

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

*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)

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ  
имени М.В.Ломоносова

**Научные  
консультанты**

*Нетрусов Александр Иванович,*  
доктор биологических наук, профессор

*Кожевин Пётр Александрович,*  
доктор биологических наук

**Официальные  
оппоненты**

*Манучарова Наталия Александровна,*  
доктор биологических наук, профессор,  
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова», факультет почвоведения,  
кафедра биологии почв, профессор

*Доронина Нина Васильевна,*  
доктор биологических наук, доцент,  
ФГБУН «ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических  
исследований РАН», Институт биохимии и физиологии  
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, лаборатория  
радиоактивных изотопов, ведущий научный сотрудник

*Садыкова Вера Сергеевна,*  
доктор биологических наук, доцент,  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по  
изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.Гаузе»,  
заместитель директора по научной работе, заведующая  
лабораторией таксономического исследования и коллекции  
культур микроорганизмов

Защита диссертации состоится 18 мая 2021 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.03.13 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12, биологический факультет, аудитория М-1.

E-mail: [nvkostina@mail.ru](mailto:nvkostina@mail.ru)

Диссертация находится на хранении в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). С информацией о регистрации участия в защите и с диссертацией в электронном виде можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/356804743/>.

Автореферат разослан «\_\_» марта 2021г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета, к.б.н.



Костина Н.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Орхидные (Orchidaceae) – одно из крупнейших семейств растений, объединяющее более 27 000 видов, интерес к которым определяется их структурным и функциональным разнообразием, уникальными особенностями биологии и экологической стратегии, а также выраженной зависимостью от других живых организмов на различных стадиях своего развития. Эпифитные орхидеи по таксономическому биоразнообразию преобладают над наземными видами, на долю которых приходится лишь 25-30%. Отличительной особенностью эпифитов является наличие у них не только субстратных, но и воздушных корней, покрытых многослойным гигроскопичным веламеном. Таким образом, эпифитная орхидея в отличие от большинства других растений формирует два сайта (очага) микробной активности ризопланы, находящихся в различных условиях по наличию и доступности питательных веществ, воздействию биотических и абиотических факторов. Многие орхидеи не только высоко декоративны, но и обладают ярко-выраженными лекарственными свойствами благодаря разнообразным биологически-активным соединениям, 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 у растений, произрастающих в экстремальных условиях или толерантных к стрессовым условиям окружающей среды (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 множественную перекрёстную защиту против стресс-факторов и увеличивают резистентность и продуктивность растения-хозяина. Фитомикробиом таких растений отличается развитыми эволюционными адаптациями, связанными с более жёсткой реакцией на стресс.

Выделение и изучение функциональной активности 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 PGPB, 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 микробных популяций и активности микроорганизмов.

Опираясь на опыт, накопленный в экологии почвенных микроорганизмов, отраженный в ключевой отечественной работе Н. А. Красильникова (1958), всё больше исследований посвящено изучению механизмов и особенностей растительно-микробных взаимодействий, определению состава фитомикробиомов, роли ассоциативных микроорганизмов и возможностей практического использования PGPB (Lodewyckx et al., 2002; Моргун и др., 2009; Шабаев, 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 строения и развития с высокой декоративностью и лекарственными свойствами, стоит наиболее остро, отражая глобальный кризис биосферы. Орхидеи составляют большее число видов, находящихся под угрозой исчезновения, чем видов из других семейств (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, эта

задача усложняется длительным процессом прорастания их мельчайших семян и получением растений, способных адаптироваться при посадке.

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 возрос интерес к симбиотическому проращиванию семян с микоризой для более эффективной их акклиматизации и адаптации в природе (Roberts and Dixon, 2008; Zhang et al., 2012). Поиск новых 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; Schlaeppli 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 экониши. 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 К. 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 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) ГК<sub>4</sub> и ГК<sub>7</sub>, но не ГК<sub>3</sub>. 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 RGPB штаммов, образующих значительные количества экзополисахаридного матрикса, для их потенциального использования при семенном размножении орхидных. Получен патент РФ на изобретение: культуры бактерий, стимулирующей 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 RGPB штаммов. Оптимизация условий бактериализации, в том числе с экзогенным триптофаном, для увеличения микробного биосинтеза ауксинов и сопряженная с этим селекция RGPB 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 бактериализации семян селективированными штаммами PGPB 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 PGPB с семенами при бактериализации 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 бактериализации семян орхидей селективированными PGPB 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 ко-культивирования семян орхидей с PGPB штаммами и предложенный нами способ бактериализации являются новаторскими и перспективными 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 рНК, а также анализ с помощью денатурирующего гель-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 растениями, 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 коровой 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 гибберелинов 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 бактериализации семян орхидей с помощью селектированных 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 в сборе и анализе данных, проведении статистической обработки результатов и обобщении материалов, написании работы и публикаций, в которых отражены результаты работы, представлении результатов на конференциях. 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 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); 5<sup>th</sup> International Congress on Orchid Conservation (02-06 of December, 2013 г, 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, Пушкино, 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 2009 г., Москва, Россия).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 38 работ: из них 31 – статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых базами данных (Web of Science, Scopus и RSCI), рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова), 3 – статьи в Российских научных журналах (РИНЦ), входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ; 1 патент и 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 источник, из них 165 на русском и 896 на иностранных языках.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ВВЕДЕНИЕ

Во введении обосновывается актуальность исследования и избранной темы, определены цели и задачи исследования, объекты и предмет исследования, изложены основные положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология исследования, приведены сведения о личном вкладе автора, апробации и публикации результатов.

### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе рассмотрены особенности биологии растений семейства *Orchidaceae* Juss., их ключевые характеристики, уникальность их строения и комплексные биотические связи (зависимость, зачастую узкоспециализированная, от опылителей и гриба-микоризообразователя). Уделено особое внимание специализации эпифитных орхидей, особенностям их корневой системы и роли веламена, покрывающего их воздушные корни (ВК), в защите корней, участии в газообмене и удержании и распределении воды. Отдельные разделы рассматривают использование орхидей в пище и традиционной медицине, а также различные техники и подходы к размножению орхидей в искусственных условиях и сохранению их генофонда. Уделено внимание асимбиотическому проращиванию семян орхидей *in vitro* и особенностям начальных стадий развития проростков, а также микоризе орхидных и взаимодействию между растением и микоризообразующими и ассоциативными грибами. Рассмотрены разнообразие и роль бактерий, вступающих в ассоциативные и симбиотические отношения с различными растениями. Приведены примеры растительных ассоциаций и симбиозов с цианобактериями и гетеротрофными бактериями, многие из которых входят в группу RGPB. Рассмотрены основные типы прямого и опосредованного воздействия RGPB на растения, направленные на улучшение и стимуляцию их роста и развития, повышение устойчивости к воздействию стрессовых а- и биотических факторов. Отдельный раздел посвящен фитогормонам и соединениям с гормоноподобной активностью, образуемым микроорганизмами, прежде всего, стимуляторам роста растений – ауксином, гиббереллинам, цитокининам: разнообразию микроорганизмов-продуцентов, механизмам образования и особенностям регуляции микробного биосинтеза этих соединений, практическому использованию продуцентов и их продуктов в сельском хозяйстве и агробиотехнологии.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основной подход к решению поставленной в работе цели и задач заключался в изучении локализации и распределения ассоциативных микроорганизмов, выделении и идентификации культур бактерий и грибов, заселяющих оранжерейные и дикорастущие тропические орхидеи; в изучении состава микробных сообществ и взаимодействия между партнёрами; в определении роли и влияния отдельных групп микроорганизмов, прежде всего, за счёт прямого воздействия на растение – биосинтеза фитогормонов; в исследовании механизмов биосинтеза и регуляции образования ауксинов и гиббереллинов, а также стратегии взаимодействия микроорганизмов с семенами, ювенильными и генеративно-зрелыми растениями эпифитных орхидей; в выявлении оптимальных вариантов для потенциального использования культур PGPB для семенного размножения орхидей *in vitro*.

**Растения – объекты исследования.** В работе использовали воздушные и субстратные корни и/или листья и семена растений из Фондовой оранжереи ГБС им. Н.В. Цицина РАН (г. Москва): облиственных *Dendrobium moschatum* (Buch.– Ham.) Swartz., *D. nobile* Lindl., *D. bigibbum* Lindl., *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatt. & McCann и безлистных *Microcoelia moreauae* L. Jonss. и *Chiloschista parishii* Seidenf., а также дикорастущих (Вьетнам) эпифитной *Pholidota articulata* Lindl. и наземной *Paphiopedilum appletonianum* (Gower) Rolfe. Образцы корней и листьев получали с 2-4 растений по 3-5 штук с каждого в зависимости от вида. С дикорастущих орхидей отбирали по 3 корня с растения. Методология описана в: Цавкелова и др., 2003а; 2005; Tsavkelova et al., 2007а.

**Микроорганизмы – объекты исследования.** Выделение и/или идентификацию бактерий и грибов, в том числе эндофитных из поверхностно-стерилизованных корней, проводили, комбинируя методы традиционной микробиологии и современные молекулярно-биологические техники: секвенирование фрагментов генов рРНК, профилирование микробных сообществ на базе платформы MiSeq Illumina, а также денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ). В работе также использовали культуры бактерий: *Pseudomonas fluorescens*-32-gfp (van Bruggen et al., 2008; штамм предоставлен д.б.н., в.н.с. каф. микробиологии А.М. Семёновым) и *Klebsiella* sp. (Емцев, 1994; штамм предоставлен к.б.н. Е.А. Блинковым) и грибов (*Fusarium fujikuroi* МРС IM158289 и штамм m567, а также штаммы *F. proliferatum* D-02945 и D-00502 из коллекции лаборатории проф. Б. Тудзински (Westfälische Wilhelms-Universität) и *F. verticillioides* 149 и *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 42-87 из коллекции микромицетов лаборатории проф. А. Шарона (Department of Molecular Biology and Ecology of Plants, Tel Aviv University). Выделение и идентификация микроорганизмов, а также применённые в исследовании ДГГЭ и другие молекулярно-биологические методы описаны в: Цавкелова и др., 2003 б,в; 2004; 2005а; Tsavkelova et al., 2007а; 2008; 2016; Петрова и др., 2017; Pavlova et al., 2017).

**Микроскопия.** Использовали световую и конфокальную лазерную сканирующую микроскопии (КЛСМ; Nikon A1 CLSM, Olympus FV1000D), флуоресцентную (Zeiss Axioskr 2), трансмиссионную электронную и сканирующую электронную микроскопии (ТЭМ, СЭМ; 1830I Amray, JSM-6380LA Jeol на базе межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического ф-та МГУ имени М.В. Ломоносова). Методология описана в: Tsavkelova et al., 2008; 2012; Pavlova et al., 2017.

**Функциональная активность ассоциативных микроорганизмов.** Способность микроорганизмов к биосинтезу стимуляторов роста определяли по их наличию, разнообразию и концентрации. Содержание ауксинов и гиббереллинов определяли с помощью различных аналитических методов: колориметрически, используя тонкослойную хроматографию (ТСХ), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), газовую хроматографию (ГХ), совмещенную с масс-спектрометрией) и/или биотестов с растениями, как описано в статьях:

Цавкелова и др., 2003а; 2003г; 2004; Tsavkelova et al., 2007а; 2007b; 2008; 2012; 2016. Для изучения гидролитической активности *Trichoderma viride* анализировали его целлюлозолитическую активность по отношению к различным типам бумаг, на которых также культивировали анаэробные термофильные метаногенные сообщества, с помощью которых оценивали эффективность использования гриба для предобработки целлюлозосодержащих субстратов при их биоконверсии в биогаз. Эти же микробные сообщества использовали для оценки ресурсной роли цианобактерий и возможности утилизации их биомассы (*Anabaena*) в качестве единственного субстрата. Для количественной оценки эффективности биоконверсии биомассы цианобактерий метаногенным сообществом использовали определение содержания конечного продукта – биогаза, концентрацию которого измеряли на газовом хроматографе Кристалл 2000 М ("Хроматэк", РФ). Методология описана в: Цавкелова и др., 2012а; 2012б; Malakhova et al., 2015; Прокудина и др., 2016; Tsavkelova et al., 2017).

Изучение антимикробной активности соединений, содержащихся в фитомассе растений, преимущественно листьях орхидей, проводили согласно Marasini and Joshi, 2012 и Buyun et al., 2017, чашечно-диффузионным методом после экстрагирования 70%-ым этиловым спиртом. В качестве тест-культур использовали ассоциативные филлобактерии *D. moschatum*, а также условно-патогенные *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, и *Escherichia coli* (коллекция каф. микробиологии МГУ).

**Молекулярно-биологические методы исследования механизмов биосинтеза фитогормонов микромицетами** включали исследования наличия и функциональной активности генов: проведение ПЦР с обратной транскрипцией, трансформацию грибов из рода *Fusarium*, конструирование комплементационных векторов; для детекции наличия и экспрессии генов использовали Саузерн- и нозерн-блоттинг анализы, соответственно. Методология описана в: Tsavkelova et al., 2008; 2012; Niehaus et al., 2016; Tsavkelova, 2016.

**Для изучения распространения ризобактерий в корнях** с помощью КЛСМ использовали генно-модифицированный штамм *P. fluorescens*-32-gfp, а также штамм *Klebsiella oxytoca*, для модификации которого в этой работе использовали плазмиду, несущую GFP репортерный ген (pPROBE KT-Kan; Miller et al., 2000), которая была предоставлена проф. Steven Lindow, Berkley, USA. Методика описана в Pavlova et al., 2017.

**Для семенного размножения орхидей в ко-культурах с PGPB** использовали семена *D. moschatum* и *D. nobile*, питательные среды – модифицированную среду Кнудсон-С и Мурасиге-Скуга (MS/2) без добавления стимуляторов роста растений, а также культуры бактерий: аборигенные штаммы, выделенные с корней *D. moschatum*, а также ризобактерии, выделенные из иных источников (*P. fluorescens*, *K. oxytoca*). В ряд сред добавляли L-триптофан для стимуляции синтеза микробных ауксинов. Оценку развития семян проводили в соответствии с методикой Дж. Ардитти (Arditti, 1967), учитывая проросшие семена и анализ времени прорастания и стадии развития проростков. Методология описана в: Коломейцева и др., 2002; Коломейцева и др., 2005; Tsavkelova et al., 2007b; 2016.

**Математическая обработка результатов.** Эксперименты проводили в 3-5 повторностях. Полученные результаты выражали в виде среднего арифметического значения и вычисляли стандартное отклонение или ошибку среднего. Для оценки достоверности различий и значимости средних величин также использовали t-критерий Стьюдента и F-критерий Фишера. Для обработки и анализа результатов использовали программы Microcal Origin program (OriginLab), "one-way analysis of variance" (ANOVA) и Microsoft Excel.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Локализация ассоциативных микроорганизмов в ризоплане и филлоплане.** Исследование корней с помощью СЭМ выявило разнообразие микроорганизмов ризопланы и

установило различия в составе и интенсивности их колонизации. Наиболее многочисленными и вариативными по составу оказались цианобактериальные (ЦБ) сообщества, заселяющие ВК оранжерейных *P. amabilis* и *D. bigibbum* (рис. 1). У других облиственных орхидей (*D. moschatum* и *A. praemorsa*), выращиваемых как горшечная культура в менее влажных условиях, и имеющих также субстратные корни, разрастание ЦБ и формирование массивных ЦБ сообществ не отмечено, хотя их ризоплана активно заселена гетеротрофными бактериями и микромицетами, а гифы эндофитных грибов проникают внутрь их субстратных корней, где формируют пелотоны, характерные для микоризы (Цавкелова и др., 2001; 2003в; 2004; Tsavkelova, 2011). В коровой паренхиме ВК пелотонов выявлено не было, но эндофитный гриб обнаружен в ВК *P. amabilis*, покрытых массивными обрастаниями цианобактерий, чья потенциальная азотфиксирующая активность ( $798,95 \text{ нмоль этилена ч}^{-1}\text{г}^{-1}$ ) была показана нами ранее (Цавкелова и др., 2003а). Известно, что тропические почвы значительно обеднены минеральными соединениями, в том числе фосфором и азотом (Jordan, 1985; Davidson et al., 2004). Снабжение азотом эпифитных растений может обеспечиваться diaзотрофами, в особенности, цианобактериями, образующими значительную биомассу в оптимальных условиях роста.

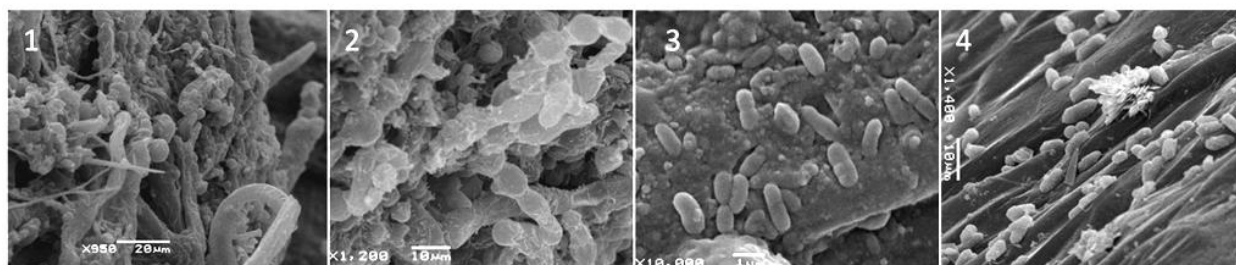


Рисунок 1. Поверхность воздушных корней *Phalaenopsis amabilis* (1) и *Dendrobium bigibbum* (2) с обильным нарастанием цианобактериального сообщества, формирующего биоплёнку – оболочку. Поверхность воздушных корней *Acampe praemorsa* (3) и *Dendrobium moschatum* (4). Видны нитчатые цианобактерии, состоящие из округлых и продолговатых клеток, и клетки гетеротрофных бактерий, а также кристаллы (рафиды оксалата кальция). СЭМ.

При анализе безлистных орхидей, *Ch. parishii* и *M. moreauae*, фотосинтез которых сосредоточен в ВК, их ризоплана оказалась также заселена разнообразными бактериями: на ВК *Ch. parishii* ЦБ образуют плотную биомассу, покрывающую более старые участки корней полностью, формируя нарастания – биоплёнки, сходные с чехлом-оболочкой облиственного эпифита *P. amabilis* (рис. 2). Наличие пористого веламена и его многослойность, очевидно, также способствуют формированию ассоциативного микробного сообщества на корнях безлистных орхидей. У *M. moreauae* ассоциативные бактерии образуют субпопуляции в углублениях на поверхности корня, а также формируют более плотные нарастания, но не такие массивные, как у *Ch. parishii*.

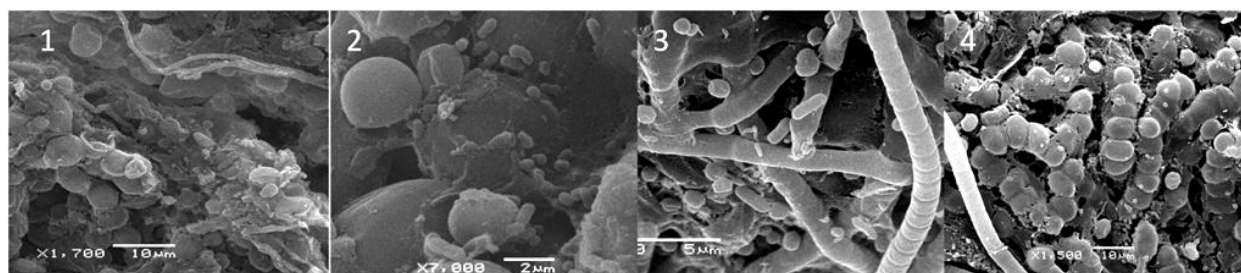


Рисунок 2. Поверхность воздушных корней *Chiloschista parishii* (нативная ризоплана 1, 2); корни *Microcoelia moreauae* в накопительной культуре на среде ВГ<sub>0</sub> (3,4). Представлено разнообразие микроорганизмов, составляющих микробное сообщество безлистных орхидей. Гетеротрофные бактерии заякорены в слизи, в том числе образуемой нитчатыми цианобактериями. СЭМ.



На корнях *Ch. parishii* и *M. moreauae* помимо крупных трихомов гетероцист-содержащих цианобактерий обнаружены представители семейства *Oscillatoriales*, а также нитчатые формы с пластичностью трихомов, у которых вегетативные клетки представлены округлыми или субсферическими клетками, но при делении могут иметь более квадратичную форму, а сами трихомы легко распадаются на отдельные клетки.

У облиственных горшечных орхидей *D. moschatum* и *A. praemorsa*, формирующих два типа корней: воздушные и субстратные, ВК заселены преимущественно гетеротрофными бактериями, а субстратные корни также и грибами. Обсемененность ассоциативными бактериями их ВК значительно превышает таковую субстратных корней. Примечательно, что безлистные орхидеи, выращиваемые в той же оранжерее, что и *D. moschatum* и *A. praemorsa*, имеют массивные ЦБ обрастания на ВК, отсутствующие у горшечных эпифитов. Полученные нами данные позволяют сказать, что особенности биологии растения-хозяина и условия его произрастания (культивирования) являются определяющими для интенсивности колонизации цианобактериями корней эпифитных орхидей.

На примере *D. moschatum* с помощью СЭМ показано, что большое распространение на листовых пластинках имеют гетеротрофные бактерии и дрожжи, заселяющие и верхнюю, и нижнюю поверхности листа. Бактерии также адгезируются вокруг устьичных щелей, но значимого увеличения их присутствия вблизи устьиц как у других растений не отмечено. У дикорастущего *Cymbidium* sp. выявлены те же характерные особенности (рис. 3): присутствие и адгезия клеток и микроколоний филлобактерий, но без формирования крупных агрегаций, а также заселение обеих сторон листа. Отмечены небольшие зоны гидролиза и эмульсации восков кутикулы листа.

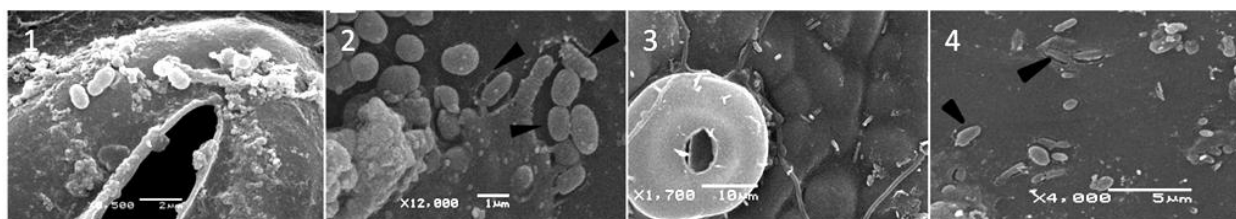


Рисунок 3. Поверхность листа *Dendrobium moschatum* (1,2) и *Cymbidium* sp. (3,4). Зоны гидролиза кутикулярного слоя отмечены стрелками. СЭМ.

Несмотря на непосредственное воздействие абиотических факторов внешней среды и испытывая колебания по влажности, температуре и воздействию УФ-излучения, ризоплана и филлоплана эпифитных орхидей представляют собой особенную и уникальную эконишу для заселения микроорганизмами и формирования микробных сообществ. Консортивные связи ассоциативных микроорганизмов с растением варьируют в зависимости от особенностей биологии растения и условий из произрастания (культивирования), однако, в каждом случае направлены на структурирование и оптимизацию формирования стабильного и функционально-активного сообщества для более эффективного сосуществования партнёров.

**Выделение и идентификация ассоциативных микроорганизмов.** В наших первых исследованиях (Цавкелова и др., 2001; 2003б) было обнаружено, что среди доминирующих цианобактерий, заселяющих корни облиственных оранжерейных видов, преимущество имели нитчатые diaзотрофные ЦБ *Nostoc* и *Anabaena*. Наибольшее разнообразие отмечено у облиственных эпифитных видов *P. amabilis* и *D. biggibum*, культивируемых в более влажных условиях в "блок-культуре" без субстрата: кроме *Nostoc* и *Anabaena* были выделены образующие гетероцисты *Calothrix* и *Scytonema*, а также *Spirulina*, *Oscillatoria*, различные одноклеточные ЦБ и представители LPP типа (Цавкелова и др., 2003а, б).

Дальнейшее изучение безлистных орхидей показало, что разнообразие ЦБ, входящих в микробное сообщество *Ch. parishii* и *M. moreauae*, значительно отличается от такового у

облиственных *D. moschatum* и *A. praemorsa*, выращиваемых в той же оранжерее с идентичным режимом. Представители *Nostoc* практически не обнаруживались на корнях безлистных орхидей, тогда как доминирующими оказались представители *Komarekiella*. На среде BG<sub>N</sub>-11 также были выделены нитчатые: *Tolypothrix*, *Oscillatoria*, *Scytonema*, *Komarekiella*, *Leptolyngbia*, *Nostoc Pseudophormidium/Phormidium* и одноклеточные: *Synechococcus* и *Microcoleus*. По составу ассоциативное ЦБ сообщество безлистных орхидей оказалось сходным с таковым у *Ph. amabilis*, у которого формируется наиболее мощный и функционально-активный чехол-оболочка из доминирующих в нём популяций ЦБ. Примечательно, что у безлистных орхидей, выращиваемых в более "сухих" условиях, чем *Ph. amabilis* и *D. bigibbum*, доминирующими становятся представители рода *Komarekiella* (100% идентичности с *Komarekiella atlantica* по результатам ДГГЭ анализа и последующего секвенирования), отличающегося интересным жизненным циклом, в котором отдельные стадии сочетают равно- и неравномерное деление, образование вегетативных клеток и гетероцист и формирование микроколоний (рис. 4). *K. atlantica* была выделена из дождевого леса в Бразилии и лишь недавно (Hentschke et al., 2017) этих цианобактерий, принадлежащих к семейству *Nostocaceae*, выделили в отдельный таксон.

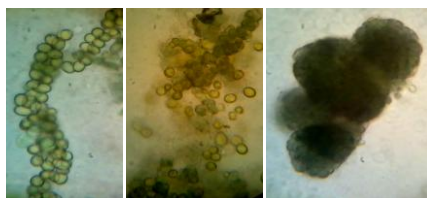


Рисунок 4. *Komarekiella* sp. – ассоциативные цианобактерии безлистных орхидей, выделенные (слева направо) с *Chiloschista parishii* (BG<sub>N</sub>-11) и *Microcoelia moreauae* (BG<sub>N</sub>-11 и BG<sub>0</sub>). ×1000.

Таким образом, как облиственным, так и безлистным эпифитам, в условиях произрастания, когда нет типичных субстратных корней, необходимо формирование тесных ассоциативных отношений с широким кругом различных diaзотрофных ЦБ, которые частично заменяют субстрат, создавая массивные обрастания и биоплёнки на ВК этих растений.

Чтобы показать ресурсную роль цианобактерий и потенциальный рост и сохранение функциональной активности многокомпонентных микробных сообществ, эффективность биодеградации мортмассы *Anabaena variabilis* в качестве единственного субстрата была изучена на примере селектированных нами (Цавкелова и др., 2012а; б) целлюлозолитических термофильных (55°C) метаногенных сообществ, содержащих уникальное разнообразие бактерий и архей (Петрова и др., 2017; Tsavkelova et al., 2018), Конечный продукт (биогаз) многоступенчатого превращения органического вещества в результате их активности легко измеряется количественно. Ранее (Gasanova et al., 2006) авторы провели биоконверсию биомассы *Anabaena* в биогаз в непрерывном биореакторе с мезофильным сообществом. В нашем исследовании мы использовали термофильные целлюлозолитические консорциумы: несмотря на то что некоторые не проявили метаногенной активности или содержание метана в составе биогаза не превышало 5-15%, наиболее активные из них образовывали более 60% кумулятивного метана. Таким образом, биомасса цианобактерий, как единственный источник органического вещества, может быть утилизирована в качестве субстрата и достаточно эффективно переработана микробным сообществом до конечных продуктов. Учитывая, что в экологии микроорганизмов ключевой особенностью микробных местообитаний являются гетерогенность и гетерохронность (Kozhevnikov et al., 2017), когда основные характеристики среды могут кардинально изменяться в пространстве и времени (включая абиотические факторы), а источником парниковых газов (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> и N<sub>2</sub>O) 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.

**Ассоциативные грибы облиственных эпифитных орхидей.** При изучении ассоциативных микромицетов *A. praemorsa* и *D. moschatum* были выявлены отличия в их составе, как между растениями, так и в зависимости от типа образуемых ими корней (Цавкелова и др., 2003в). Наиболее многочисленными и доминирующими среди изолятов оказались представители родов *Trichoderma* и *Fusarium*. Большинство эндофитных грибов, выделенных из внутренних тканей субстратных корней этих горшечных эпифитов, принадлежали к роду *Fusarium*. Результаты секвенирования изолятов по фрагменту ITS области 18S рРНК позволили идентифицировать следующие виды: *F. proliferatum* (ET1), *F. oxysporum* (№1), *F. chlamydosporum* и *Neonectria radicularis* (Tsavkelova et al., 2008). *Fusarium fujikuroi* и *F. proliferatum* – достаточно близкие виды (Leslie et al., 2004); амплификация и секвенирование фрагментов по генам IGS1, TEF1, TUB также подтвердили принадлежность изолята к *F. proliferatum* (Tsavkelova et al., 2008). В составе филлопланы *D. moschatum* были идентифицированы дрожжи из родов *Naganishia*, *Cryptococcus* и *Symmetrospora*.

Для сравнительного анализа грибов были также исследованы корни дикорастущих орхидей: *Paphiopedilum appletonianum* и *Pholidota articulata*. Из ризопланы *P. appletonianum* были выделены *Pestalotiopsis maculans* (Corda) Nag Rai, *Cylindrocladium* sp., *Fusarium decemcellulare* Brick, *Mucor* sp., несколько видов *Trichoderma*: *T. virens* (Miller et al.) von Arx, *T. harzianum* Rifai и *T. hamatum* (Bonorden) Bainier, а также *Ceratobasidium* sp. Среди эндофитов 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: *Pestalotiopsis*, *Trichoderma* и *Fusarium*, а также *Sordaria lappae* Potebnia и *Cryptosporiopsis* sp., а среди эндофитов – *F. flocciferum*, *T. virens*, *P. maculans*, *Aureobasidium pullulans* и *Chaetospermum chaetosporum*.

Представители *Fusarium* и *Trichoderma* являются общими среди ассоциативных микромицетов дикорастущих и оранжерейных орхидей. Разнообразие видов триходермы (*T. harzianum*, *T. virens*, *T. viride* и *T. hamatum*) сходно у дикорастущих и оранжерейных орхидей. *Trichoderma* – известные полиантагонисты и находятся в авангарде защиты растений от фитопатогенных грибов; в основе их антибиоза и микопаразитизма – образование комплекса литических ферментов, а также антимикробных соединений и антибиотиков (Александрова и др., 2000; Kubicek, 2001; Алимова, 2006; Садыкова и др., 2015). Целлюлазы этих грибов также могут индуцировать системную устойчивость растений (Saravanakumar et al., 2016). На различных типах бумаг общецеллюлазная активность и активность  $\beta$ -1,4-эндоглюканазы у *T. viride* были более высокими на офисной бумаге: 10,2 Ед./мг (белка) и 3,70 Ед./мг, соответственно (Прокудина и др., 2016). Смесь бумаг, состоящая из трудно- и легкоразлагаемых бумаг, также подвергалась биоразложению (3,0 Ед./мг и 0,9 Ед./мг, соответственно), тогда как по отдельности гидролиз газетной и журнальной бумаг проходил крайне затруднительно (общецеллюлазная активность составила 1,0 Ед./мг и 0,6 Ед./мг, соответственно). Предобработанная триходермой смесь бумаг (бумажных отходов) также более эффективно подвергалась биоконверсии в биотопливо (биогаз) при использовании метаногенного микробного сообщества с образованием более 52% куммулятивного метана (64,7 ммоль/л среды). Гидролитическая активность *Trichoderma* позволяет микробному сообществу более эффективно использовать целлюлозосодержащую биомассу, а применительно к фитомикробиому орхидей, представители рода *Trichoderma* могут выступать в роли первичных деструкторов отмирающих частей растения, при этом, обладая высокой антимикробной активностью, не допуская развития в прикорневой области фитопатогенных микромицетов. Подобную роль на примере дикорастущего *Dendrobium nobile*, например, отводят другому представителю класса Sordariomycetes – *Xylaria* (Yuan et al., 2009). Проявляя антагонизм по отношению к фитопатогенам, триходерма становится привлекательным партнёром для орхидей;

появляется всё больше данных о роли триходермы как эндофитного гриба, в том числе у эпифитных орхидей (Yang et al., 2008; Chen et al., 2011).

С целью определить характер взаимодействия между орхидеями и ассоциативными грибами из рода *Fusarium* были изучены два вида дендробиумов (*D. moschatum* и *D. nobile*) и грибов: изолят *F. proliferatum* ET1 и фитопатогенные штаммы *F. proliferatum* и *F. fujikuroi*. Эндофитный *F. proliferatum* ET1, выделенный из корней *D. moschatum*, не вызывал отрицательных симптомов у растений, а фитопатогенный штамм того же вида разрастался во внутренних тканях корней, проявляя некротрофные свойства, что привело к повреждениям, увяданию и гибели растения. Два штамма *F. proliferatum* демонстрируют различную стратегию взаимодействия с генеративно-зрелыми орхидеями. Фитопатоген риса, *F. fujikuroi*, не вызывал подобных симптомов у *D. nobile*, однако, провоцировал обесцвечивание и увядание листьев у *D. moschatum*, что может быть связано как с видоспецифичным взаимодействием, так и с различным иммунным статусом растений по отношению к другому фитопатогену, учитывая что *D. nobile* – одно из наиболее известных лекарственных растений. Ассоциативные микромицеты необходимы для устойчивого развития облиственных орхидей, а значимость и селекция благоприятных партнёров, возрастает по мере "взреления" растения, тогда как зависимость от микоризы, необходимой на этапах прорастания, у генеративно-зрелых орхидей снижается.

**Ассоциативные бактерии эпифитных орхидей.** Изучение состава бактериальных популяций, заселяющих корни эпифитных орхидей, проводили традиционными методами выделения чистых культур бактерий на питательных средах и современными, – включая высокопроизводительное секвенирование. Отличительным признаком большинства колоний бактерий, изолированных с ВК эпифитов, является их яркая пигментация, отсутствующая у бактерий, заселяющих их субстратные корни (Teixeira da Silva et al., 2015a; Tsavkelova et al., 2016). Пигменты защищают и повышают толерантность к УФ-излучению, что характерно для бактерий, заселяющих филлосферу (Roy et al., 1998; Sundin and Jacobs, 1999). Анализ воздушных и субстратных корней *D. moschatum* и *A. praemorsa* мы показал, что бактерии в большем количестве присутствуют в ризоплане ВК: так, ВК *A. praemorsa* заселяют  $2135 \times 10^6$  бактериальных клеток (КОЕ)/г, в то время как субстратные –  $7,6 \times 10^6$  кл/г (Цавкелова и др., 2004).

Более отчетливо эта разница видна на примере *D. moschatum*: ВК заселяет  $(300,0 \pm 18,80) \times 10^6$  КОЕ/г, а субстратные –  $(0,24 \pm 0,03) \times 10^6$  КОЕ/г. Для сравнения нами были также исследованы дикорастущие орхидеи: – с корней наземной орхидеи *P. appletonianum* было выделено  $(3,5 \pm 0,18) \times 10^6$  КОЕ/г, а с корней эпифита *Ph. articulata* –  $(192 \pm 8,5) \times 10^6$  КОЕ/г (Tsavkelova et al., 2007a). Таким образом, воздушные корни эпифитных орхидей из-за наличия особой структуры, – многослойного веламена, представляют собой уникальную эконишу для заселения ризобактериями. В отличие от остальных растений, произрастающих в почве (субстрате), у эпифитных орхидей зоной максимальной микробной активности становится не ризосфера, а именно ризоплана их субстратных и, в особенности, их воздушных корней.

Состав бактериального сообщества дикорастущей *Pholidota* отличается от такового у наземного *Paphilpedilum*, у которого преобладают грамположительные *Streptomyces* и *Bacillus* (43% и 26%, соответственно), тогда как доминирующие виды в ризоплане *Ph. articulata* – грамотрицательные *Pseudomonas* (24%) и *Flavobacterium* (14%; Tsavkelova et al., 2007a). Среди эндофитов *P. appletonianum* доминируют бациллы, а псевдомонады – в составе эндофитных популяций *Ph. articulata*. Бактериальное сообщество ризопланы эпифитных орхидей формируется, по сути, из двух микробных сообществ их воздушных и субстратных корней. При выделении культивируемых бактерий оранжевых *D. moschatum* и *A. praemorsa* было показано характерное отличие состава бактериальных популяций, колонизирующих два типа их корней.

Преимущественно, ВК заселены видами, принадлежащими к родам *Flavobacterium*, *Microbacterium* и *Sphingomonas*, которые не были обнаружены среди доминирующих популяций на СК. Наоборот, представители *Mycobacterium* и *Rhizobium* не выявлены на ВК. Среди эндофитов *Bacillus* и *Pseudomonas* встречались на обоих типах корней, в то время как *Flavobacterium* и *Microbacterium* – только на ВК, а *Gluconobacter* и *Alcaligenes* – на СК (Цавкелова и др., 2004; Tsavkelova et al. 2007b; Tsavkelova, 2011). На ВК преобладают представители семейств *Flavobacteriaceae*, *Microbacteriaceae* и *Sphingomonadaceae*; они активно колонизируют веламен и внутренние ткани. Состав микробных популяций растений, произрастающих в естественных условиях, отличается от оранжерейных видов наличием энтеробактерий (*Pantoea*, *Erwinia*) и представителей *Burkholderia*, а также большим количеством актиномицетов, образующих мицелий, – *Streptomyces* и *Nocardia*, колонизирующих *Ph. appletonianum*. При изучении культивируемых ризобактерий *D. moschatum* с использованием двух типов сред: триптон-соевого агара (ТСА) и модифицированной среды Чапека с дрожжевым экстрактом (ЧДЭ) были получены результаты, представленные в табл.1.

**Таблица 1.** Состав ассоциативных культивируемых бактерий, заселяющих ризоплану и внутренние ткани (эндофитные бактерии) корней *Dendrobium moschatum*.

	Субстратные корни				Воздушные корни					
	Ризоплана	%-ое содержание (%) <sup>a</sup>	Эндофиты <sup>b</sup>	(%)	Ризоплана	(%)	Эндофиты	(%)		
Т С А	<i>Pseudomonas</i>	52±5.5	<i>Paenibacillus</i> <i>Caulobacter</i>	78±2	<i>Sphingomonas</i>	18±3.0	<i>Microbacterium</i>	42±3.8		
	<i>Caulobacter</i>	6±2.8		22±2	<i>Brevundimonas</i>	15±2.6	<i>Sphingomonas</i>	19±1.4		
Ч Д Э	<i>Paenibacillus</i>	5±2.0	<i>Paenibacillus</i> <i>Caulobacter</i> <i>Rhizobium</i> <i>Phaeospirillum</i>	77±2	<i>Microbacterium</i>	13±1.6	<i>Pseudomonas</i>	8±2.4		
	<i>Mitsuaria</i>				<i>Methylobacterium</i>	12±2.0	<i>Paenibacillus</i>	6±1.0		
	<i>Ferrovibrio</i>				<i>Bacillus pumilus</i>	4±2.8	<i>Subtercola</i>			
	<i>Enterobacter</i>				<i>Paenibacillus</i>	3±1.0	<i>Paracoccus</i>			
					<i>Pseudomonas</i>	3±2.2	<i>Pseudomonas</i>			
					<i>Dyadobacter</i>		<i>Dyadobacter</i>			
					<i>Pedobacter</i>		<i>Pedobacter</i>			
					<i>Mucilagibacter</i>		<i>Mucilagibacter</i>			
					<i>Agrococcus</i>		<i>Agrococcus</i>			
					<i>Serinicoccus</i>		<i>Serinicoccus</i>			
					<i>Aureimonas</i>		<i>Aureimonas</i>			
							<i>Microbacterium</i>	14±1.2	<i>Microbacterium</i>	28±3.8
							<i>Sphingomonas</i>	10±2.6	<i>Sphingomonas</i>	20±2.0
				<i>Aeromicrobium</i>	9±1.8	<i>Paenibacillus</i>	3±1.8			
			<i>Paenibacillus</i>	5±0.5	<i>Nesterenkonia</i>					
			<i>Methylobacterium</i>	5±2.8	<i>Methylobacterium</i>					
			<i>Brevundimonas</i>	3±2.2						
			<i>Hymenobacter</i>							
			<i>Porphyrobacter</i>							
			<i>Roseomonas</i>							

Примечания: <sup>a</sup> – процентное содержание бактериальных популяций (%) оценивали как число КОЕ одного вида к общему числу колоний (КОЕ) × 100%. Данные представлены средним из трёх повторностей ± SD; <sup>b</sup> – эндофитные бактерии были выделены после поверхностной стерилизации корней раствором гипохлорита натрия.

На среде TSA удалось изолировать представителей *Mucilagibacter*, *Agrococcus*, *Serinicoccus*, *Dyadobacter*, *Aureimonas*, *Ferrovibrio* и *Enterobacter*, а на минеральной полусинтетической ЧДЭ – *Phaeospirillum*, *Nesterenkonia*, *Jeongeupia*, *Mitsuaria*, *Cupriavidus*,

*Azospirillum*. Представители рода *Microbacterium* заселяют преимущественно внутренние ткани ВК и являются доминирующими. Грамотрицательные бактерии из рода *Sphingomonas* также характерны для эндофитной микрофлоры ВК, составляя около половины от всех бактериальных популяций. Разнообразие эндофитов ВК значительно превышает таковое, обнаруженное на СК *D. moschatum*. С поверхностно-стерилизованных СК выделены *Penibacillus*, *Caulobacter*, *Rhizobium* и *Phaeospirillum*, из которых только споровые *Penibacillus* встречались также и внутри ВК этого растения. Среди эндофитов ВК были идентифицированы и другие представители актинобактерий (*Nesterenkonia*, *Subtercola*, *Brachybacterium*), а также псевдомонады и метилобактерии.

Среди эндофитов СК *Penibacillus* занимали доминирующее положение (более 70% популяции), а на ВК среди доминирующих популяций были выделены *Microbacterium* (порядок *Actinomycetales*), *Sphingomonas* (порядок *Sphingomonadales*), споровые (*Paenibacillus* и *Bacillus*), метилобактерии (род *Methylobacterium*), а также *Brevundimonas* (порядок *Caulobacterales*). Среди других бактерий ризопланы ВК были идентифицированы *Agrococcus* и *Serinicoccus*, (актинобактерии), *Mucilaginibacter*, *Pedobacter* и *Dyadobacter* (порядок *Sphingobacterales*), а также *Aureimonas* (*Rhizobiales*), *Hymenobacter* (*Flavobacteriales*), *Porphyrobacter* (*Sphingomonadales*) и *Roseomonas* (*Rhodospirillales*).

На субстратных же корнях этого вида орхидей помимо преобладающих представителей *Pseudomonas*, *Paenibacillus* и *Rhizobium*, выделенных нами ранее (Цавкелова, 2003), с использованием молекулярно-биологических методов был идентифицирован целый ряд других бактерий: *Mitsuaria*, *Cupriavidus* и *Variovorax* (*Burkholderiales*), *Ferrovibrio* (*Rhodospirillales*), *Enterobacter* (*Enterobacterales*), *Pedobacter* (*Sphingobacterales*), *Jeongeupia* (*Neisseriales*), *Azospirillum* и *Phaeospirillum* (*Rhodospirillales*), а также представители актиномицетов (*Streptomyces*) и *Caulobacter* (*Caulobacterales*). Результаты профилирования ризобактериальных сообществ *D. moschatum* с помощью высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina Mi Seq представлены на рис. 5 и в табл. 2.

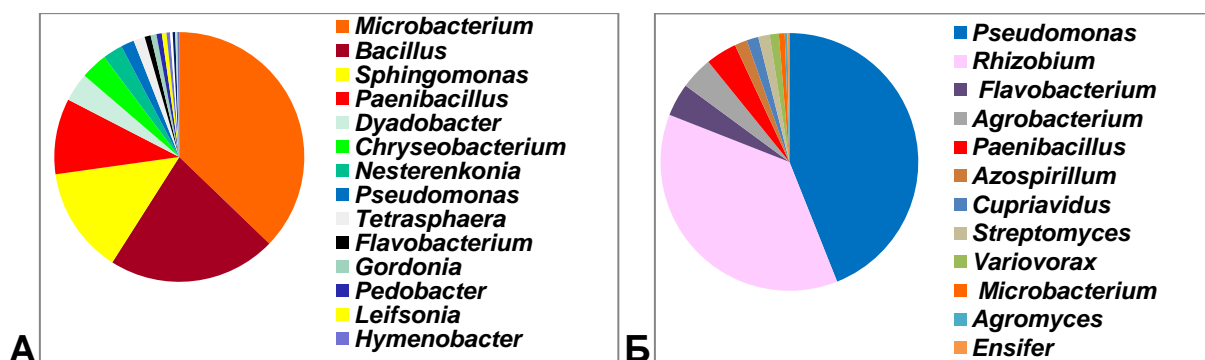


Рисунок 5. Профилирование бактериальных сообществ воздушных (А) и субстратных (Б) корней *Dendrobium moschatum*. Анализ проведён на сервере MG-RAST (<http://matagenomics.anl.gov>).

Из общего количества прочитанных последовательностей, составивших 54055 и 64040 для ВК и СК, соответственно, операционные таксономические единицы (ОТЕ) были кластеризованы на уровне сходства  $\geq 97\%$ , что позволяет провести идентификацию основных групп микроорганизмов. В таксономическом составе в фитомикробиоме ВК дендробиума среди основных популяций доминируют представители филумов *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. При этом в количественном выражении сфингомонады, представители *Proteobacteria*, занимают третье место в процентном соотношении их присутствия в сообществе. На СК, наоборот, разнообразие таксонов ограничивалось представителями *Proteobacteria*, со значительно меньшим присутствием актинобактерий. Единственный представитель *Firmicutes* – род *Paenibacillus*, заселяет оба типа корней. В итоге, среди бактерий, входящих в микробные

сообщества ризопланы обеих экониш (ВК и СК), составляющих  $\geq 1\%$  популяций внутри этих сообществ, лишь *Tetrasphaera* и *Chryseobacterium* с ВК и *Flavobacterium* с СК не были выделены среди культивируемых бактерий (табл. 1), однако флавобактерии удалось выделить нам ранее (Tsavkelova, 2011) из ризопланы *Acampe* и *Dendrobium*.

**Таблица 2.** Ризобактерии и их доля в микробном сообществе ассоциативных бактерий ризопланы воздушных и субстратных корней *Dendrobium moschatum*.

Бактерии ризопланы воздушных корней	Филлум (порядок)	% <sup>a</sup>	Бактерии ризопланы субстратных корней	Филлум (порядок)	%
<b><i>Microbacterium</i></b>	<i>Actinobacteria</i> ( <i>Actinomycetales</i> )	34.0	<b><i>Pseudomonas</i></b>	<i>Proteobacteria</i> ( <i>Pseudomonadales</i> )	43.6
<b><i>Bacillus</i></b>	<i>Firmicutes</i> ( <i>Bacillales</i> )	21.4	<b><i>Rhizobium</i></b>	<i>Proteobacteria</i> ( <i>Rhizobiales</i> )	36.7
<b><i>Sphingomonas</i></b>	<i>Proteobacteria</i> ( <i>Sphingomonadales</i> )	13.5	<b><i>Flavobacterium</i></b>	<i>Bacteroidetes</i> ( <i>Flavobacteriales</i> )	4.1
<b><i>Paenibacillus</i></b>	<i>Firmicutes</i> ( <i>Bacillales</i> )	9.6	<b><i>Agrobacterium</i></b>	<i>Proteobacteria</i> ( <i>Rhizobiales</i> )	4.0
<b><i>Dyadobacter</i></b>	<i>Bacteroidetes</i> ( <i>Sphingobacteriales</i> )	3.6	<b><i>Paenibacillus</i></b>	<i>Firmicutes</i> ( <i>Bacillales</i> )	3.9
<b><i>Chryseobacterium</i></b>	<i>Bacteroidetes</i> ( <i>Flavobacteriales</i> )	3.4	<b><i>Azospirillum</i></b>	<i>Proteobacteria</i> ( <i>Rhodospirillales</i> )	1.6
<b><i>Nesterenkonia</i></b>	<i>Actinobacteria</i> ( <i>Micrococcales</i> )	2.5	<b><i>Cupriavidus</i></b>	<i>Proteobacteria</i> ( <i>Burkholderiales</i> )	1.5
<b><i>Pseudomonas</i></b>	<i>Proteobacteria</i> ( <i>Pseudomonadales</i> )	1.7	<b><i>Streptomyces</i></b>	<i>Actinobacteria</i> ( <i>Actinomycetales</i> )	1.4
<b><i>Tetrasphaera</i></b>	<i>Actinobacteria</i> ( <i>Actinomycetales</i> )	1.5	<b><i>Variovorax</i></b>	<i>Proteobacteria</i> ( <i>Burkholderiales</i> )	1.1
<b><i>Flavobacterium</i></b>	<i>Bacteroidetes</i> ( <i>Flavobacteriales</i> )	0.8	<b><i>Microbacterium</i></b>	<i>Actinobacteria</i> ( <i>Actinomycetales</i> )	0.7
<b><i>Gordonia</i></b>	<i>Actinobacteria</i> ( <i>Actinomycetales</i> )	0.7	<b><i>Agromyces</i></b>	<i>Actinobacteria</i> ( <i>Actinomycetales</i> )	0.3
<b><i>Pedobacter</i></b>	<i>Bacteroidetes</i> ( <i>Sphingobacteriales</i> )	0.7	<b><i>Ensifer</i></b>	<i>Proteobacteria</i> ( <i>Rhizobiales</i> )	0.2
<b><i>Leifsonia</i></b>	<i>Actinobacteria</i> ( <i>Actinomycetales</i> )	0.6	<b>Примечания:</b> <sup>a</sup> – относительное %-ое содержание в популяции. Жирным шрифтом отмечены названия родов бактерий, также выделенных традиционным способом (табл. 1).		
<b><i>Hymenobacter</i></b>	<i>Bacteroidetes</i> ( <i>Flavobacteriales</i> )	0.4			
<b><i>Spirosoma</i></b>	<i>Bacteroidetes</i> ( <i>Sphingobacteriales</i> )	0.3			
<b><i>Pseudoxanthomonas</i></b>	<i>Proteobacteria</i> ( <i>Xanthomonadales</i> )	0.3			
<b><i>Nocardiopsis</i></b>	<i>Actinobacteria</i> ( <i>Actinomycetales</i> )	0.3			
<b><i>Aeromicrobium</i></b>	<i>Actinobacteria</i> ( <i>Actinomycetales</i> )	0.2			

Таким образом, практически все доминирующие бактериальные популяции в составе фитомикробиома ризопланы *D. moschatum*, идентифицированные с помощью высокопроизводительного секвенирования, соответствовали нашим данным, полученным при анализе чистых культур, выросших на питательных средах ТСА и ЧДЭ. Так, удалось выделить представителей таких родов, как *Nesterenkonia*, *Hymenobacter*, *Pedobacter* и *Aeromicrobium* в составе ассоциативных бактерий ризопланы ВК, а также *Cupriavidus*, *Azospirillum*, *Streptomyces* и *Variovorax* в составе микробного сообщества ризопланы СК *Dendrobium moschatum*. Несмотря на существовавшее мнение о том, что культивируемые бактерии из ризосферы, могут не представлять значимой доли в микробном сообществе, наши данные подтверждают правомочность использования традиционных методов, которые позволяют достоверно оценить не



только биоразнообразии бактерий, но и количественно охарактеризовать состав доминирующих бактериальных популяций в фитомикробиоме.

Значительное присутствие на воздушных корнях метиловых бактерий и представителей родов *Brevundimonas* и *Aeromicrobium* было обнаружено культуральным методом, но не при профилировании, составляя  $\leq 0,1\%$  популяций. Необходимо отметить, что биоразнообразие бактерий в этом сегменте, составляющем от 0,05 до 0,1% от всех бактерий сообщества, оказалось довольно обширным: это представители родов *Weeksella*, ***Roseomonas***, *Clavibacter*, *Nocardioides*, ***Arthrobacter***, *Aeromonas*, *Sanguibacter*, *Thioalkalivibrio*, *Kocuria*, *Clavaria*, *Streptomyces*, *Deinococcus*, ***Methylobacterium***, *Phyllobacterium* (жирным шрифтом выделены рода, представители которых были также изолированы чашечным методом). На субстратных корнях среди бактерий, составляющих 0,05–0,1% популяции, были идентифицированы представители *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, ***Caulobacter***, *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, ***Enterobacter***, *Klebsiella*, ***Mitsuaria***, ***Pedobacter***, *Sinorhizobium*. Таким образом, некоторые изоляты, выделенные в виде чистых культур, при HTS анализе входили в состав минорных компонент. Несмотря на то, что эти бактерии не преобладают количественно, они могут, тем не менее, играть немаловажную роль: некоторые из них, а именно, *Roseomonas*, *Enterobacter*, *Mitsuaria* оказались активными продуцентами ауксинов.

Присутствие ассоциативных сфингомонад, выделенных нами впервые с корней *D. moschatum* (Цавкелова и др., 2004), и известных к настоящему моменту как одних из наиболее активных своими рост-стимулирующими свойствами, выявляют к настоящему времени и на других орхидеях (Shekhovtsova et al., 2013; Yu et al., 2013; Yang et al., 2014; Li et al., 2017b). Несмотря на то, что можно выявить некоторое сходство на уровне порядков и филумов, на родовом уровне состав фитомикробиомов может отличаться между растениями, прежде всего, в зависимости от занимаемой экониши и климатических условий. Растение "селекционирует" своих ассоциативных партнёров, исходя из имеющегося пула микроорганизмов в данной конкретной эконише, основываясь, прежде всего, на функциональных особенностях PGPB.

Бактерии филлопланы, как и ризобактерии, заселяющие ВК *D. moschatum*, отличаются яркой пигментацией их колоний, подтверждая, что в эконишах, схожих по воздействию абиотических факторов (температура, высокая освещенность и УФ воздействие, лимитирование по доступности), преимущественно получают сходные группы бактерий. Анализ обсеменённости листовой поверхности показал, что транзитные микроорганизмы не типичны для филлопланы: подсчёт КОЕ для отмытых и нативных листьев составил сходные значения:  $73,5 \pm 2,7 \times 10^3$  и  $88,2 \pm 3,15 \times 10^3$  при пересчёте на г сухой биомассы, соответственно. Бактериальное сообщество филлопланы представлено преимущественно грамположительными бактериями, принадлежащими к *Microbacterium*, *Janibacter*, *Rathayibacter*, а также *Micrococcus*, *Brevibacillus*, *Kocuria*, *Serinicoccus*, *Nocardioides*, *Frigoribacterium* и *Marmoricola*. Среди грамотрицательных бактерий выделены представители *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Acinetobacter*, *Spirosoma* и *Roseomonas*. Подавляющее большинство грамположительных филлобактерий, исключая *Brevibacillus* (семейство *Paenibacillaceae* порядка *Bacillales*), относятся к порядку *Actinomycetales*, а грамотрицательные – к двум классам протеобактерий: *Alphaproteobacteria* (*Methylobacterium*, *Roseomonas*, *Sphingomonas*) и *Gammaproteobacteria* (*Acinetobacter*); *Spirosoma* – представитель филума *Bacteroidetes*. Многие выделенные бактерии являются представителями PGPB и встречаются в ризо- и филлосфере различных растений (Фёдоров и др., 2011; Madhaiyan et al., 2015; Vasilenko et al., 2016).

Профилирование сообщества филлобактерий *D. moschatum* на базе платформы Illumina MiSeq подтвердило данные по идентификации доминируемых культивируемых бактерий и показало, что их подавляющее большинство относится к филуму *Actinobacteria* (42,57-90,45%),



другие принадлежат к *Bacteroidetes* (1,35-16,45%) и *Deinococcus-Thermus* (4,16-18,57%), а также к *Proteobacteria* (0,17-2,04%) и *Firmicutes* (0,03-1,23%). Среди представителей доминирующих популяций – *Microbacterium*, *Corynebacterium*, *Deinococcus*, *Frankia*, *Hymenobacter*, *Kocuria*, *Propionibacterium*, *Pseudonocardia*, *Rathayibacter*, *Rhodococcus*, *Sphingobacterium* и *Spirosoma*. Максимальное присутствие (до 79%) имеют микробактерии.

**Микробный биосинтез стимуляторов роста растений.** Способность к образованию фитогормонов микроорганизмами, вступающим во взаимоотношения с растениями, является одним из основных путей прямого взаимодействия и коммуникации между растением-хозяином и его микробными партнёрами. Среди стимуляторов роста особую роль играет ауксин, без которого практически невозможно представить ризогенез растений. Способность к биосинтезу именно этого соединения рассматривается как характерная черта PGPB штаммов. Несколько изолятов цианобактерий, принадлежащих к родам *Nostoc*, *Anabaena* и *Calothrix*, выделенных нами с корней *D. bigibbum* и *Ph. amabilis*, без экзогенного триптофана (индуктор биосинтеза ИУК) имели уровень биосинтеза, не превышающий 1,4 мкг/мл. Добавление L-триптофана позволило увеличить образование ауксина на среде ВG<sub>N</sub>-11 в 4-9 раз. На безазотистой среде ВG<sub>0</sub> *Anabaena* sp. и *Calothrix* sp. оказались более продуктивными и образовывали до 20 мкг/мл. Триптофан-зависимый биосинтез ИУК ранее был отмечен и у свободноживущих, и у симбиотических цианобактерий (Sergeeva et al., 2002). Помимо ресурсной составляющей ЦБ сообщества и высокой diazотрофной активности ассоциативных ЦБ, потенциальный вклад в изменение фона экзогенного пула ауксинов также позволяет предполагать влияние цианобактерий на ризогенез воздушных корней эпифитов, учитывая чрезвычайно высокую плотность клеток и биомассу, наращиваемую ими в виде массивных обрастаний на воздушных корнях.

У микромицетов, принадлежащих к родам *Fusarium* и *Trichoderma*, выделенных из корней *D. moschatum* и *A. praemorsa*, мы также показали способность к триптофан-зависимому биосинтезу ауксинов с уровнем ИУК от 20-50 мкг/мл у видов *F. solani* и *F. proliferatum* и выше 70-130 мкг/мл у *F. oxysporum* и *F. verticosum* (Цавкелова и др., 2003в; г). Анализ с помощью тонкослойной хроматографии подтвердил наличие ИУК, а её биологическая активность была определена в биотестах с растениями. С целью более подробной функциональной характеристики биосинтеза ИУК у *F. proliferatum* ET1 было проведено исследование механизмов биосинтеза ауксинов в сравнении с известными патогенными представителями родов *Fusarium*: *F. fujikuroi*, *F. verticillioides* и *F. oxysporum*. Известно, что у фитопатогенов биосинтез ИУК может осуществляться по ИАМ (индолил-3-ацетамид) пути (Sraepen and Vanderleyden, 2011; Cerboneschi et al., 2016). С целью идентификации этого пути у представителей рода *Fusarium* по базе данных геномов BLASTP был проведен поиск гомологов ферментов бактериальной триптофанмонооксигеназы (IaaM) и ИАМ (индолацетамид) гидролазы (амидазы, IaaH). Последовательности с высокой гомологией с бактериальным геном *iaaM* были обнаружены только у *F. verticillioides* и *F. oxysporum*, тогда как амидазы с высокой гомологией с *iaaH* были идентифицированы во всех исследованных грибных геномах. У *F. verticillioides* и *F. oxysporum* оба гена расположены друг за другом и имеют характерную некодирующую область между ними; такая же существуют и у бактерий, где оба гена расположены последовательно в одном генетическом локусе (Sraepen 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. Этот предполагаемый локус ИАМ-пути биосинтеза ИУК отсутствует у *F. graminearum* и *F. solani*, не принадлежащим к комплексу видов *G. fujikuroi*, но удалось амплифицировать сходный участок у выделенного с орхидеи *F. proliferatum* ET1, а также у *F. fujikuroi*, принадлежащих к группе видов комплекса *G. fujikuroi*.

Анализ содержания ИУК в фильтратах показал, что все изученные виды образовывали и выделяли определенное количество индольных веществ (ауксинов) при добавлении триптофана к среде (рис. 6), но *F. proliferatum* ET1 образовывал большее количество ИУК, чем другие микромицеты. Основной интермедиат ИАМ-пути, индолил-3-ацетамид, был обнаружен только у *F. proliferatum* ET1, некоторый слабый сигнал был получен для *F. verticillioides*, а у фитопатогенных *F. oxysporum* и *F. fujikuroi* образование ИАМ отмечено не было. Таким образом, впервые были показаны наличие и активность обоих ферментов (триптофанмонооксигеназы и ИАМ-гидролазы) у *F. proliferatum* (штамм ET1). Образование ИУК у *F. verticillioides* с экзогенным ИАМ является индикатором активности ИАМ гидролазы, однако активность триптофанмонооксигеназы у него либо значительно снижена, либо фермент нефункционален. После удаления открытых рамок считывания для обоих генов и межгенного участка у *F. proliferatum* ET1, делеционные мутанты ( $\Delta iaam/\Delta iaah$ ) показали значительное сокращение уровня ИУК в среде с триптофаном, а добавленный к среде ИАМ не конвертировался в ИУК.

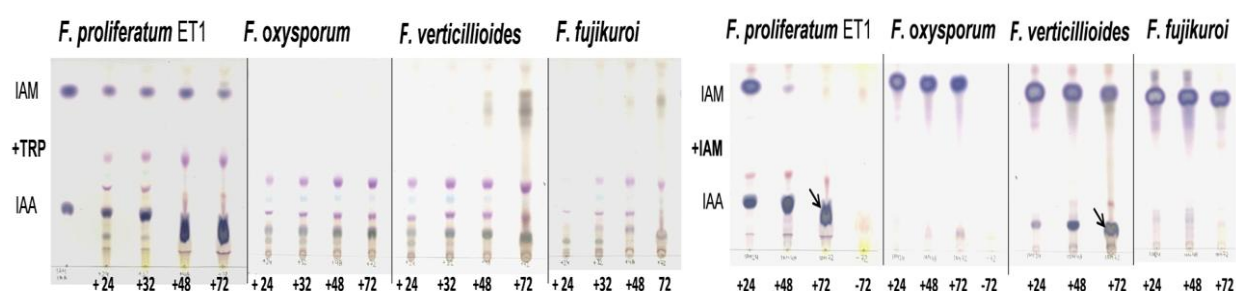


Рисунок 6. Образование индолил-3-уксусной кислоты (ИАА) из триптофана и индолил-3-ацетамида (ИАМ, IAM) видами *Fusarium* на среде Чапека-Докса без (-) и с добавлением к среде 4 мМ триптофана (+TRP) (слева) или 0,5 мМ ИАМ (+IAM) (справа). Экстракцию и определение содержания индольных веществ проводили в динамике через 24, 32, 48 и 72 ч культивирования.

Дикий тип фитопатогенного *F. fujikuroi* образует лишь следовые количества ИУК. Его трансформация с целью получения мутантов с избыточной экспрессией по этим генам привела к получению трансформантов, экспрессирующих только ген ИАМ гидролазы или оба гена *iaaM* и *iaaH*. В средах с ИАМ все трансгенные штаммы увеличили количество индольных соединений по сравнению с диким типом *F. fujikuroi*, но только трансформанты, содержащие оба гена, показали повышение биосинтеза индольных соединений на среде с триптофаном. Нозерн-блот анализ подтвердил эти результаты и показал, что экспрессия генов у фитопатогенных видов *Fusarium* отсутствовала или была крайне низкой (рис. 7).

Наиболее отчетливо полосы гибридизации, соответствующие обоим генам, были обнаружены у *F. proliferatum* ET1, хотя уровень экспрессии ИАМ-амидазы был выше, чем у триптофанмонооксигеназы (Tsavkelova et al., 2012).

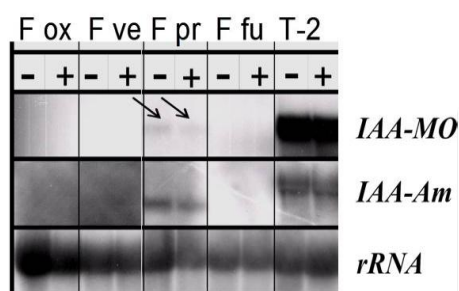


Рисунок 7. Нозерн-блоттинг. Образцы РНК разделяли на геле, переносили на мембрану и гибридизовали с ДНК-зондом, меченым  $^{32}P$ : *IAA-MO* (монооксигеназа), *IAA-Am* (ИАМ-гидролаза), *rRNA* (рРНК). F.v - *Fusarium verticillioides* 149, F.p - *F. proliferatum* ET1, F.o - *F. oxysporum* 4287, Ff - *F. fujikuroi* m567, T2 - трансгенный штамм *F. fujikuroi* m567, экспрессирующий оба гена *F. proliferatum* (по Tsavkelova et al., 2012).

Трансгенный штамм (overexpressing T2) показал значительную экспрессию *iaaM* наряду с высокой экспрессией амидазы. ВЭЖХ анализ метаболитов, характерных для других путей биосинтеза ИУК у исследованных штаммов *Fusarium*, показал, что индолил-3-пировиноградная кислота (ИПвК) и индолил-3-уксусный альдегид (ИУАлд) также обнаруживаются в КЖ *F. fujikuroi*, *F. verticillioides* и *F. oxysporum*. Примечательно, что эндофит орхидеи, *F. proliferatum*

ET1, имел самое низкое содержание метаболитов других путей (ИПвК и ИУАлд), среди изученных микромицетов, в то время, как содержание ИУАлд было наиболее высоким у фитопатогенных *Diaam/Diaah F. proliferatum* 62905 и *F. verticillioides*. Таким образом, для штамма ET1 было подтверждено, что именно ИАМ путь является основным функциональным путем образования ИУК, в то время как фитопатогены могут использовать дополнительно другие пути биосинтеза ауксинов (Niehaus et al., 2016).

**Биосинтез гиббереллинов *F. proliferatum* ET1.** С целью изучить способность *Fusarium proliferatum* ET1 образовывать другие фитогормоны – гиббереллины, биосинтез которых также характерен для некоторых представителей рода *Fusarium*, был проведён анализ механизмов их образования у этого изолята. Проведённые изначально биотесты и ТСХ анализ не выявили присутствия гибберелловой кислоты ГК<sub>3</sub>, которая является основным гиббереллином известного фитопатогена *F. fujikuroi*. ТСХ анализ показал, что *F. proliferatum* ET1 действительно не образует ГК<sub>3</sub>, но была получена полоса, соответствующая аутентичным метчикам ГК<sub>4</sub> и ГК<sub>7</sub>. 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, ГК<sub>9</sub>, ГК<sub>24</sub>, ГК<sub>14</sub>, ГК<sub>13</sub>, ГК<sub>36</sub>, ГК<sub>16</sub> и др., но основными были ГК<sub>4</sub> и ГК<sub>7</sub>, предшествующие ГК<sub>3</sub> (Tsavkelova et al., 2008).

Гены *ggs2* и *cps/ks*, входящие в кластер генов, ответственных за биосинтез ГК, из *F. proliferatum* ET1 были отсекувенированы: по нуклеотидным последовательностям ген *ggs2* (GenBank No. AM939934) на 90% и 91% идентичен аналогичным генам *ggs2 F. fujikuroi* и *F. proliferatum* D-02945, соответственно. Промоторные области генов содержат GATA элементы, - предполагаемых сайтов связывания для фактора транскрипции AreA (Kudla et al., 1990; Mihlan et al., 2003), что указывает на сходную систему азотной регуляции экспрессии этих генов. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей фрагмента *F. proliferatum* ET1 *cps/ks* (№ AM939935) выявил 93% идентичности с *F. proliferatum* D-02945 и 89% с *F. fujikuroi*. Многие различия между последовательностями штамма D-02945 и *F. fujikuroi* отсутствуют у *F. proliferatum* ET1. Для оценки уровня экспрессии ключевых генов *Ggs2*, *Gps/Ks* и *P450-4* у *F. proliferatum* ET1 был проведен Нозерн-блот анализ (рис. 8).

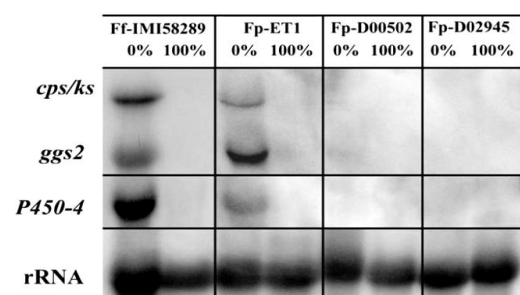


Рисунок 8. Нозерн-блот анализ *Fusarium fujikuroi* IMI58289 (Ff), *F. proliferatum* ET1 (Fp-ET1) и двух фитопатогенных штаммов (D00502 и D02945), не образующих гибберелловых кислот (ГК) выращенных в течение 3 сут на среде ICI 10%, а затем инкубированных 2 ч на среде без азота (0% ICI) и на 100% ICI. Анализ проводили по генам *ggs2*, *cps/ks* и *P450-4* (на основании последовательностей *F. fujikuroi* IMI58289; Tsavkelova et al., 2008).

Все три исследованных гена экспрессируются и у *F. proliferatum* ET1, и у *F. fujikuroi* в условиях азотного голодания, но не в присутствии азота в среде, тем более при его высоких концентрациях (100% ICI). Ни один из генов не выявил экспрессии у фитопатогенных штаммов *F. proliferatum* D-02945 и D-00502. Более того, в отличие от других исследованных грибов, *F. proliferatum* ET1 имеет два гомолога кластера генов ГК (Niehaus et al., 2016). Наши результаты показывают, что состав и количество ГК могут существенно отличаться между штаммами одного вида, что может в значительной степени обуславливать различную стратегию взаимодействия видов *Fusarium* с растениями.

Известно, что большинство видов, принадлежащих в комплексу видов *Fusarium fujikuroi*, не способны образовывать ГК, несмотря на наличие в их геномах генов, ответственных за биосинтез гиббереллинов. Виды, не входящие в этот комплекс, также не синтезируют ГК; к ним относится и *F. oxysporum*. У многих штаммов даже не обнаружено генов, необходимых для биосинтеза ГК, либо гены нефункциональны из-за множественных мутаций и/или потери одного или нескольких генов в составе кластера, а также дефектов регуляции генной экспрессии (Bömke and Tudzynski, 2009; Wiemann et al., 2013). С целью изучить, являются ли регуляция экспрессии генов биосинтеза ГК функционально-активной у *F. oxysporum*, была проведена трансформация дикого типа *F. oxysporum* №1, выделенного из ризопланы орхидеи, с помощью космиды pCos1, содержащей весь кластер генов *F. fujikuroi* (Tsavkelova, 2016). В то время как дикий тип *F. oxysporum* №1 не образует ГК, содержание ГК<sub>3</sub> у наиболее активного трансформанта T14 с полной вставкой кластера генов было выше ( $517 \pm 30$  мг/л), чем у исходного продуцента – дикого типа *F. fujikuroi* ( $337 \pm 27$  мг/л). Результаты Саузерн-блот анализа подтвердили наличие генов *ggs2*, *des* и *P450-3*. Их экспрессия подавляется высоким содержанием азота в среде. Известно, что шесть из семи кластерных генов, за исключением *P450-3*, регулируются фактором транскрипции AgeA GATA участка (Mihlan et al., 2003; Tudzynski, 2014). Нозерн-блоттинг показал высокую экспрессию *des*, *cps/ks* и *P450-3* у трансформантов в условиях лимитирования по азоту. Полное восстановление биосинтеза ГК у *F. oxysporum* подтверждает функциональную активность регуляторных механизмов транскрипции, а доступность в среде азота влияет на экспрессию генов вторичного метаболизма и на количество образуемых метаболитов, включая гиббереллины (Tudzynski, 2014).

**Биосинтез ауксинов ассоциативными бактериями орхидей.** Анализ ассоциативных бактерий, выделенных с оранжерейных и дикорастущих орхидей, показал, что уровень биосинтеза ИУК может значительно различаться в зависимости от состава питательной среды, концентраций триптофана (индуктор биосинтеза ауксинов), а также между видами и штаммами. Все продуценты образуют ИУК в начальной или поздней стационарной фазе роста. Считается, что корневые экссудаты содержат триптофан, снабжая им ризоплану и ризосферу, который затем подвергается конверсии в ауксин микроорганизмами, ассоциированными с растениями (Jaeger et al., 1999; Кравченко и др., 2004; Kamilova et al., 2006). Наши результаты также подтверждают эффективное использование экзогенного триптофана и его биоконверсию в ИУК, говоря в пользу функционирования, прежде всего, триптофан-зависимых путей биосинтеза ауксинов у ризобактерий (Цавкелова и др., 2004; Tsavkelova et al., 2007a; 2016). У наиболее активных продуцентов (*Sphingomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Microbacterium* sp., *Mycobacterium* sp.) ТСХ и ВЭЖХ анализ показали, помимо ИУК, присутствие других индольных соединений. Бактерии синтезируют ауксины, используя несколько метаболических путей: образование ИУК через индолил-3-пировиноградную кислоту (ИПвК), которая превращается в индолил-3-ацетальдегид (ИУАлд) и ИУК, является основным путём у растений, а также многих других микроорганизмов, в том числе PGPB (Costacurta and Vanderleyden., 1995; Brandl and Lindow, 1996; Цавкелова и др., 2006a; Sraeren, 2011). Пики со временем удерживания и УФ-спектром, идентичные ИПвК (ПА) и/или индолил-3-молочной кислоте (ИМК, ПА), были обнаружены у *Sphingomonas* sp., *Rhizobium* sp. и *Microbacterium* sp. (Tsavkelova et al., 2007b). Индолил-3-ацетамид (ИАМ) был выявлен у *Mycobacterium* sp., что указывает на активность ИАМ пути биосинтеза ИУК. У других штаммов ни ИАМ, ни индолил-ацетонитрил среди метаболитов обнаружены не были.

Среди бактерий, заселяющих филлоплану *D. moschatum*, биосинтез ауксинов имеет место не только у известных PGPB культур, таких как метиловобактерии, микробактерии или сфингомонады, но и у некоторых других изолятов, например, представителей родов *Rathayibacter*, *Deinococcus*, *Marmoricola*. Исследованные ризо- и филлобактерии оказались способны к биосинтезу основного стимулятора роста растений – ИУК: базовый уровень не превышал 1-5 мкг

ИУК/мл, который, однако, увеличивался в разы при добавлении триптофана. Но даже при внесении 200-300 мкг/мл L-триптофана, подавляющее большинство культур образует 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 фитопатогенов (Hansen and Grossmann, 2000). Популяции, составляющие фитомикробиом, участвуют в "тонкой настройке" уровня ИУК, определяя общую насыщенность пула ауксинами.

Биологическая активность микробной ИУК была подтверждена в биотестах с растениями. Ауксины ризобактерий, в том числе эндофитов оранжерейных и дикорастущих орхидных, включая помимо известных PGPB (*Bacillus*, *Mycobacterium*, *Rhizobium* и *Pseudomonas*) такие ассоциативные культуры, как *Roseomonas*, *Sphingomonas*, *Caulobacter*, *Streptomyces*, *Chryseobacterium*, *Stenotrophomonas*, обладают прямым рост-стимулирующим действием, индуцирующим ризогенез растений, что выражалось в значительном увеличении численности корней и высоты их закладки на черенках *Phaseolus vulgaris* (Цавкелова и др., 2004; Tsavkelova et al., 2007a; 2016; Pavlova et al., 2017).

**Влияние экзогенной ИУК на развитие популяций ризобактерий.** Чтобы оценить потенциальное влияние ауксина на микроорганизмы было проанализировано воздействие экзогенной ИУК на развитие культур некоторых ризобактерий-продуцентов ИУК. Наибольший стимулирующий эффект на *Mycobacterium* sp. и *Sphingomonas* sp. оказывала ИУК в концентрации 100 мкг/мл, увеличивая в 1,5 и 1,3 раза показатели OD<sub>600</sub> (рис. 9). Для *Rhizobium* sp. увеличение OD в 2 раза наблюдали при 10 мкг ИУК/мл, а у *Microbacterium* sp. 1,0 и 10 мкг/мл ИУК повышали OD культуры на 29 и 40%.

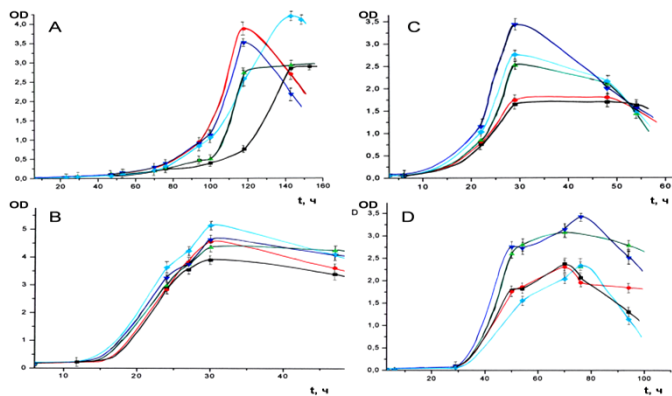


Рисунок 9. Влияние индолил-3-уксусной кислоты на оптическую плотность (OD) ризобактерий на синтетической среде: А – *Mycobacterium* sp., В – *Sphingomonas* sp., С – *Rhizobium* sp., D – *Microbacterium* sp. Обозначения: ■ контроль; ● 0,1 мкг/мл; ▲ 1 мкг/мл; ▼ 10 мкг/мл; ◆ 100 мкг/мл. Результаты представлены 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), однако ни один из изученных нами изолятов не разлагал ИУК вне зависимости от типа среды (синтетическая среда без и с добавлением 10 или 1,5 г/л глюкозы, органическая среда с пептоном) или времени культивирования (1-10 сут). В среде с 1,5 г/л глюкозы было отмечено лишь незначительное уменьшение ИУК к 6 сут культивирования, а без каких-либо источников углерода в среде (0 г/л глюкозы) деградации ИУК не наблюдали, что свидетельствует о том, что исследованные изоляты не используют ИУК как источник углерода и энергии. Таким образом, ИУК также может выступать как гормональное соединение, оказывающее стимулирующее действие на параметры роста культур бактерий без её использования в качестве питательного субстрата.

**Антимикробные свойства орхидей.** Листья, стебли и псевдобульбы эпифитных орхидей, в том числе различных видов обширного рода *Dendrobium*, широко используют в традиционной медицине (Teixeira da Silva et al., 2015a). Последние работы указывают на противораковую и



антибактериальную активности экстрактов эпифитных орхидей (Marasini and Joshi, 2012; Sandrasagaran et al., 2014; Буюн и др., 2016; 2017). В рамках изучения факторов микробно-растительных взаимодействий мы исследовали активность фитоэкстрактов *D. moschatum* и *Ph. chinensis* в отношении филлобактерий (рис. 10).

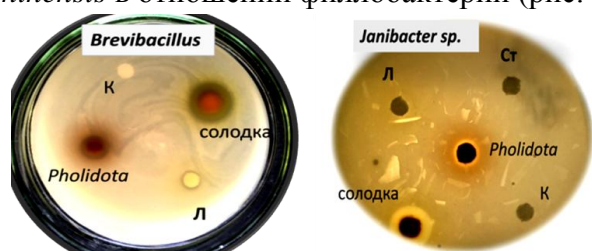


Рисунок 10. Антибактериальное действие фитоэкстрактов – зона подавления роста. Обозначения: Листья (Л) и стебель (Ст) *Dendrobium moschatum*, солодка - фитоэкстракт корня солодки (*Glycyrrhizae radices*), *Pholidota* - экстракт листьев *Pholidota chinensis*; контроль (К) - 70%-ный этиловый спирт.

В отличие от фитоэкстрактов корней солодки (положительный контроль) с зоной подавления роста филлобактерий 13-18 мм, а также листьев другой орхидеи - *Pholidota chinensis*, активность экстрактов листьев *D. moschatum* в 1,5 и более раз ниже, а зоны подавления роста филлобактерий и тест-культур не превышали 7-9 мм. При использовании стеблей зоны подавления роста отсутствовали. Анализируемые филлобактерии были выделены с листьев *D. moschatum*, что также может влиять на то, что листья фолидоты оказывали более заметное ингибирующее действие с зоной подавления роста более 10 мм. Наибольшая активность была отмечена в отношении условно-патогенных грамположительных культур *S. aureus* и *B. cereus*, а также *Brevibacillus*.

Экстракты листьев *D. moschatum* проявляют сдерживающий эффект на рост бактерий, однако его действие не является полностью ингибирующим. При поверхностном посеве небольшую антимикробную активность также наблюдали в отношении *Sphingomonas* sp., однако, этот эффект нивелировался при глубинном посеве. Возможно, часть антимикробного действия вызвана малорастворимыми или летучими соединениями, входящими в состав экстрактов. Более выраженное действие в отношении споровых культур подтверждает выборочное ингибирование роста некоторых групп микроорганизмов. При развитии микоризы орхидея также контролирует развитие и распространение гриба, препятствуя продвижению гиф в ткани, расположенные глубже коровой паренхимы, что осуществляется не только за счёт лигнификации клеточных стенок, но и за счёт образования ряда фенольных и противогрибных соединений (Waterman and Bidartondo, 2008). Синтез антибактериальных веществ в концентрациях, которые не подавляют рост бактерий полностью, но препятствуют их разрастанию, позволяет растению сохранять контроль за развитием микроорганизмов, в том числе, сдерживая чрезмерное распространение грамположительных бактерий. В то же время актинобактерии, колонизирующие филлоплану, известны тем, что сами являются продуцентами широкого спектра антибиотических веществ и хитиназ, которые значительно повышают общую устойчивость растения к фитопатогенам (Lugtenberg and Kamilova, 2009; Манучарова и др., 2011; Jha et al., 2013).

### Использование ассоциативных бактерий для семенного проращивания орхидей.

Семена *Dendrobium*-типа обычно продолговатые (рис. 11), от светло-желтого до желто-коричневого цвета, в длину 450-550 мкм. Плоды со зрелыми семенами у *D. nobile* вскрываются через год после опыления. В эмбриогенезе имеется продолжительный период (3-6 мес 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 (Kolomeitseva et al., 2021). Клеточная стенка семян разрушается в процессе прорастания, когда эмбрион увеличивается в размерах с последующим переходом в стадию образования портоторма.

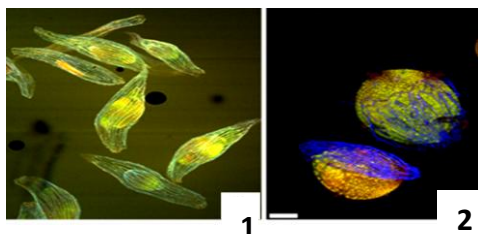


Рисунок 11. Семена (1) и протокормы (2) *D. nobile*. Шкала соответствует 100  $\mu\text{m}$ . СЭМ (с изменениями по по Kolomeitseva et al., 2021).

У зрелых семян орхидей отсутствует эндосперм, что не позволяет им прорасти без микоризообразующего гриба. При несимбиотическом проращивании *in vitro* гриб заменяют сложными питательными средами, обязательно содержащими витамины, факторы роста и фитогормоны. Для исследования фундаментальных и прикладных аспектов при разработке новых подходов к семенному размножению орхидей *in vitro* были использованы PRPB штаммы, которые могли бы способствовать прорастанию семян орхидей. Нами были впервые изучены стратегии взаимодействия рост-стимулирующих бактерий с семенами и проростками орхидей, были исследованы особенности распространения и локализации ризобактерий и изучено их влияние на рост и развитие растений. Особое внимание было уделено изучению вопросов видоспецифичности при взаимодействии партнёров. Известно, что подобная узкая специализация негативным образом влияет и сужает применение микоризообразующих 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.

Резидентные PGPB, используемые в агро- и биотехнологии растений, значительно стимулируют образование корней, наращивание вегетативной массы и продуктивность многих сельскохозяйственных культур (Khalid et al., 2004; Yasmin et al., 2004; Kamilova et al., 2006; Цавкелова и др., 2006а; Ahemad and Kibret, 2014). Продуценты ИУК: *Sphingomonas* sp., *Mycobacterium* sp. и *Rhizobium* sp., выделенные с корней *D. moschatum*, были использованы для проращивания семян этого растения на модифицированной среде Кнудсон-С (Tsavkelova et al., 2007b). Однако известный фитосимбионт, *Rhizobium* sp. оказался неэффективным и ингибировал прорастание семян из-за чрезмерного образования им на высокоуглеводной среде экзополисахаридного матрикса, покрывавшего плотным слоем семена. Другие культуры, наоборот, проявили значительный рост-стимулирующий эффект. После 100 сут инкубирования с *Sphingomonas* sp. все проросшие семена имели 1-2 развитых листа, дополнительные корни и размер  $5 \pm 0,20$  мм, а с *Mycobacterium* sp. проростки имели размер  $2 \pm 0,15$  мм, развитые ризоиды и сформированный апекс. Дальнейшее развитие наблюдали только в симбиотической культуре с *Sphingomonas*, где продолжался рост протокормов, листья оставались интенсивно зелеными, и было отмечено формирование нового (третьего) листа. Всего проросло 1,2% семян в ко-культуре с *Mycobacterium* sp. и 10,4% семян в ко-культуре с *Sphingomonas* sp. Во всех контрольных вариантах (без инокуляции бактериями) семена не проросли. Особенности биологии и развития орхидей сокращают выбор возможных к использованию штаммов PGPB (что показано нами на примере культуры *Rhizobium* sp., активно используемой для других сельскохозяйственных растений). Следующей целью наших исследований было выяснить, существует ли видоспецифичность в выборе бактериальных партнёров, и могут ли штаммы, изолированные с одного растения, стимулировать прорастание других видов орхидей. Изоляты, выделенные с корней *Dendrobium moschatum*, были использованы для бактериализации другого вида – *D. nobile*. Все штаммы были отобраны по принципу их способности к биосинтезу ИУК и положительному влиянию в биотестах на стимуляцию корнеобразования черенков фасоли. *D. nobile* имеет длительный период прорастания до этапа формирования ювенильного растения (рис. 12).

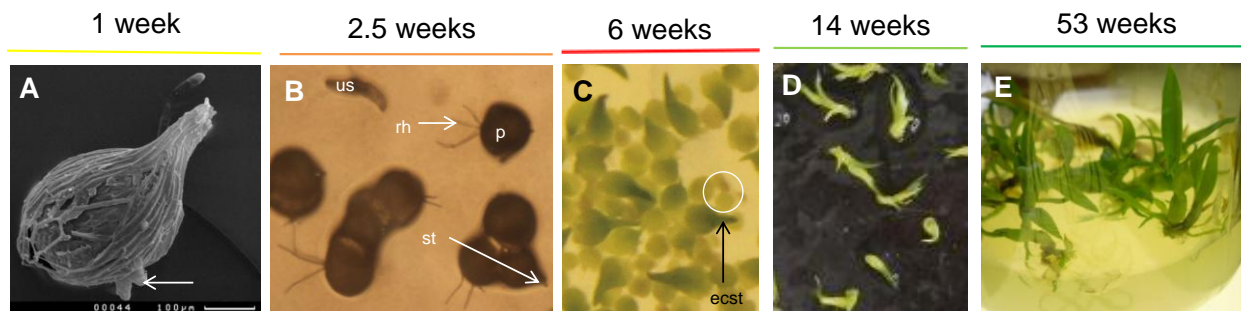


Рисунок 12. Стадии развития и прорастания *Dendrobium nobile* Lindl. на среде МС (Мурасиге-Скуга). Семена инкубировали в течение 2х недель в темноте, затем помещали в условия с 12 ч светопериодом. После 1 недели отмечено появление ризоидов и разрыв семенной кожуры (А). К 2,5 неделям культивирования протокормы (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 проростки имеют сформированные листья (D). Ювенильные растения (E) (Teixeira da Silva et al., 2015a).

Для бактериализации семян на среде МС (Мурасиге-Скуга) также не использовали какие-либо стимуляторы роста, но добавляли L-триптофан для индукции биосинтеза микробной ИУК. В качестве потенциальных PGPB были отобраны *Agrococcus* sp., *Streptomyces* sp., *Azospirillum* sp. и *Sphingomonas* sp., *Mycobacterium* sp. и *Bacillus pumilus*.

Культура *Azospirillum* sp. (как и *Rhizobium* sp.) образует чрезмерное количество полисахаридного матрикса (внеклеточной слизи), что препятствует развитию семян, а *Streptomyces* sp. вызывал очевидное негативное влияние на прорастание семян (рис. 13). Значительный рост-стимулирующий эффект был обнаружен при бактериализации эндофитными культурами *Sphingomonas* и *Agrococcus* (рис. 13).

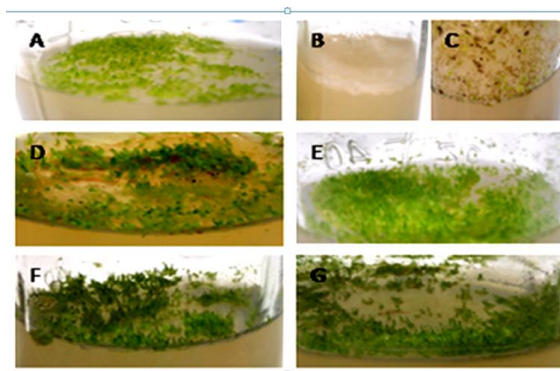


Рисунок. 13. Бактериализация семян *Dendrobium nobile* – через 2,5 месяца культивирования. Контроль (A) и ко-культуры: с *Azospirillum* sp. (B), *Streptomyces* sp. (C), *Mycobacterium* sp. (D), *Bacillus pumilus* (E), *Agrococcus* sp. (F) и *Sphingomonas* sp. (G). Активно фотосинтезирующие потокормы и проростки в вариантах А, D-G. Ингибиторный эффект на развитие проростков с *Streptomyces* sp. (C), отсутствие прорастания семян с *Azospirillum* sp. (B). С изменениями по Tsavkelova et al., 2016.

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 либо не обладали, либо имели только один различимый листовидный орган. Самый высокий процент проросших семян (94%) был обнаружен в ко-культуре с *Agrococcus* sp. (табл. 3), представители этого рода ранее не были описаны как PGPB. *Sphingomonas* sp. способствовала прорастанию 92% семян и их переходу от стадии разбухшего протокорма к следующим этапам развития проростка. Примечательно, что оба PGPB штамма были выделены именно как эндофиты из поверхностно-стерилизованных корней.



Таблица 3. Влияние PGPB на *in vitro* прорастание семян *Dendrobium nobile* на среде Мурасиге-Скуга с триптофаном (Tsavkelova et al., 2016).

Тест-вариант	3 недели	6 недель	9 недель	Проросшие семена (%) <sup>b</sup>
Контроль (семена+вода)	1+2 <sup>a</sup>	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>Azospirillum</i> sp.	0	0	0	0
<i>Bacillus pumilus</i>	2	2+3	3+4	90±3.5
<i>Agrococcus</i> sp.	1+2	2+3	3+4	94±2.3
<i>Streptomyces</i> sp.	0+1	0+1+2	0+1+2	≤50 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> – 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. <sup>b</sup> - Количество проросших семян (фотосинтетически активных) подсчитывалось через 2 месяца культивирования. Результаты представлены средним из 4-6 повторностей ± стандартное отклонение. <sup>c</sup> - Процент проросших семян в ко-культуре со *Streptomyces* sp. является приблизительной величиной, так как многие из проросших семян и развитых проростков затем погибли.

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* после длительного хранения (Tsavkelova et al., 2007a). Оба штамма были исходно выделены из разных орхидей: *D. moschatum* и *D. leonis*.

Не существует строгой специфичности в фитосимбионтном воздействии PGPB по отношению к различным представителям орхидей. Однако необходимо учитывать их особенности биологии: мельчайший размер семян, отсутствие эндосперма, необходимость комплексных питательных сред, длительный период прорастания и развития, что накладывает ограничения на выбор ризобактерий. Так, широко известные PGPB *Rhizobium* и *Azospirillum* оказались бесполезными, несмотря на их рост-стимулирующие свойства.

Исследованные ризобактерии активно заселяют поверхность семенной кожуры, колонизируя углубления на ребристой поверхности семян, образуя субпопуляции на ризоидах (рис. 14А-С). Внеклеточный экзополисахаридный матрикс (ЭМ) в данном случае играет важную роль для адгезии клеток и способствует образованию бактериальных агломератов. Наиболее отчетливо ЭМ, объединяющий клетки, виден у *Sphingomonas* sp. (рис. 14С). Микобактерии колонизировали ризоиды (рис. 14А), затем заселяя сформированные корни проростков. *Mycobacterium* и *Sphingomonas* проникают внутрь семенной оболочки и в образующийся веламен корней проростков, локализуясь эндофитно в коровой паренхиме *D. nobile*.

Мицелий *Streptomyces* sp. по мере появления ризоидов и листовидного органа полностью обрастал проросток (рис. 14Е, F), постепенно ингибируя его развитие, возможной причиной чему может быть образование антибиотиков с фитотоксическим воздействием (Liu et al., 2009; Opris, et al., 2013; Wang et al., 2015).

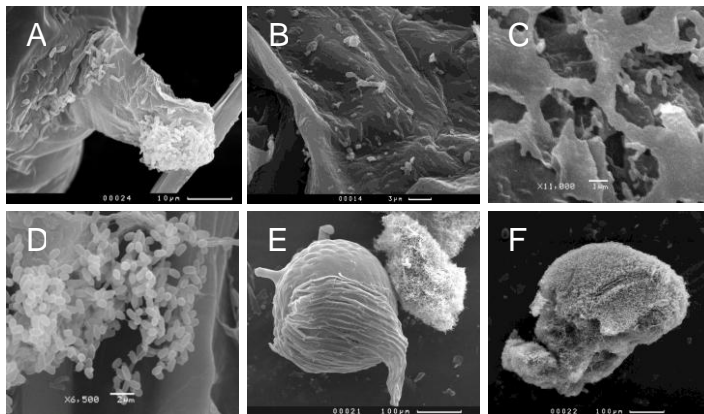


Рисунок 14. Семена *Dendrobium nobile* в культуре с ризобактериями (4-8 недель после инокуляции): А - *Mycobacterium* sp. на ризоиде (шкала - 10 мкм); В - *Agrococcus* sp. (3 мкм); С - популяция *Sphingomonas* sp., покрытая матриком (1 мкм); D - *Bacillus pumilus* (2 мкм); Е, F - колония *Streptomyces* sp. рядом с живым протокормом (Е) и полностью его обрастающая (F); 100 мкм. С изменениями по Tsavkelova et al., 2016.

Отсутствие строгой специфичности между орхидеей-хозяином и бактериальными партнерами позволяет широко использовать PGPB для семенного размножения орхидных *in vitro*. Бактеризованные семена не только получают преимущества при прорастании, но и более устойчивы, что повышает адаптационные возможности ювенильных растений при пересадке в субстрат, что необходимо при ре-интродукции орхидей в природу. Для оценки возможности использования PGPB, выделенных с других (не орхидных) растений, были исследованы меченые GFP *Klebsiella oxytoca* и *Pseudomonas fluorescens*. Уже к 30 мин после обработки корней культурой *K. oxytoca* TSKhA-gfp, бактериальные клетки были обнаружены в субстратных и в воздушных корнях *D. nobile*, концентрируясь в веламене (рис. 15). Дальнейшая колонизация коровой паренхимы происходила, в том числе за счет пропускных клеток экзодермы.

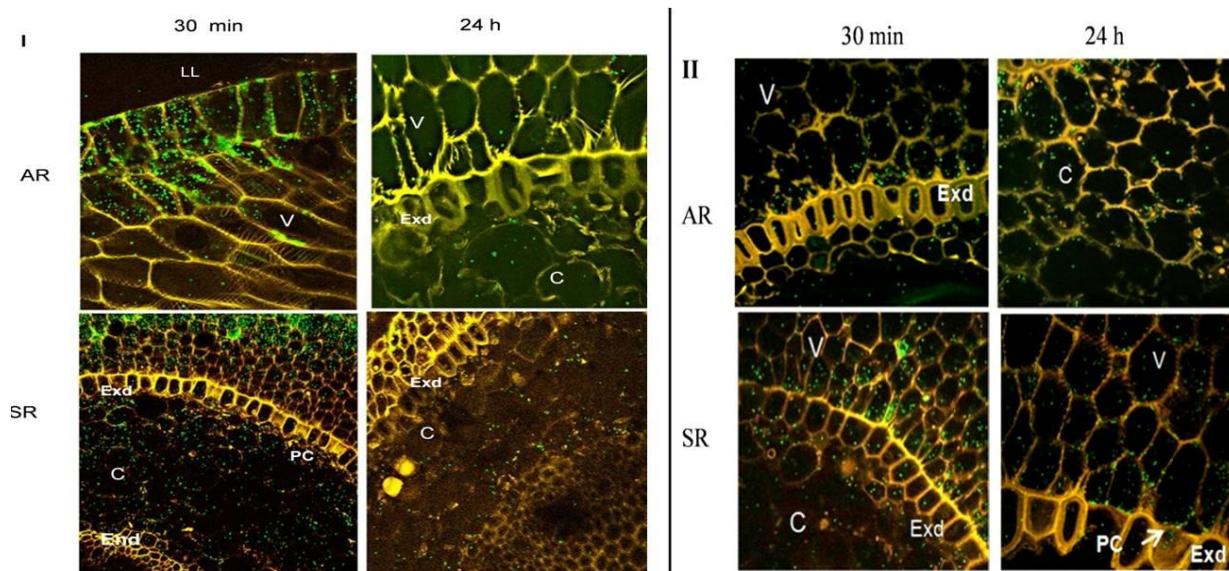


Рисунок 15. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия поперечных срезов воздушных (AR) и субстратных (SR) корней *Dendrobium nobile*, обработанных *Klebsiella oxytoca* TSKhA-gfp (I) и *Pseudomonas fluorescens* 32-gfp (II) - 30 мин и 24 ч после инокуляции. LL (limiting layer) - внешний слой веламена; V (velamen) - веламен; Exd (exodermis) - экзодерма; C (cortical parenchyma) - коровая паренхима; PC (passage cells) - пропускные клетки; End (endodermis) - эндодерма. Увеличение – 200-400 (с изменениями по Pavlova et al., 2017).

Локализация и распространение микроорганизмов были изучены на семенах, проростках и ювенильных растениях *D. nobile*. В отличие от корней генеративно-зрелых растений, бактерии не проникают во внутренние ткани прорастающих семян и протокормов, но активно колонизируют поверхность протокормов и появляющихся ризоидов. У годичных ювенильных растений с уже сформированными корнями отмечена эндофитная локализация *K. oxytoca* в межклеточном пространстве коровой паренхимы.

Обе исследованных бактерии образовывали ИУК; её количество зависело от наличия индуктора (триптофана) и состава среды, прежде всего, источника азота. Без триптофана образование ИУК отсутствовало (у *P. fluorescens*) или не превышало 3-4 мкг/мл у *K. oxytoca*, в то время как на аммонийной среде ауксин вообще не образовывался. Внесение 200 мкг/мл триптофана увеличивало образование ИУК *K. oxytoca* в 4,0, 7,7 и 30,0 раз в средах LB, K2-NH<sub>4</sub> и K2-NO<sub>3</sub>, соответственно. Максимальный эффект был обнаружен в безазотистой среде с более чем 400-кратной стимуляцией и образованием 120 мкг/мл ИУК, тогда как в LB, богатой органическими пептидами и аминокислотами, добавление триптофана почти не вызывало эффекта индукции биосинтеза ИУК. Внесение триптофана также повышало выход ауксина у *P. fluorescens* до 20 и 50 мкг/мл в средах K2-NO<sub>3</sub> и LB, соответственно. Биосинтез ИУК в аммонийной среде оставался также на минимальном уровне (2 мкг/мл), отражая ингибирующее влияние ионов аммония.

Результаты ТСХ показали наличие у изученных видов не только ИУК, но и соединений, соответствующих по R<sub>f</sub> ИМК и ИПВК, которые являются характерными метаболитами для ИПВК-пути биосинтеза ИУК. Полос, сходных с индолил-3-ацетамидом, обнаружено не было. Биотесты подтвердили высокую активность микробных ауксинов: ризогенез черенков фасоли при обработке культуральной жидкостью *K. oxytoca*, содержащей 60 мкг/мл ИУК, был выше в 13,5 раз, а количество корней – больше в 16,3 раза.

Влияние КЖ *P. fluorescens*, содержащей 30 мкг/мл, на ризогенез было менее эффективным из-за меньшего содержания ИУК: по высоте закладки корней: в 4,7 раз и по количеству корней – в 6,1 раз. Культуры *P. fluorescens* 32-gfp и *K. oxytoca* TSKhA-gfp были использованы для инокуляции семян *D. nobile*, культивируемых на модифицированной среде Кнудсон-С без фитогормонов. Обе культуры способствовали увеличению количества проросших семян и ускоряли их развитие без и с добавлением триптофана (рис. 16).

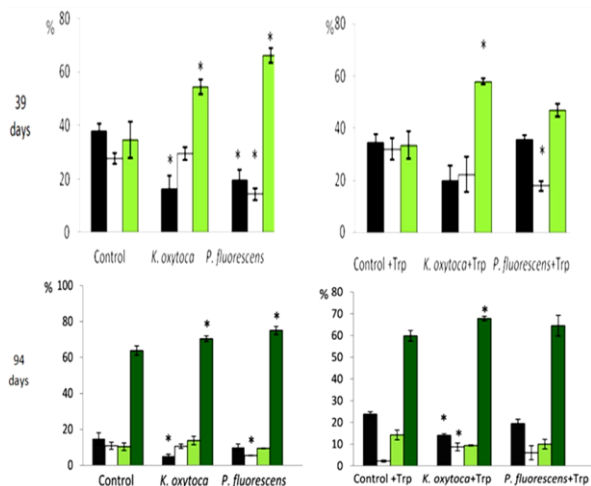


Рисунок 16. Развитие семян *Dendrobium nobile* без инокуляции (control) и с культурами *Klebsiella oxytoca* TSKhA-gfp и *Pseudomonas fluorescens* 32-gfp на среде Кнудсон-С без и с 200 мкг/мл L-триптофана (+Trp); непроросшие семена (черный); зеленый фотосинтетически активный протокорм (белый); развитые ризоиды и первый листовидный орган (светло-зелёный); два и более листьев (темно-зелёный). Значения представляют среднее из 4-х повторностей при подсчете 60 семян/протоковок/проростков трёх рандомизированных областей в каждой повторности ± SE. Звездочки указывают значимое отличие между опытными и контрольным вариантами согласно t-критерию Стьюдента (n = 4; P ≤ 0,05); по Pavlova et al., 2017.

Положительное влияние *P. fluorescens* наблюдали в течение всего периода бактериализации, но статистически значимые результаты (P ≤ 0,05) между контролем и опытными вариантами были зафиксированы к 94 сут. Рост-стимулирующий эффект *K. oxytoca* TSKhA-gfp был отмечен в обоих тестовых условиях (без и с добавлением триптофана). К 101-му дню культивирования значимо (P ≤ 0,05) увеличилось число проростков с двумя и более листьями, на 17% (– Trp) и на 22% (+ Trp). Даже без добавления триптофана эта культура показала существенное ускорение прорастания семян, сокращая количество непроросших семян и увеличив количество протоковок с развитыми ризоидами и сформированным первым листом к 39 и 54 сут и проростков с двумя и более листьями после 94-х суток совместной инкубации семян с культурой *K. oxytoca*. Без триптофана

длина проростков к 73, 94 и 101 суткам инкубации составляла на 40%, 25% и 27% больше с культурой *K. oxytoca* и на 14%, 29% и 43% больше с *P. fluorescens*, чем в контроле. Ризобактерии проявили свои PGPB свойства, что выражалось в ускорении развития и прорастания семян, особенно на ранних стадиях их развития. Селективной специфичности также не было отмечено, что позволяет использовать различные, в том числе не резидентные штаммы для семенного размножения орхидей в бактеризованных культурах *in vitro*. Таким образом, микроорганизмы проявляют различные стратегии взаимодействия, которые дополняют и улучшают адаптивный потенциал 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. Однако орхидеи, обладающие уникальными особенностями, в том числе корневой системы, позволяющей им существовать в довольно экстремальных условиях, до последнего времени не были объектом изучения микробиологов (за исключением микоризы орхидных). 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 "стрессовым барьером" (Коломейцева и др., 2013а; б). Растения вынуждены устанавливать новые биотические связи с локальными микробными сообществами, определённым образом подбирая партнеров, взаимодействие с которыми направлено на повышение адаптационных возможностей для растения, улучшение его роста и развития.

Несмотря на то что среди ассоциативных микроорганизмов можно выделить доминанты, присущие различным представителям эпифитных орхидных (Tsavkelova, 2011; Коломейцева и др., 2013а; б), микробные сообщества филло- и ризопланы обоих типов корней одного растения значительно отличаются между собой. Именно на воздушных корнях эпифитов можно наблюдать наиболее многочисленные и многокомпонентные консорциумы, что указывает на особую роль веламена как своеобразной экониши для заселения ассоциативными микроорганизмами. Влияние абиотических факторов, таких как температура и влажность, оказывает существенное влияние на интенсивность развития на воздушных корнях цианобактериальных сообществ, биоразнообразие популяций в которых, отличается у облиственных и безлистных видов орхидей. Очевидна приуроченность и преобладание нитчатых diaзотрофных видов цианобактерий, образующих гетероцисты. Лимитирование по содержанию соединений азота является критичным для развития эпифитов тропических регионов (Davidson et al., 2004). Эпифитные орхидеи, особенно их безлистные виды, нуждаются в diaзотрофных партнерах, формируя 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. За счёт образуемых массивных биоплёнок и обрастаний, наличия слизистых чехлов и выделения азот- и углеродсодержащих соединений, цианобактерии поддерживают рост микробных сообществ и ассоциативных микроорганизмов. Подобная структурирующая роль почвенных сообществ характерна для представителей семейства *Nostocaceae*, особенно в экстремальных условиях развития (Домрачева, 2005; Peng and Bruns, 2019). Высокая потенциальная азотфиксирующая активность цианобактериальных сообществ на воздушных корнях *Phalaenopsis amabilis* (Цавкелова и др., 2003а), а также принципиальная возможность

эффективной биоконверсии мортмассы *Anabaena* в качестве единственного субстрата анаэробным сообществом микроорганизмов (Петрова и др., 2017) подтверждают структурирующую и ресурсную роль цианобактерий в фитомикробиоме.

Среди гетеротрофных бактерий, заселяющих филлоплану эпифитов, доминируют грамположительные бактерии, в основном, представители порядка *Actinomycetales*, которые преимущественно локализуются в углублениях листовой пластины, а также заселяют участки вокруг устьиц. Филлоплана и ризоплана воздушных корней эпифитных орхидей являются эконишами, в которых микробные популяции находятся под непосредственным влиянием УФ-излучения, перепадов температуры и влажности. Формирование стабильных взаимоотношений между растением-хозяином и его партнёрами направлено на достижение устойчивого и эффективного взаимодействия и является взаимовыгодной стратегией для всех участников консорциума.

Многие ассоциативные грибы оранжевых и дикорастущих эпифитных орхидей принадлежат 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 изолятов *Fusarium* на основе молекулярно-биологических методов (Tsavkelova et al., 2008). Всё больше появляется данных о том, что у генеративно-зрелых орхидей, ассоциативные микромицеты играют не менее важную роль, чем гриб-микоризообразователь (Yuan et al., 2009). Подобные свидетельства подтверждают высказанные нами ранее предположения (Цавкелова и др., 2005а), что входящие в такие микосообщества непатогенные представители *Fusarium*, а также известные своими биоконтролирующими свойствами представители рода *Trichoderma* создают для растения своеобразный защитный барьер, что согласуется с концепцией сбалансированного антагонизма (Li et al., 2016). Мы 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 на листьях и корнях генеративно-зрелых растений, что подтверждает его нейтральное и даже фитостимулирующее действие (учитывая активный рост корней). Нами впервые изучены особенности в механизмах образования и регуляции биосинтеза ауксинов (Tsavkelova et al., 2012) и гиббереллинов (Tsavkelova et al., 2008; Niehaus et al., 2016), отличающие этот изолят от фитопатогенных видов и штаммов одноименного вида. Различия в составе и количествах образуемых стимуляторов роста растений существенно влияют на стратегию взаимодействия микромицеев с растениями.

К фундаментальным аспектам изучения биосинтеза гиббереллинов (гибберелловых кислот, ГК) также можно отнести наши исследования возможности реставрации биосинтеза ГК у *Fusarium oxysporum*, который не относится к комплексу видов *Fusarium* (*Gibberella*) *fujikuroi* и исходно не способен к образованию ГК (Bömke and Tudzynski, 2009; Wiemann et al., 2013). После введения всего кластера генов в *F. oxysporum* №1 он полностью возобновил способность к биосинтезу ГК (Tsavkelova, 2016), подтверждая функциональность всех регуляторных механизмов экспрессии генов.

При изучении локализации, биоразнообразия и роли ассоциативных микроорганизмов особое внимание нами было уделено гетеротрофным бактериям, колонизирующим ризоплану воздушных и субстратных корней оранжевых и дикорастущих эпифитных орхидей. После



работ Wilkinson с соавт. (1989, 1994b), проведенных на дикорастущих наземных австралийских орхидеях, наши работы по изучению биоразнообразия бактерий и механизмов их взаимодействия с орхидными послужили стимулом для дальнейших исследований в этой области, публикации по которым появляются всё больше в последнее время (Galdiano Jr. et al., 2011; Faria et al., 2013; Shekhovtsova et al., 2013; Yu et al., 2013; Yang et al., 2014; Li et al., 2017b).

Нам удалось показать существенные различия в составе ассоциативных сообществ гетеротрофных бактерий воздушных и субстратных корней эпифитных *Acampe praemorse* и *Dendrobium nobile* (Tsavkelova, 2011; Tsavkelova et al., 2016). Отдельным методическим вопросом был выбор техник, наилучшим образом характеризующих биоразнообразие бактериальных сообществ. Используя традиционно-микробиологический подход, включающий выделение чистых культур на питательных средах с дальнейшей их идентификацией, а также молекулярно-биологическое профилирование сообществ с помощью высокопроизводительного секвенирования (на базе Illumina Miseq) наши результаты показали правомочность применения выделения культивируемых микроорганизмов для описания разнообразия микробно-растительных популяций. Сочетание таких питательных сред, как R2A, TSA, а также модифицированной наличием дрожжевого экстракта минеральной среды, позволяет выделить широкий спектр бактерий, в том числе эндофитов, входящих не только в доминирующие, но и минорные популяции.

Несмотря на наличие типичных для ризосферы различных растений псевдомонад и бацилл (Jha et al., 2013; Ahemad and Kibret, 2014), обнаруженных в ризоплане субстратных корней орхидей, нами был также выявлен целый спектр видов, встречающихся либо исключительно на определённом растении, либо только на воздушных или только субстратных корнях растения, что характеризует индивидуальный состав фитомикробиома.

Выделенные нами среди доминирующих популяций на дикорастущих *Ph. articulata* и *P. appletonianum* (Tsavkelova et al., 2007a) представители семейств *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Burkholderiaceae* и *Bacillaceae*, также обнаруживаются и другими авторами при исследовании наземных и эпифитных тропических орхидей (Wilkinson et al., 1989; 1994b; Galdiano Jr. et al., 2011; Yu et al., 2013; Li et al., 2017b). В то же время отличительной чертой эпифитных орхидей является формирование ими воздушных корней с особенностями строения их корневой системы и подверженных непосредственному воздействию колебаний УФ воздействия, температур и влажности. Веламен, имеющий губчатую структуру, оказывающий механическую защиту и способный накапливать и удерживать влагу, нивелирует стрессовое воздействие абиотических факторов внешней среды, способствуя развитию ассоциативных микроорганизмов именно на воздушных корнях, что подтвердили проведённые нами количественные оценки распределения бактериальных популяций на примере оранжерейных (Tsavkelova, 2011) и дикорастущих орхидей (Tsavkelova et al., 2007a). В ризоплане воздушных корней доминирующими оказались представители филумов *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. В отличие от других растений, где проникновение эндофитов зачастую осуществляется через корневые волоски (Mercado-Blanco and Prieto, 2012), у воздушных корней эпифитных орхидей вся их поверхность становится доступной для ризобактерий (Pavlova et al., 2017).

Сообщества микроорганизмов, каждая группа 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, формируя, по сути, многофункциональный надорганизм, успешное существование которого определяется именно чётким взаимодействием всех его составляющих, а коммуникация определяется сигнальными молекулами, в особенности, фитогормонами, которые оказывают прямое воздействие не только на

физиологические характеристики растения, но и на микробные популяции (Tsavkelova et al., 2007b).

В этом контексте наши данные согласуются с концепцией холобионта, введённой Л. Маргулис (Margulis, 1991), рассматривающей макрохозяина и сопутствующего ему симбиотических микроорганизмов как единую полигеномную общность. 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, формирует ассоциативные микробные популяции и сообщества из микроорганизмов, присутствующих в окружающей среде, максимально адаптированных к данному хозяину, что влияет на приспособленность растений и гомеостаза всего консорциума в целом (Hassani et al., 2018).

Активность RGPB культур предполагает прямое или опосредованное воздействие на растение-хозяина и его трофическую функцию (азотфиксация и образование аммонийных соединений, солубилизация фосфора, образование сидерофоров), на гормональный фон (синтез фитогормонов или их ингибиторов) или на устойчивость и иммунный статус растения (синтез антимикробных соединений и литических внеклеточных ферментов; Белимов, Сафронова, 2011; Манучарова и др., 2011; Шапошников и др., 2011; Кравченко и др., 2004; Bhattacharyya, Jha, 2012; Achemad, Kibert, 2014; Spaeren, 2015; Verma, 2019). Большинство выделенных нами изолятов образуют ИУК, фоновое содержание которой создаёт условия для ризогенеза, что особенно важно для эпифитных растений и роста их корней. Микробные ауксины, образуемые изученными нами бактериями и грибами, обладают идентичностью химической структуры, а также проявляют биологическую активность, направленную на ускорение роста корней (Tsavkelova et al., 2007a; b; 2016). Биосинтез ИУК находится под влиянием азотного метаболизма, а аммонийный азот подавляет ее образование (Блинков и др., 2014; Pavlova et al., 2017). Наличие в среде ионов аммония, которые с лёгкостью усваиваются микроорганизмами, свидетельствует о достаточном содержании питательных азотсодержащих веществ и отсутствии необходимости стимулировать корнеобразование растений. На полностью лимитированной (безазотистой среде), даже при небольшой образуемой биомассе, диазотрофные бактерии выход ИУК резко увеличивается (Блинков и др., 2014; 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 новых субстратов и экономически эффективных технологий для получения возобновляемых источников топлива (Цавкелова и Нетрусов, 2012).

К молекулярно-генетическим аспектам биотехнологических разработок относятся результаты по исследованию возможности грибов из рода *Fusarium* к биосинтезу гибберелловых кислот (ГК). Нами впервые были получены данные о способности *F. proliferatum* ET1 к биосинтезу ряда ГК, в том числе ГК<sub>4</sub> и ГК<sub>7</sub> (Tsavkelova et al., 2008; Niehaus et al., 2016), а также о возможности использования генно-инженерных технологий для полного восстановления биосинтеза ГК у *F. oxysporum* (Tsavkelova, 2016). Установленный факт о сохранении общих регуляторных механизмов (также на основе азотного метаболизма) 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 больших количеств определённых ГК. Так, внутри спектра образуемых ГК несомненный интерес для практики могут представлять ГК<sub>4</sub> и ГК<sub>7</sub>, так как их диапазон действия

шире, а физиологическая активность во многих случаях выше, по сравнению с таковой у ГК<sub>3</sub> (Муромцев и Краснопольская, 1997). Экзогенная ГК<sub>4</sub> может быть преобразована в побегах растений в ГК<sub>1</sub> (Kobayashi et al., 1993). Поэтому эндофитный *F. proliferatum* ET1 может представлять интерес именно как продуцент ГК<sub>4</sub> и ГК<sub>7</sub>, которые как индивидуально, так и в смеси оказывают более мягкое действие на растения, в отличие от ГК<sub>3</sub> и ГК<sub>1</sub>, синтезируемыми фитопатогенным *F. fujikuroi*. Наши результаты подчёркивают важность использования так называемых "омик-" методов (геномика и протеомика) для анализа штаммов и их потенциальных возможностей для биотехнологии.

Особое внимание в работе уделено изучению взаимодействия ризобактерий с семенами и проростками орхидей, учитывая, что орхидеи могут находиться в предгенеративном периоде 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., 2021), объясняющие отсутствие эндосперма в семенах; впервые изучены ранние этапы взаимодействия PGPR штаммов с прорастающими семенами, локализация бактерий на поверхности семян, образующихся ризоидов и веламене корней ювенильных растений (Tsavkelova et al., 2016; Pavlova et al., 2017).

Значимыми для биотехнологии сохранения и воспроизведение орхидей *in vitro* являются результаты по бактеризации семян. Этот подход, предложенный нами (Коломейцева и др., 2002) и применённый в кандидатской диссертации (Цавкелова, 2003) был оптимизирован и усовершенствован в этой работе как способ семенного размножения орхидей в ко-культуре с аборигенными (Tsavkelova et al., 2007; 2016) и выделенными из других растений (Pavlova et al., 2017) PGPB. Метод показал высокую эффективность в отношении увеличения всхожести семян и ускорения их роста и развития. Методические рекомендации по использованию PGPR в проращивании бактеризованных семян орхидей изложены в научных статьях (Коломейцева и др., 2002; Tsavkelova et al., 2007b; 2016; Pavlova et al., 2017), а также в патенте РФ (№ 2272409, 2005). Примечательным является тот факт, что селектированные по способности к биосинтезу ауксинов штаммы показывают рост-стимулирующее действие на средах в отсутствие фитогормонов, без которых лишённые эндосперма семена орхидных не прорастают.

В работе акцентируется внимание на невозможности использования таких широко зарекомендовавших в агrobiотехнологии PGPB культур, как *Rhizobium* или *Azospirillum*, из-за чрезмерного образования ими на стандартных углеводсодержащих средах экзополисахаридного матрикса, который блокирует развитие семян. В отличие от микоризообразующих грибов, часто узко специализированных по отношению к растению-хозяину и требовательных в искусственных условиях к соотношению C:N в среде, из-за чего гриб может угнетать и подавлять развитие семян, мы показали отсутствие подобной специфичности при использовании бактериальных культур. PGPB позволяют значительно повысить всхожесть семян (в том числе, при полном её отсутствии в контрольных вариантах; Tsavkelova et al., 2007b), а формирование ассоциации ювенильное растение-бактериальная культура может значительно увеличить выживаемость и приспособляемость таких растений при их реинтродукции в природу с целью воссоздания утраченных популяций. Высокая эффективность культур, селектированных на основании биосинтеза ауксинов, стимулирующих прорастание семян и развитие проростков орхидей, а также определение механизмов их взаимодействия с растением позволяют рекомендовать разработанный нами способ для широкого применения в биотехнологии.



## 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 биодеградации 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 ГК<sub>4</sub> и ГК<sub>7</sub> 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 *Dendrobium 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в научных изданиях, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI:

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 [Oleskin A.V., Borvinko I.V., Tsavkelova E.A. Colonial organization and intercellular communication in microorganisms // Microbiology. 2000, 69:249–265] IF: 0,945; SJR: 0,32; квартиль Q3 (здесь и далее по данным <https://www.scimagojr.com/journalrank.php> на момент обращения 01.02.2021).
2. Цавкелова Е.А., Ботвинко И.В., Кудрин В.С., Олескин А.В. Детекция нейромедиаторных аминов у микроорганизмов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Доклады Академии наук. 2000. Т. 372. С. 840-842. IF РИНЦ: 0,78 (здесь и далее по данным <https://elibrary.ru/defaultx.asp> на момент обращения 01.02.2021).
3. 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

- [Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Lobakova E.S., Kolomeitseva G.L., Netrusov A.I. Microbiota of the orchid rhizoplane // *Microbiology*. 2001, 70: 492–497]. DOI: 10.1023/A:1010402715376. IF: 0,945; SJR: 0,32; Q3.
4. **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 [Tsavkelova E.A., Lobakova E.S., Kolomeitseva G.L., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. Localization of associative cyanobacteria on the roots of epiphytic orchids // *Microbiology*. 2003. **72**: 86–91]. DOI:10.1023/A:1022286225013. IF: 0,945; SJR: 0,32; Q3.
  5. **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 [Tsavkelova E.A., Lobakova E.S., Kolomeitseva G.L., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. Associative cyanobacteria Isolated from the roots of epiphytic orchids // *Microbiology*. 2003. 72: 92–97]. DOI:10.1023/A:1022238309083. IF: 0,945; SJR: 0,32; Q3.
  6. **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. IF РИНЦ: 0,66.
  7. **Цавкелова Е.А.,** Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Образование фитогормонов грибами, ассоциированными с орхидными // *Микология и фитопатология*. 2003г. Т. 37. С. 75-83. IF РИНЦ: 0,66.
  8. **Цавкелова Е.А.,** Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Бактерии, ассоциированные с корнями эпифитных орхидей // *Микробиология*. 2004. Т. 73. С. 825-831 [Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. Bacteria associated with the roots of epiphytic orchids // *Microbiology*. 2004. 73: 710–715]. DOI:10.1007/s11021-005-0013-z. IF: 0,945; SJR: 0,32; Q3.
  9. **Цавкелова Е.А.,** Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Образование ауксинов бактериями, ассоциированными с корнями орхидей // *Микробиология*. 2005. Т. 74. С. 55-62 [Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. Auxin Production by Bacteria Associated with Orchid Roots // *Microbiology*. 2004. 74: 55–62]. DOI:10.1007/s11021-005-0027-6. IF: 0,945; SJR: 0,32; Q3.
  10. **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. IF РИНЦ: 0,66.
  11. **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 [Tsavkelova E.A., Klimova S.Y., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2006. 42: 117–126]. DOI:10.1134/S0003683806020013. IF: 1,022; SJR: 0,28; Q3.
  12. **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. С. 261-268 [Tsavkelova E.A., Klimova S.Y., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. Hormones and hormone-like substances of microorganisms: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2006. 42: 229–235]. DOI:10.1134/S000368380603001X. IF: 1,022; SJR: 0,28; Q3.
  13. **Tsavkelova E.A.,** Cherdyntseva T.A., Botina S.G., Netrusov A.I. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin // *Microbiological research*. 2007а. V. 162. P. 69-76. DOI: 10.1016/j.micres.2006.07.014. IF: 3,97; SJR: 1,29; Q2.
  14. **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. DOI: 10.1007/s00203-007-0286-x. IF: 1,884; SJR: 0,69; Q3.
15. **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. 1393-1403. DOI: 10.1016/j.fgb.2008.07.011. IF: 3,071; SJR: 1,38; Q1.
  16. **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. DOI: 10.1016/j.fgb.2011.10.005. IF: 3,071; SJR: 1,38; Q1.
  17. **Цавкелова Е.А.**, Нетрусов А.И. Получение биогаза из целлюлозосодержащих субстратов // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 5. С. 469-483 [Tsavkelova E.A., Netrusov A.I. Biogas production from cellulose-containing substrates: a review. Appl. Biochem. Microbiol. 2012. 48: 421–433]. DOI:10.1134/S0003683812050134. IF: 1,022; SJR: 0,28; Q3.
  18. **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. 2012а. Т. 48. № 4. С. 417–424 [Tsavkelova E.A., Egorova M.A., Petrova E.V., netrusov A.I. Biogas production by microbial communities via decomposition of cellulose and food waste // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. 48: 377–384]. DOI:10.1134/S0003683812040126. IF: 1,022; SJR: 0,28; Q3.
  19. **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. IF РИНЦ: 0,76.
  20. 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 [Blinkov E.A., Tsavkelova E.A., Selitskaya O.V. Auxin production by the *Klebsiella planticola* strain TSKhA-91 and its effect on development of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds // Microbiology. 2014. 83: 531–538]. DOI:10.1134/S0026261714050063. IF: 0,945; SJR: 0,32; Q3.
  21. 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. DOI: 10.1007/s00425-015-2301-9. IF: 3,390; SJR: 1,26; Q1.
  22. 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. DOI: 10.1007/s00299-015-1829-2. IF: 3,825; SJR: 1,39; Q1.
  23. 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. DOI: 10.1007/s11274-015-1951-x. IF: 2,477; SJR: 0,72; Q2.
  24. **Tsavkelova E.** The biosynthesis of gibberellic acids by the transformants of orchid-associated *Fusarium oxysporum* // Mycological Progress. 2016. V. 15. № 2. P. 1-8. DOI:10.1007/s11557-015-1156-6IF: 2,149; SJR: 1,20; Q1.
  25. **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. DOI: 10.1007/s10725-016-0155-1. IF: 2,388; SJR: 0,82; Q1.

26. 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. DOI: 10.1093/gbe/evw259. IF: 3,462; SJR: 2,1; Q1.
27. 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 [Prokudina L.I., Osmolovskiy A.A., Egorova M.A. et al. Biodegradation of cellulose-containing substrates by micromycetes followed by bioconversion into biogas // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016. 52: 190–198]. DOI:10.1134/S0003683816020137. IF: 1,022; SJR: 0,28; Q3
28. 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 [Petrova E.V., Egorova M.A., Piskunkova N.F., Kozhevin P.A., Netrusov A.I. Anaerobic cellulolytic microbial communities decomposing the biomass of *Anabaena variabilis* // *Microbiology*. 2017. 86: 745–752]. DOI:10.1134/S0026261717060133. IF: 0,945; SJR: 0,323; Q3.
29. 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. V. 123. № 1. P. 217-232. DOI:10.1111/jam.13481 IF: 3,066; SJR: 0,87; Q2.
30. **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. DOI: 0.1016/j.procbio.2017.12.006. IF: 2,952; SJR: 0, 72; Q2.
31. Kolomeitseva G.L., Babosha A.V., Ryabchenko A.S., **Tsavkelova E.A.** Megasporogenesis, megagametogenesis, and embryogenesis in *Dendrobium nobile* (Orchidaceae) // *Protoplasma*. 2021. V. 258. P. 301-317. DOI: 10.1007/s00709-020-01573-2. IF: 2,751; SJR: 0,95; Q1.

#### Статьи в журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК

32. Коломейцева Г.Л., **Цавкелова Е.А.**, Гусев Е.М., Малина Н.Е. О симбиозе некоторых орхидных и активного штамма бактерии *Vacillus pumilus* в культуре *in vitro* // *Бюллетень Главного ботанического сада*. 2002. Вып. 183. С. 117-126. IF РИНЦ: 0,18.
33. 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. С. 133-142. IF РИНЦ: 0,193.
34. 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. С. 716-727. IF РИНЦ: 0,332.

#### Учебно-методические пособия и глава в книге

35. **Цавкелова Е.А.**, Чердынцева Т.А. Лабораторные опыты с растениями / Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов (ред.). // Москва: Изд. центр "Академия", 2005. С. 445-450.

36. **Tsavkelova E.A.** Bacteria associated with orchid roots // Bacteria in Agrobiology: Plant growth responses / D.K. Maheshwari (ed.). Heidelberg: Springer, 2011. P. 221-259.
37. **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.

### Патент

38. 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.

### 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.