жизни.

Автор благодарит всех, кто прямо или косвенно участвовал и помогал в создании и работе над этим научным исследованием на всех этапах: соавторам и коллегам, а также сотрудникам, студентам и аспирантам кафедры микробиологии МГУ, в особенности, Е.А. Волынчиковой, И.Д. Глухаревой, С.Ю. Климовой, А.С. Павловой и к.б.н. Л.И. Поповой. Я очень признательна д.б.н. проф. Г.Л. Коломейцевой за творческое сотрудничество и за предоставление образцов исследованных орхидей, без чего работа бы не состоялась.

Я искренне признательна друзьям и коллегам, кандидатам биологических наук А.А. Кринициной, Ф.Н. Розову, С.Г. Малахо, Е.А. Сперанской и Е.А. Конорову за неоценимую помощь при работе в молекулярно-биологической области. Отдельно хочу поблагодарить моих зарубежных коллег и друзей: Prof. Dr. Bettina Tudzynski, Dr. Christiane Bömke, Dr. Philipp Wiemann и Dr. Julia Schumacher из Вестфальского университета имени Вильгельма (Мюнстер, Германия) и Тель-Авивского университета (Тель-Авив, Израиль): Prof. Dr. Amir Sharon, Dr. Alin Finkelshtein, Dr. Anna Minz Dub и Dr. Ido Hatam. В этих лабораториях была выполнена часть научных исследований. Спасибо вам за новые знания, высокий класс профессионализма и за прекрасное время, проведённое с вами.