

Санкт-Петербургский Государственный университет  
Биологический факультет  
Кафедра генетики и биотехнологии

Антонова Елена Юрьевна

**Поиск агробактериального гена биосинтеза цитокининов *ipt* в геномах  
фототрофных пурпурных бактерий**

Выпускная квалификационная работа магистра

Работа выполнена на кафедре  
генетики и биотехнологии

Научный руководитель:  
с.н.с., д.б.н. Чекунова Е.М.

Санкт-Петербург  
2018

## СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ .....	4
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	7
1.1 Биология фототрофных пурпурных бактерий.....	7
1.2 Биология и генетика <i>Rhodobacter sphaeroides</i> .....	13
1.3 Биология и генетика <i>Rhodospseudomonas palustris</i> .....	15
1.4 Биосинтез цитокининов у прокариотических микроорганизмов.....	18
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	22
2.1 Штаммы микроорганизмов.....	22
2.2 Питательные среды и условия выращивания.....	22
2.3 Молекулярно-генетические методы.....	23
2.3.1 Выделение плазмидной ДНК.....	23
2.3.2 Выделение геномной ДНК .....	23
2.3.3 Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) .....	24
2.3.4 Электрофорез в агарозном геле.....	24
2.3.5 Рестрикция ДНК.....	24
2.3.6 Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля .....	25
2.3.7 Выделение РНК с помощью реагента Тризол .....	25
2.3.8 Обратная транскрипция .....	25
2.3.9 Лигирование фрагментов ДНК в плазмиды.....	26
2.3.10 Трансформация клеток <i>E.coli</i> .....	26
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	27
3.1 Освоение методов работы с ФНПБ: подбор сред и оптимальных условий для культивирования этих бактерий.....	27
3.2 Поиск последовательности гена <i>ipt</i> в выделенных образцах ДНК методом ПЦР и ПЦР-РВ.....	27
3.3 Анализ экспрессии гена <i>ipt</i> в различных условиях выращивания культур бактерий.....	30
3.4 Определение генетического контекста гена <i>ipt</i> в геномах исследуемых штаммов ФНПБ.....	33
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ .....	34
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	35

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ФНПБ - фототрофные несерные пурпурные бактерии

*Rba.sphaeroides*- *Rhodobacter sphaeroides*

*Rps. palustris* - *Rhodospseudomonas palustris*

СТАВ - cetyl trimethyl ammonium bromid - буфер

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid

ВЦПМ - внутрицитоплазматическая мембрана

ФМН - флавиномононуклеотида

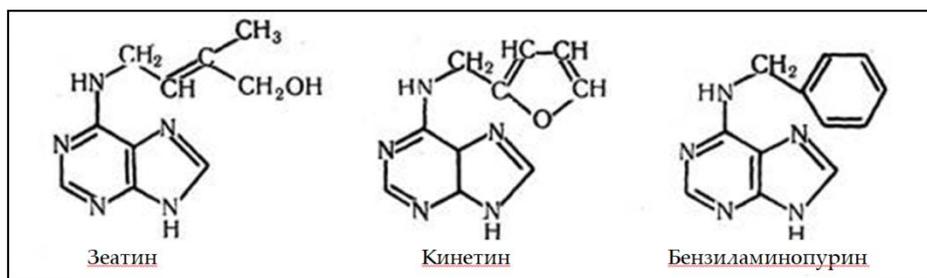
ФАД – флавинадениндинуклеотида

ИРТ – изопентенилтрансфераза

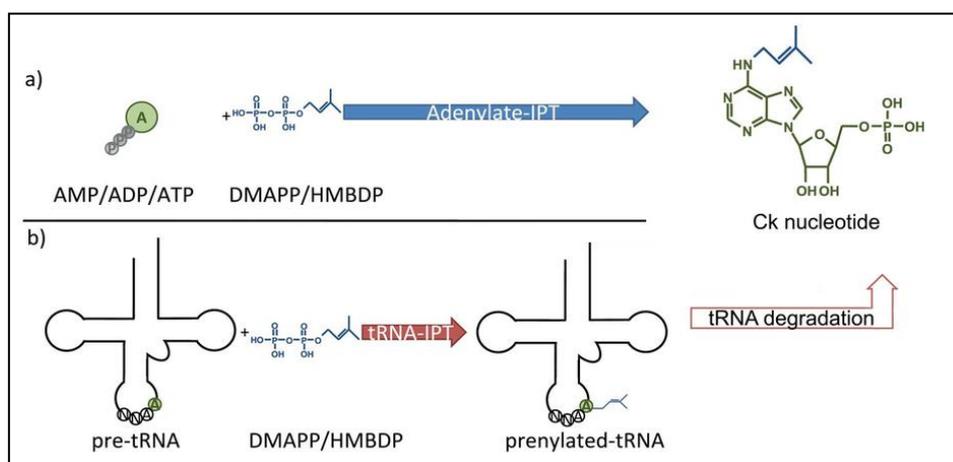
## ВВЕДЕНИЕ

В 1955 г. Скугом и Миллером в Висконсинском университете был открыт новый тип фитогормонов. Активное вещество выделили в кристаллическом виде и установили, что оно является 6-фурфуриламинопурином, который образуется из дезоксиаденозина при деградации ДНК. Поскольку его добавление к питательной среде, содержащей сахарозу, элементы минерального питания, витамины и ауксин, вызывало переход клеток изолированной сердцевины стебля табака к делению, это вещество получило название кинетин (от слова кинез — деление). Вскоре оно было синтезировано. Последовал синтез большого числа его химических аналогов, обладающих такой же или даже более высокой биологической активностью. Все эти вещества были объединены под общим названием цитокинины [Романов, 2009].

По химической структуре цитокинины являются N<sup>6</sup>-изопренилированными производными адениннуклеотидов (рис. 1). Ключевой фермент в биосинтезе цитокининов – изопентенилтрансфераза (ИПТ; EC 2.5.1.27), присоединяет изопентенильный остаток к АМФ у бактерий, и к АДФ или АТФ у растений [Kakimoto, 2006, Sakakibara, 2001]. Другой тип изопентенилтрансфераз – tRNA-IPTs (EC 2.5.1.8) катализирует присоединение изопентенильной группы к аденозину (i6A) в положении 37 (A37) около 3'-конца петли антикодона у некоторых видов тРНК (рис. 2). Эти тРНК- изопентенилтрансферазы обнаружены практически во всех организмах от простейших до животных [Kamada-Nobusada, 2009]. Наиболее полно функции цитокининов проявляются в растениях и механизмы их действия хорошо изучены. Однако цитокинины широко распространены не только в растительном мире, но также и у микроорганизмов, в основном симбиотических или паразитических. Среди микроорганизмов, способных к биосинтезу цитокининов, наиболее известна почвенная бактерия *Agrobacterium tumefaciens*, вирулентные штаммы которой, взаимодействуя с раневой поверхностью растения, индуцируют у него опухолообразование. Агентом, вызывающим неконтролируемое деление клеток в растении, является Т-ДНК (transfer DNA) – фрагмент агробактериальной Ti-плазмиды (tumor inducing) с геном биосинтеза цитокининов *ipt*, который интегрируется в геном растений. Т-ДНК в клетке растения-хозяина запускает неконтролируемый синтез гормонов (ауксинов и цитокининов) и дальнейшее образование азотсодержащих веществ – опинов, которые служат источником питания для агробактерий [Лутова, 1998, Krall, 2002].



**Рисунок 1. Химическая структура некоторых цитокининов**



**Рисунок 2. Упрощенная схема двух альтернативных путей биосинтеза цитокининов**

(а) Прямой синтез ферментом IPT. DMAPP, диметилаллилдифосфат; HMBDP, гидроксиметилбутенилдифосфат.

(б) Пренилирование UNN-декодирующих тРНК у аденина (A37) с помощью тРНК-IPT и последующее высвобождение нуклеотидов цитокинина путем деградации тРНК. [Lindner, 2014]

Фототрофные несерные пурпурные бактерии (ФНПБ) – наиболее древние представители фотосинтезирующих организмов. В соответствии с анализом нуклеотидных последовательностей 16S rRNA, ФНПБ филогенетически близкородственны с агро- и другими нефототрофными бактериями [Woese, 2002]. В отличие от агробактерий, нет никаких сведений о наличии генов биосинтеза цитокининов у фототрофных пурпурных бактерий. Но их близкое родство все же позволяет предполагать, что синтез цитокининов на том или ином уровне может осуществляться и у ФНПБ [Сердюк, 2017].

Ранее для изучения влияния экзогенных цитокининов на физиологию ФНПБ, штаммы *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* 2R и *Rhodospseudomonas (Rps.) palustris* КМ МГУ 285 трансформировали бинарным вектором pGA482ipt, содержащим ген *ipt* из природной

Ti-плазмиды pTiBo542 супервирулентного штамма *Agrobacterium (A.) tumefaciens* A281 [Timothy, 1989, Алексеева, 2000]. При изучении экспрессии этого трансгена на уровне транскрипции методом RT-PCR помимо высокого уровня *ipt*-транскриптов у трансформанта в клетках нетрансформированных штаммов *Rba. sphaeroides* 2R и *Rps. palustris* был зафиксирован низкий уровень *ipt*-ампликонов. Поиск *in silico* нуклеотидных последовательностей гена *ipt* в хромосомах этих бактерии дал отрицательный результат. Экспериментально было установлено, что *ipt*-ампликоны появляются при ПЦР, где в качестве матриц использовали плазмидные ДНК, выделенные из бактерий *Rba. sphaeroides* и *Rps. palustris*. Оказалось, эти штаммы содержат последовательности агробактериального гена *ipt* в составе еще неизвестных плазмид. Прямое секвенирование показало, что эти нуклеотидные последовательности гена *ipt* одинаковы у обеих бактерий и идентичны (99%) гену *ipt* из Ti плазмиды *A. tumefaciens* штамма pTiBo542. Таким образом, впервые было установлено, что ФНПБ *Rba. sphaeroides* 2R и *Rps. palustris* содержат последовательность гена биосинтеза цитокининов *ipt*, имеющих, по-видимому, внехромосомную локализацию [Сердюк, 2017].

Целью работы является поиск гена биосинтеза цитокининов *ipt* у ФНПБ. Предметом исследования стали штаммы *Rba. sphaeroides* 2.4.1 и *Rps. palustris*, которые хорошо генетически изучены, и геномы которых почти полностью секвенированы. Для выполнения данной цели были поставлены след задачи:

1. Освоение методов работы с ФНПБ: подбор сред и оптимальных условий для культивирования этих бактерий.
2. Выделение плазмидной и геномной ДНК из штаммов ФНПБ.
3. Поиск последовательности гена *ipt* в выделенных образцах ДНК методом ПЦР и ПЦР-РВ.
4. Анализ экспрессии гена *ipt* в различных условиях выращивания культур бактерий.
5. Определение генетического контекста гена *ipt* в геномах исследуемых штаммов ФНПБ.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Биология фототрофных пурпурных бактерий

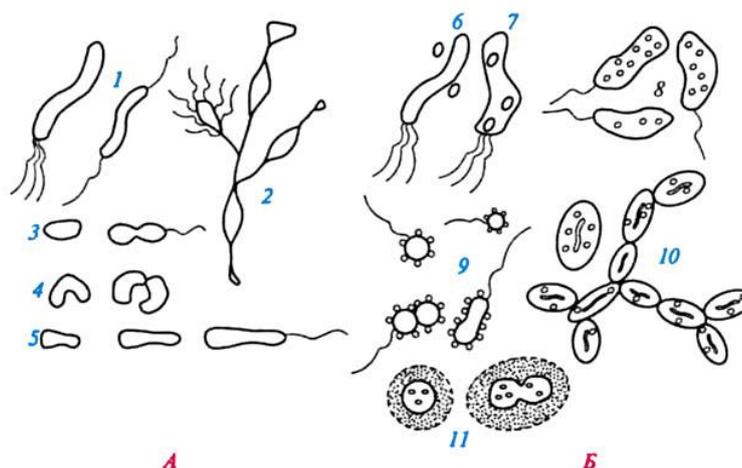
В настоящее время известно около 70 видов пурпурных бактерий, распределенных по 33 родам. Первоначально все эти микроорганизмы были разделены на два семейства, на основании их способности окислять сероводород и накапливать при этом в клетках серу. В дальнейшем они были разделены на три семейства: *Rhodospirillaceae*, *Ectothiorhodospiraceae* и *Chromatiaceae*. К первому семейству причислили пурпурные несерные бактерии, а виды, принадлежащие двум последним семействам, являются пурпурными серобактериями и способны окислять сероводород до молекулярной серы и затем использовать ее с образованием сульфатов. При этом бактерии семейства *Chromatiaceae* могут накапливать молекулярную серу в клетках, как промежуточный продукт окисления сероводорода, а представители семейства *Ectothiorhodospiraceae* выделяют серу в среду. Исключение составляет бактерия *Thiorhodospirasibirica*, семейства *Ectothiorhodospiraceae*. Эта бактерия накапливает серу в периплазматическом пространстве [Gerritse and Gottschal, 1993, Bryantseva, et al., 1999].

По морфо-физиологическим признакам пурпурные бактерии довольно разнообразная группа (рис. 3). Существуют как подвижные, так и неподвижные формы. Подвижность осуществляется за счет полярно или субполярно расположенных жгутиков. Некоторые виды имеют и латеральное расположение жгутиков, а *Rhodomicrobiumvannielii* относится к перитрихам. Размеры клеток также широко варьируют: от 0,3-0,7 мкм (представители рода *Rhodocycclus*), до 3,5-4,5 мкм (представители семейства *Chromatiaceae*). Большинство видов бактерий размножается в результате бинарного деления клетки. Лишь у представителей рода *Rhodopseudomonas* и *Rhodomicrobium* имеет место почкование.

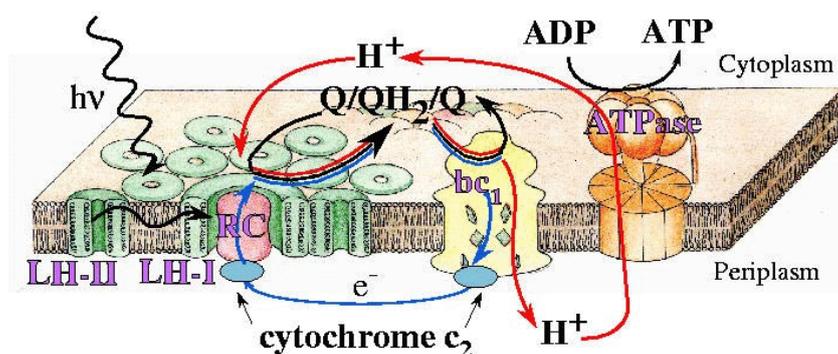
Способность пурпурных бактерий к фотосинтезу обуславливается присутствием бактериохлорофиллов а и b, длинноволновые максимумы поглощения которых находятся в инфракрасной области спектра (от 830 до 1035 нм). Помимо хлорофиллов пурпурные бактерии содержат каротиноиды [Bentley and Thiessen, 1957]. У пурпурных бактерий это в основном алифатические соединения, содержащие гидроксильные, метоксильные и (или) кетогруппы. К ним относятся спириллоксантин, родопин, родопинал, сфероиден.

Фотосинтезирующий аппарат пурпурных несерных бактерий локализован во внутрицитоплазматических мембранах (ВЦПМ) имеющих форму везикул, ламелл или трубочек (рис. 4). Фотосинтезирующий аппарат состоит из реакционного центра и содержит переносчики электронов, образующих электронтранспортную цепь. В ее состав

входят цитохромы типов с и b, убихиноны, родо- или менахиноны, а также флавины [Tholozan, et al., 1990]. Флавины пурпурных бактерий в основном находятся в форме флавинмононуклеотида (ФМН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД). Присутствуют также ферредоксины. Некоторые виды способны к синтезу цитохрома типа а.



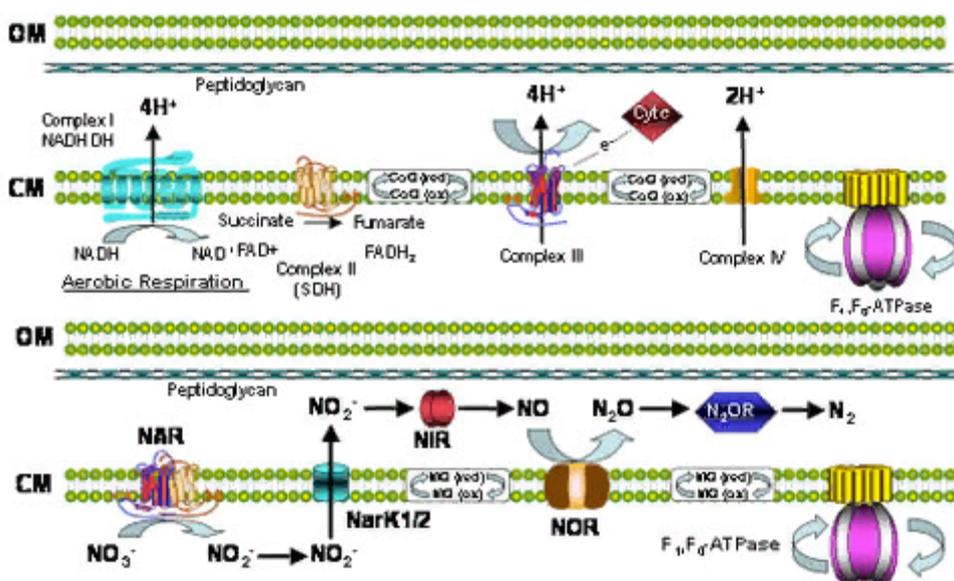
**Рисунок 3. Основные морфологические типы пурпурных бактерий.** А - несерные пурпурные бактерии: 1 - *Rhodospirillum*; 2 - *Rhodomicrobium*; 3 - *Rhodobacter sphaeroides*; 4 - *Rhodocyclus*; 5 - *Rhodopseudomonas palustris*; Б - пурпурные серобактерии: 6 - *Ectothiorhodospira*; 7 - *Thiospirillum*; 8 - *Chromatium*; 9 - *Thiocystis*; 10 - *Thiodictyon*; 11 - *Thiocapsa* [<http://medbiol.ru>]



**Рисунок 4. Фотосинтетический аппарат во внутренней цитоплазматической мембране пурпурных бактерий.** Волнообразными линиями представлена передача энергии при поглощении света светособирающими белками (LH-II и LH-I). Передача электронов через реакционный центр (RC), цитохромы c<sub>2</sub> и bc<sub>1</sub> показана синими линиями. Красными линиями представлена передача протонов в комплексе bc<sub>1</sub> и АТФазы. Химическая реакция синтеза АТФ показана черной линией [[http://www.ks.uiuc.edu/Research/quantum\\_biology/](http://www.ks.uiuc.edu/Research/quantum_biology/)].

Пурпурные несерные бактерии - аноксигенные фототрофные бактерии, растущие фототрофно в анаэробных условиях на свету. Все виды способны расти фотогетеротрофно с использованием органических субстратов как доноров электронов и материала для построения вещества клеток. Многие представители могут расти фотоавтотрофно, используя в качестве доноров электронов серу или водород. Большинство известных видов пурпурных несерных бактерий - факультативные хемотрофы. Хемогетеротрофный рост в присутствии кислорода является общим практически для всех пурпурных несерных бактерий. Но вместе с тем, некоторые виды являются чувствительными к кислороду, а другие хорошо растут и в аэробных условиях в темноте. Для некоторых видов был показан хемоавтотрофный рост [MadiganandGest, 1979].

Большинство пурпурных несерных бактерий могут расти в темноте, переключаясь с фотосинтеза на получение энергии в результате анаэробного дыхания, брожения или, чаще аэробного дыхания (рис. 5). Некоторые виды серных бактерий способны расти в темноте, не только на органических средах, но и в хемолитоавтотрофных условиях. К ним относятся *T.roseopersicina*, *Chromatium vinosum*, *C. minus*.



**Рисунок 5. Механизмы аэробного (сверху) и анаэробного (снизу) дыхания бактерий.** NAR — мембраносвязанная дыхательная нитритредуктаза, NIR — нитритредуктаза, NOR — NO редуктаза, NarK — трансмембранный транспортер [https://kullabs.com].

В случае анаэробного дыхания многие несерные бактерии используют в качестве акцепторов электронов нитраты, нитриты, азотистую окись, диметилсульфоксид (ДМСО)

или триметиламин - N - оксид (ТМАО). Единственный вид, *Rba. sphaeroides*, вначале идентифицированный как подвид *Rba. Sphaeroides f. denitrificans*, но позже отнесенный к виду *Rba. sphaeroides* была первой пурпурной несерной бактерией, для которой было показано, что она может использовать нитрат как акцептор электронов при росте в темноте в анаэробных условиях. Позднее, способность к денитрификации была показана и у некоторых других пурпурных несерных бактерий, например *Rps. palustris* и у *Rba. capsulatus*. Ни один из этих видов не может использовать нитрат как единственный источник азота, но образующийся в процессе динитрификации молекулярный азот может быть использован в качестве источника азота [Филатова, 2004].

Если отсутствуют экзогенные акцепторы электронов, пурпурные несерные бактерии переходят на сбраживание различных субстратов. Продуктами этого процесса, помимо CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub> являются различные органические кислоты [Uffen, 1978]. *Rhodospirillum rubrum* способен синтезировать сукцинат, ацетат, пропионат, формиат, CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub> в процессе сбраживания фруктозы. При брожении пирувата образуется ацетат и формиат.

У разных видов пурпурных бактерий возможности использовать различные источники углерода, часто не одинаковы. Большинство пурпурных серных бактерий и значительное число пурпурных несерных бактерий, могут расти в автотрофных условиях. Часть серобактерий, таких как *C. okenii*, *C. buderii*, *T. roseopersicina* штамм BBS являются облигатными автотрофами. Они используют небольшое число органических субстратов лишь в качестве дополнительных источников углерода [Corzo and Tatum, 1953, Kondratieva, et al., 1981].

В зависимости от условий, при которых растут пурпурные несерные бактерии, органические углеродные соединения могут выполнять различные функции. В фототрофных условиях, углеродные соединения используются, прежде всего, как источник клеточного углерода, но кроме того, могут использоваться и как источник электронов для фотосинтеза. В присутствии неорганических доноров электронов они могут фотоассимилироваться как дополнительный источник углерода. Если получение энергии происходит в результате дыхания, то большая часть углеродных соединений полностью окисляется. Окисление данных соединений происходит в результате вовлечения реакций цикла трикарбоновых кислот [Beatty and Gest, 1981].

Большинство пурпурных несерных бактерий способно использовать разнообразные органические углеродные соединения. В первую очередь это органические кислоты, являющиеся промежуточными звеньями цикла трикарбоновых кислот, ацетат и пируват. Помимо этого, рост пурпурных бактерий могут поддерживать другие органические кислоты, аминокислоты, спирты, углеводы. Многие представители способны использовать

насыщенные жирные кислоты с длиной цепи 5-18 атомов углерода. Некоторые органические соединения могут использоваться лишь малое количество видов, к примеру, цитрат используется лишь *Rps. acidophila*, *Rhodocyclus gelatinosus*, *Rba. sphaeroides*, *Rps. viridis* и *Rps. palustris*. Определенные виды могут использовать ароматические соединения, такие как, бензоат, 3-гидроксibenзоат, 4-гидроксibenзоат и 1,3,5-тригидроксibenзоат, а также фенол, дигидрокарбокислированные и метоксикарбокислированные ароматические кислоты [Филатова, 2014].

Глюкоза и фруктоза потребляется практически всеми видами пурпурных несерных бактерий. Многие виды могут расти на этих субстратах как хемотрофно, так и фототрофно, но пути использования этих углеводов могут быть различными в зависимости от условий роста. К примеру, *Rba. sphaeroides* всегда метаболизирует глюкозу через путь Энтнера-Дудорова [Conrad and Schlegel, 1977].

Ацетат ассимилируется практически всеми пурпурными несерными бактериями, при этом у пурпурных бактерий существует большое разнообразие путей использования этого соединения. У многих бактерий первичная реакция метаболизма ацетата - это АТФ зависимое формирование ацетил-СоА, который является субстратом для дальнейших реакций. У большинства пурпурных бактерий присутствуют два дополнительных фермента, необходимых для использования ацетата - малатсинтаза и изоцитратлиаза (глиоксилатный цикл). Однако у некоторых видов, таких как *Rba. sphaeroides*, *Rsp. rubrum* и других, отсутствует один из ферментов глиоксилатного цикла, изоцитратлиаза [Филатова, 2014].

Одноуглеродные соединения, такие как метанол, СО, формиат могут использоваться незначительным числом пурпурных несерных бактерий. На метаноле хорошо растут лишь представители вида *Rps. acidophila*. Очевидно, что рибулозо-бисфосфатный путь вовлечен в ассимиляцию углерода у *Rps. acidophila* во время роста на метаноле или формиате. Оба субстрата здесь выступают в качестве доноров электронов [QualeandPfenning, 1975, Sahm, et al., 1976]. *Rubrivivax gelatinosus* может расти анаэробно в темноте, используя в качестве единственного источника углерода и энергии окись углерода. В этих условиях СО трансформируется в СО<sub>2</sub> и Н<sub>2</sub>. Образующийся СО<sub>2</sub> ассимилируется далее через цикл Кальвина. *Rsp. rubrum* способен ассимилировать СО в фототрофных анаэробных условиях окисляя его до СО<sub>2</sub> посредством СО дегидрогеназы, чувствительной к кислороду [Bonam et al., 1989].

В большинстве своем пурпурные несерные бактерии не нуждаются в восстановленных соединениях серы. В качестве источника серы они могут использовать сульфат. Сульфид, даже в низких концентрациях ингибирует рост многих пурпурных

несерных бактерий. Однако некоторые виды могут использовать сульфид как донор электронов, и их толерантность к этому соединению достаточно высока. Например, *Rba. sulfidophilus* обладает высокой устойчивостью к сульфиду, которая сопоставима с таковой у *C. vinosum*. *Rm. vannielii* выдерживает концентрации сульфида 23 мМ, в то время как рост *Rba. capsulatus* полностью прекращается при концентрации 2 мМ [Hansen and Gemerden, 1972].

В отличие от серобактерий, ни один из представителей пурпурных несерных бактерий, которые могут использовать сульфид в качестве донора электронов, не накапливает элементарную серу (продукт окисления сульфида) внутри клетки. Появление внеклеточной элементарной серы - заключительный этап окисления сульфида у *Rba. sphaeroides*, *Rsp. rubrum*, *Rba. capsulatus* и у *Rsp. Mediosalinum* [Kompantseva and Gorlenko, 1984]. У видов *Rba. sulfidophilus*, *Rps. palustris*, и *Rps. sulfoviridis* сульфид окисляется до сульфата без образования в качестве промежуточного продукта элементарной серы [Neutzling, et al., 1984]. Кроме того, внеклеточная элементарная сера может являться промежуточным продуктом окисления сульфата, как это наблюдается у *Rba. veldkampii*, *Rba. adriaticus* и *Rba. euryhalinus* [Филатова, 2014].

Многие пурпурные бактерии окисляют молекулярный водород, а некоторые в качестве единственного донора электронов при фотосинтезе используют соли двухвалентного железа [Straub, et al., 1999].

Предпочтительным источником азота для большинства пурпурных бактерий является аммоний. Мочевину, аминокислоты используют некоторые виды как серных, так и несерных бактерий. Способность к ассимиляционной нитратредукции обнаружена у ограниченного числа видов (*T. roseopersicina*, *Ectothiorodospira shaposhnikovii*, *Rba. capsulatus*, *Rba. sphaeroides*). Но рост с нитратом у этих бактерий значительно хуже, чем с другими источниками азота [Кондратьева, 1996]. Ассимиляция нитратов ингибируется в присутствии ионов аммония и глутамата. Некоторые бактерии могут использовать в качестве источника азота и нитриты. Кроме того, отдельные представители способны использовать в качестве источника азота такие соединения как пептон, гидролизат казеина, различные пурины, пиримидины, а так же мочевую кислоту. В анаэробных и микроаэробных условиях, при отсутствии других источников азота большинство пурпурных бактерий могут фиксировать молекулярный азот на свету и в темноте [Winskillm, 1983]. Исключение составляют лишь некоторые виды *Chromatium*, *Thiocystis* sp. и *Rhodocyclus purpureus*.

Запасные вещества пурпурных бактерий - полифосфаты, поли-Р-гидроксибутират, у некоторых видов - глюкан типа гликогена.

Экологические ниши фототрофных  $\alpha$ -протеобактерий, те анаэробные части вод и отложений, которые получают достаточное количество света, позволяющее осуществлять фототрофный рост. Пурпурные несерные бактерии широко распространены в природе и были обнаружены в озерах, водоемах сточных вод, прибрежных лагунах и других водных средах обитания, а так же в сырых почвах и на полях. При этом, как правило, пурпурные несерные бактерии предпочитают среды с большим запасом растворенного органического материала и малой концентрацией кислорода. Практически не образуют цветные пятна, подобные тем, которые образуют серобактерии. Однако их часто обнаруживают как спутники пурпурных серных бактерий в стратифицированных матах.

Большинство пурпурных несерных бактерий были выделены из пресноводных водоемов, но так же они встречаются в морской воде, и в областях, прилегающих к гиперсолончикам. Самое большое разнообразие видов было найдено в отложениях и воде эвтрофных водоемов [Филатова, 2014].

## 1.2 Биология и генетика *Rhodobacter sphaeroides*

*Rba. sphaeroides* представляет собой палочковидную грамотрицательную пурпуровую несерную фотогетеротрофную бактерию, относящуюся к подклассу  $\alpha$ -3 протеобактерий. Как и другие виды *Rhodobacter*, бактерии *Rba. sphaeroides* способны к множеству способов роста, включая аэробное дыхание, анаэробный аноксигенный фотосинтез, ферментацию и diaзотрофный рост. Наличие таких разнообразных метаболитов предсказывает существование сложных регуляторных механизмов, используемых организмом для определения наиболее эффективных методов использования и сохранения углерода и энергии на различных средах [Mackenzie et al., 2007].

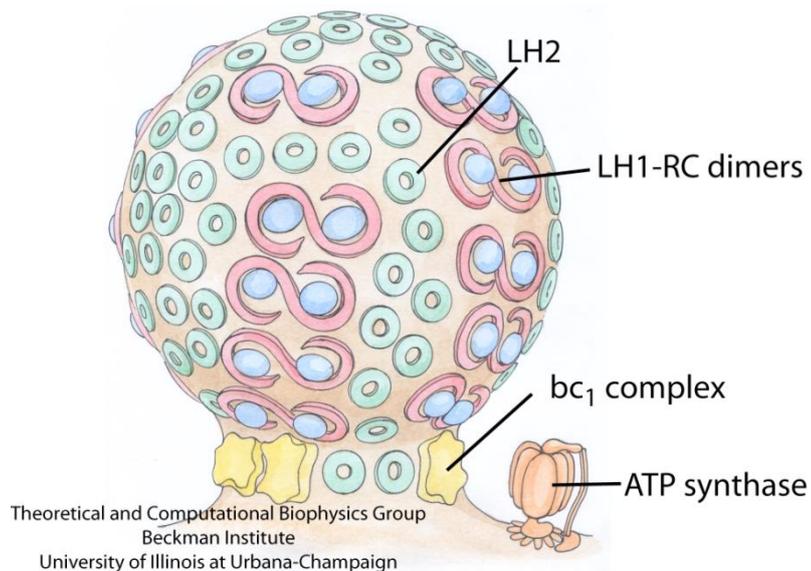
Кроме того, бактерии *Rba. sphaeroides* исследуют как потенциальный объект биотехнологии, например, их способность продуцировать  $H_2$  [Yilmaz et al, 2010, Kim et al 2007, Konturek et al, 2011], убихинон [Kien et al, 2010] и полигидроксibuтират, который может быть использован для получения биоразлагаемой пластмассы [Khatipov, 1999], а также фиксировать  $CO_2$  и  $N_2$  [Atsumi et al, 2009, Connor, 2010, Wahlund et al, 1996]. Прежде всего, *Rba. Sphaeroides* является модельным организмом для исследований аноксигенного фотосинтеза и фиксации углерода. Регуляция генов, кодирующих аппарат фотосинтеза *Rba. sphaeroides*, хорошо изучена [Pandey et al, 2017]. Изменения в содержании кислорода вызывают физиологические и морфологические адаптации, включая реконструкцию цитоплазматической мембраны. При наличии синего света, в клетке формируются мембраны, которые содержат фотосистемы. Увеличивая количество мембран в ячейке,

бактерия может более эффективно использовать имеющийся свет [Imam et al, 2013].

*Rba. sphaeroides* передвигается с помощью одного субполярного жгутика, что позволяет ему быстро и медленно вращаться в направлении против часовой стрелки или останавливаться [Mackenzie et al., 2007]. Это также первая бактерия, которая, как было обнаружено, обладает несколькими хромосомами [Suwanto, A., and S. Kaplan. 1989].

*Rba. sphaeroides* содержит две кольцевые хромосомы CI (3.19 Mb) и CII (0.94 Mb) и пять эндогенных плазмид A (0.11 Mb), B (0.11 Mb), C (0.11 Mb), D (0.10 Mb), E (0.04 Mb). Таким образом, общий размер генома составляет 4,6 Мб, а содержание G + C составляет 67,3% и 65,7% для CI и CII соответственно [Kontur et al, 2012]. Ряд важных генов *Rba. sphaeroides* распределен между двумя хромосомами. Например, один оперон рибосомной РНК (рРНК) (*rriA*) находится на CI, а два оперона rRNA (*rriB* и *rriC*) находятся на CII. CI имеет более эволюционно консервативные последовательности, чем CII. Считается, что быстрая эволюция CII способствовала метаболической универсальности этого организма [Choudhary et al, 2007]. Гены на CII кодируют продукты, которые участвуют в синтезе белков, биосинтезе аминокислот, метаболизме жирных кислот, транскрипционной регуляции, энергетическом метаболизме и структурных компонентах. Предполагается, что CII мог сформироваться либо из более крупной хромосомы, либо из плазмиды [Mackenzie et al., 2007].

В присутствии кислорода *Rba. sphaeroides* использует аэробное дыхание для выработки энергии; его цитоплазматическая мембрана содержит компоненты цепи электронного транспорта и механизмы синтеза АТФ. В анаэробных условиях на свету *Rba. sphaeroides* растет за счет фотосинтеза, но в темноте он использует цепь переноса электронов, оканчивающуюся (ТМАО)-редуктазой. *Rba. sphaeroides* использует бактериохлофилл а для его аноксигенного фотосинтетического метаболизма [Kaplan, 2005]. В отсутствие молекулярного кислорода внутренняя мембрана микроорганизма претерпевает морфологические изменения, образуя внутрицитоплазматическую мембрану (ICM) [Chidgey, et al, 2017]. В разных впячиваниях или карманах ICM находятся три пигмент-белковых комплекса фотосинтетического аппарата: (1) реакционный центр (RC), окруженный (2) светопоглощающим комплексом I (LHI), который окружен различным числом (3) светопоглощающих комплексов II (LHII) (рис. 6). Бактерия синтезирует металлотетрапирролы, которые включают бактериохлорофилл, геммы и корриноиды (витамин B12). Виды и уровень этих тетрапирролов различаются в зависимости от катаболического состояния организма. Все они синтезируются из 5-аминолевулиновой кислоты [Strümpfer, 2012].



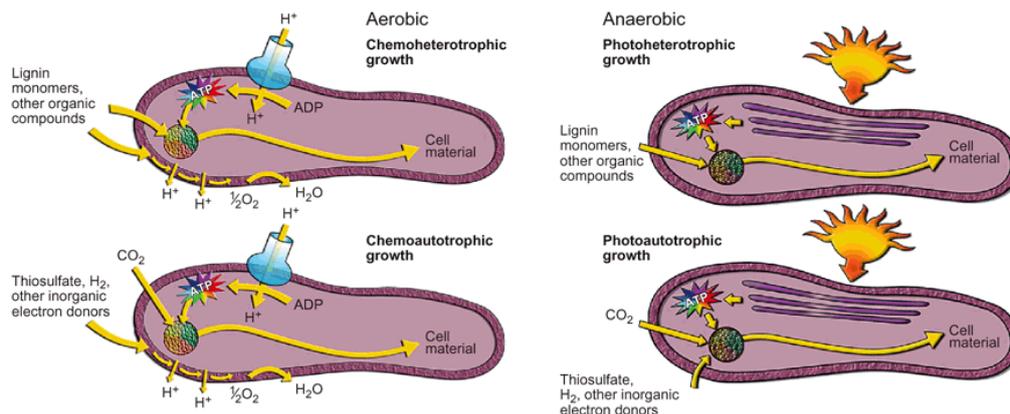
**Рисунок 6. Схема везикулярного фотосинтетического хроматофора *Rba. sphaeroides*.** Димеры LH1-RC и комплексы LH2 плотно упаковываются в пузырьки хроматофора, комплекс  $bc_1$  и АТФ-синтаза размещены вблизи шейки хроматофора [Chandler, 2008]

### 1.3 Биология и генетика *Rhodospseudomonas palustris*

*Rps. palustris* - это фототрофная несерная пурпурная бактерия, которую относят к альфа-протеобактериям. Эта бактерия обладает необычайной метаболической гибкостью и способна расти, используя любой из четырех способов метаболизма: фотоавтотрофный или фотосинтетический, фотогетеротрофный, хемогетеротрофный и хемоавтотрофный (рис. 7). *Rps. palustris* растет как без кислорода, так и в его присутствии, и использует много альтернативных форм неорганических доноров электронов, углерода и азота [Odaetal., 2003].

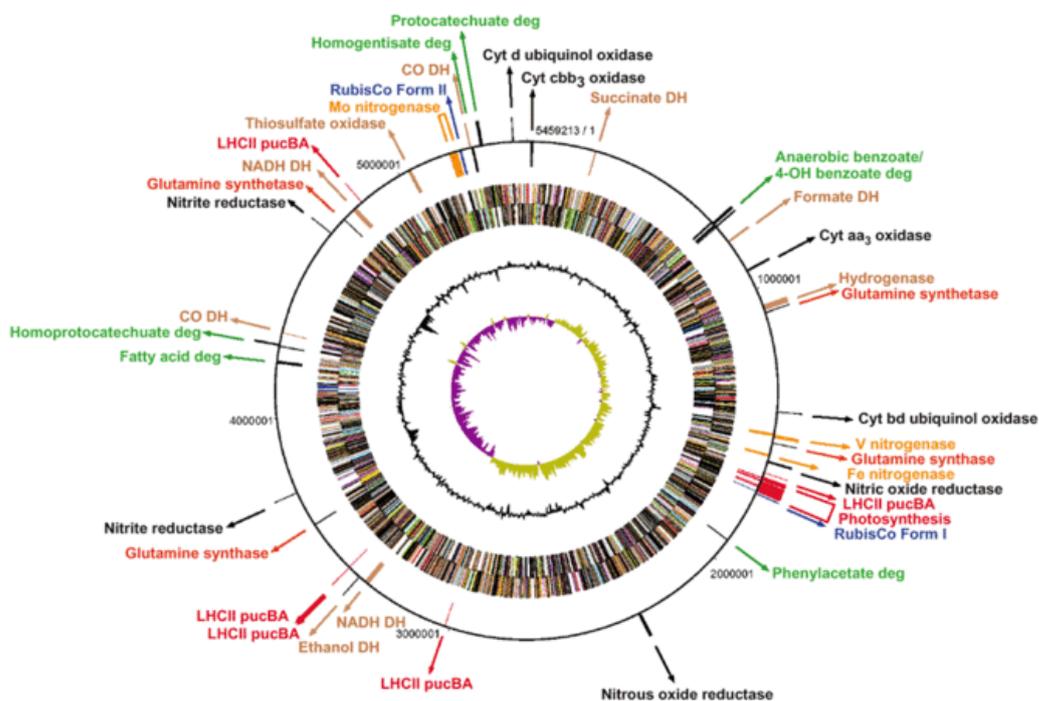
Развитие *Rps. palustris* может идти двумя основными путями. Первый - деление клеток почкованием. Этот процесс асимметричного деления клеток приводит к двум различным типам дочерних клеток - подвижной клетке и неподвижной. Второе - это дифференциация сложной системы везикул интрацитоплазматических мембран, когда клетки находятся в бескислородных условиях на свету. Мембраны нужны для размещения фотосинтетических пигментов и связанных с ними белков.

Геном *Rps. palustris* включает одну циркулярную хромосому размером в около 5,5 МБ. Он содержит значительное количество генов, связанных с энергетическим обменом, что отражает его метаболическую гибкость.



**Рисунок 7. Схематические представления о четырех типах метаболизма *Rps. palustris*.** Многоцветный круг в каждой клетке представляет собой ферментативные реакции центрального метаболизма [Larimeretal, 2004].

Описан штамм, который помимо основной хромосомы содержит кольцевую плазмиду размером около 8,4 kb. Полногеномное секвенирование этого штамма *Rps. palustris* (рис. 8) показало, что он содержит гены, отличающие его от других пурпурных бактерий, и наличие этих генов повышает возможности его использования в целях биотехнологии [Larimeretal, 2004]. К ним относятся гены, отвечающие за регуляцию фотосинтеза в ответ на изменение интенсивности света и деградацию ароматических соединений, которые часто встречаются в сельскохозяйственных и промышленных отходах. То, что в геноме присутствуют гены, кодирующие ферменты как кислород зависимо, так и независимого путей деградации ароматических колец, предполагает новые возможности для биотехнологической разработки гибридных путей деградации более широкой субстратной специфичности, чем те, которые имеются у других бактерий. *Rps. palustris* имеет хороший потенциал для использования его в качестве биокатализатора при производстве водорода. Среди пурпурных фототрофных бактерий *Rps. palustris* уникальны тем, что синтезируют ванадий-содержащую нитрогеназу, которая катализирует образование водорода в количестве примерно в три раза больше, чем молибден-содержащие нитрогеназы [Eady, 1996].



**Рисунок 8. Хромосома *Rps. palustris* штамма CGA009.**

Основные метаболические функции и расположение генов, которые их кодируют, указаны на внешнем круге. Второй круг отображает предсказанные области кодирования на плюс цепи, окрашенные по функциональным категориям: белый, гипотетическая; темно-серая, неизвестная функция; красный, репликация и репарация; зеленый, энергетический обмен; синий, углеродный и углеводный обмен; циановый, липидный обмен; пурпурный, транскрипция; желтый, трансляция; бледно-зеленый, структурные РНК; голубой, клеточные процессы; оранжевый, аминокислотный обмен; коричневый, общие предсказанные функции; розовый, метаболизм кофакторов и витаминов; светло-серый, гипотетическая консервативная; темно-зеленый, транспорт; лиловый, сигнальная трансдукция; светло-красный, пуриновый и пиримидиновый обмен. Третий круг - предсказанные области кодирования на минус цепи (та же функциональная окраска, что и на втором круге). Четвертый и пятый круг - G+C состав. Масштаб (в bp) указан вдоль внешней стороны круга [Larimeretal, 2004].

*Rps. palustris*, как и другие пурпурные фототрофные бактерии, реагирует на пониженную интенсивность света путем увеличения количества светособирающих комплексов (LH). Они состоят из  $\alpha$  и  $\beta$ -полипептидов, связанных с бактериохлорофиллом и каротиноидами, с образованием единицы, которая олигомеризуется для получения комплексов, которые передают световую энергию в реакционный центр [Cogdelletal, 1999]. *Rps. palustris* отличаются от других фототрофов тем, что у них есть несколько комплексов

LN2, которые отличаются друг от друга и поглощают свет разной длины волны [Gall, 1999].

Пурпурные фотосинтезирующие бактерии являются основным компонентом микробных популяций, обнаруженных в очистных сооружениях, подверженных воздействию солнечных лучей. *Rps. palustris* активно размножается в таких средах, потому что он метаболизирует соединения разнообразной химической структуры, из состава разлагающихся растительных и животных отходов. *Rps. palustris* способны разрушать азотсодержащие соединения, включая аминокислоты и гетероциклические ароматические соединения [Sasikala, 1998], а также дегалогенировать и деградировать хлорированные бензоаты и хлорированные жирные кислоты, которые иногда встречаются в промышленных отходах [McGrath, 1997, Eglund, 2001].

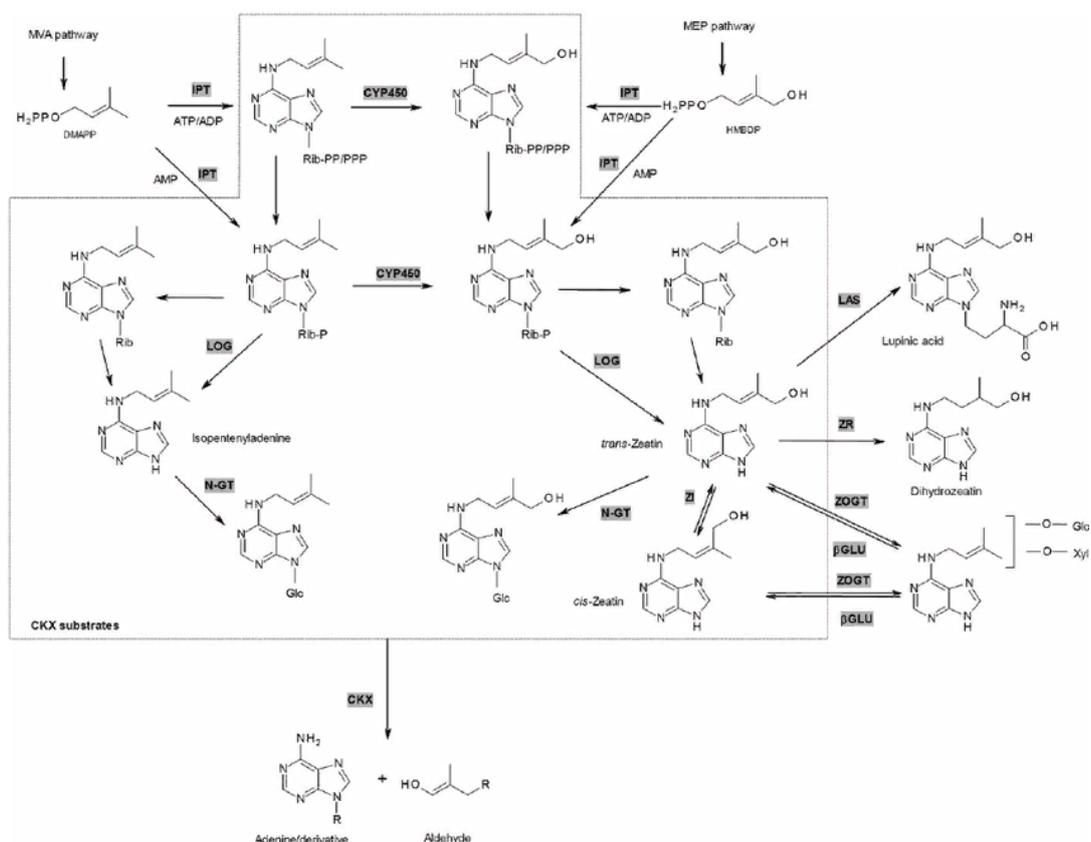
#### **1.4 Биосинтез цитокининов у прокариотических микроорганизмов**

Основные биосинтетические и метаболические пути цитокининов приведены на рисунке 1. Биосинтез изопреноидных цитокининов начинается с переноса изопреноидного остатка на аденин либо в форме нуклеотида, либо в связанной с РНК форме. Донорами изопреноидной боковой цепи, которые найдены на данный момент, являются диметилаллилпирофосфат (DMAPP) и 1-гидрокси-2-метил-2-(Е)-бутенил-дифосфат (HMBDP) [Kralletal., 2002; Sakakibaraetal., 2005]. В случае присоединения DMAPP и образования цитокинина изопентениладенинового типа боковая цепь может быть дополнительно гидроксильирована цитохром Р450 монооксигеназой [Takeietal., 2004].

Существует два типа изопентенилтрансфераз (IPT): аденилат-IPT (EC 2.5.1.27) [BlackwellandHorgan, 1993; Kakimoto, 2001; Takeietal., 2001], которые присоединяют изопентенильную группу к N6-атому АМФ, АДФ или АТФ, и тРНК-IPT (EC 2.5.1.8), действующие таким же образом на аденин в тРНК. Этот тип IPT обнаружен почти во всех живых организмах, включая бактерии [Caillet and Droogmans, 1988], дрожжи [Yevdakovaetal., 2007], животные [Golovkoetal, 2000] и растения [Golovkoetal., 2002, Miyawaki et al., 2006], исключая археи. Изопентенилирование аденина в тРНК влияет на эффективность и точность трансляции [Persson et al., 1994]. Было показано, что этот механизм улучшает трансляционное редактирование, снижая шанс неверного считывания кодона в первой позиции.

Первоначально предполагалось, что тРНК является источником цитокининов; однако расчеты показали, что такие цитокинины могут составлять не более 40% от общего числа из-за длительного периода полувыведения тРНК [Klämbt, 1992]. тРНК-IPT гомологичны аденилат-IPT, и имеют схожую структуру укладки, но они содержат

дополнительный удлиненный С-концевой домен, который участвует в связывании с тРНК [Takei et al., 2001; Zhou and Huang, 2008].



**Рисунок 9. Основные ферменты биосинтеза цитокинина.** IPT, аденилат изопентенилтрансфераза; CYP450, цитохром P450 монооксигеназа; LOG, цитокинин фосфорибогидролаза «Lonely guy»; N-GT, цитокинин N-глюкозилтрансфераза; b GLU, b-глюкозидаза; CKX, цитокининдегидрогеназа; ZOGT, зеатин-О-глюкозилтрансфераза; ZI, зеатизомераза; ZR, зеатинредуктаза, LAS, синтаза люпиновой кислоты. За выделенную область вынесены цитокинины, которые деградируют различными изоферментами цитокининдегидрогеназы [Frébert et al., 2001].

Микроорганизмы способны синтезировать кинетин, зеатин, изопентиладенин, и некоторые другие производные цитокининов. Цитокинины образуют ризобактерии (принадлежащие родам *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, и *Pseudomonas*) и некоторые стрептомицеты. Способность синтезировать цитокинины присуще мезофильным и метанотрофным бактериям (принадлежащих родам *Methylobacterium*, *Methylovorus*, *Aminobacter*, *Methylophila*, *Methyloarcula*, *Xanthobacter*, *Paracoccus*, *Blastobacter*, *Hyphomicrobium*, *Methylophylus*, *Methylobacillus*, *Methylomonas*, *Methylobacter* и *Methylosinus*). Также экзопродукты проявляющие активность

цитокининов были выделены из культуральной жидкости фототрофной пурпурной бактерии *Rhodospirillum nonsulfur*. [Tsavkelovaetal, 2006].

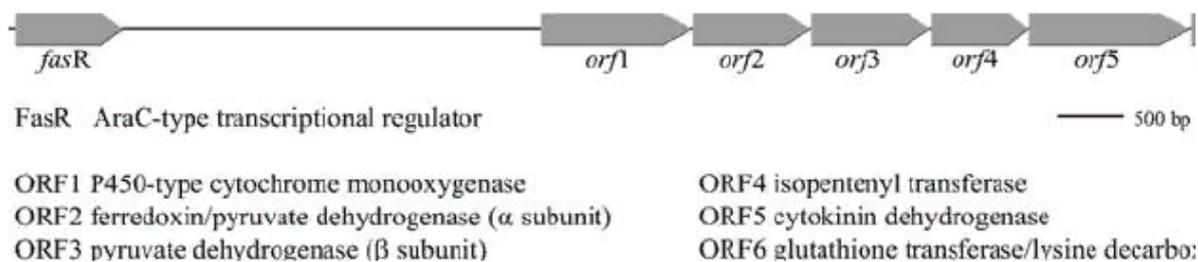
В большинстве случаев деградация тРНК приводит к образованию неактивного цис-изомера зеатина, в то время как активные транс-изомеры образуются путем биосинтеза *denovo*. *Denovo* синтез цитокининов из изопентилпирофосфата и 5'-АМФ (катализируется изопентитрансферазой) происходит в различных болезнетворных галообразующих бактериях (*Agrobacteriumtumefaciens*, *Pseudomonassyringae*, *Rhodococcusfascians*, и *Erwiniaherbicola*). В фитопатогенных бактериях, гены или комбинации генов (локализованные в Ti плаزمидах), отвечающие за биосинтез свободных цитокининов это: *ipt* и *tzs* (в *A. tumefaciens*, *Pseudomonassolanacearum*, и *P. syringaepv. savastanoi*); *ptz* (в *P. savastanoi* и *P. solanacearum*); *ipt* (в *R. fascians*); и *etz* (в *E. herbicola*) [Tsavkelovaetal, 2006].

Впервые ген биосинтеза цитокинина был идентифицирован у фитопатогенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*. Показано, что ген *tmr* (tumourmorphologyroot), расположенный в Т-ДНК (transfer) области на Ti-плазмиде (transfer), способен индуцировать опухолегенез независимо от других генов, находящихся в Т-ДНК [Lichtenstein et al., 1984]. Пример *A. tumefaciens* демонстрирует, что определенные бактериальные гены могут быть под контролем эукариотического промотора, что позволяет им экспрессироваться в клетках растения-хозяина. Проникая в клетки растения-хозяина, плазмиды обеспечивают избыточный синтез фитогормонов, и это стимулирует развитие болезни, вызванной микроорганизмом. В 1984 году была подтверждена активность аденилат изопентенилтрансферазы (IPT) - продукта гена *tmr* [Akiyoshi et al., 1984; Barry et al., 1984]. *Agrobacterium tumefaciens* содержит дополнительный ген IPT *tzs* (trans-zeatinsynthesizing), который, в отличие от *tmr*, не переносится в растительный геном, а экспрессируется в самой бактерии [Morris et al., 1993]. Белки *Tmr* и *Tzs* высоко гомологичны, но их аминокислотные последовательности, имеющие решающее значение для распознавания субстрата, отличаются от таковых у аденилат-IPT растений (Chu et al., 2010). Гены, гомологичные *tmr* и *tzs* *A. tumefaciens*, обнаружены у других бактерий рода *Agrobacterium*, *A. vitis* и *A. rhizogenes*[Takei et al., 2001], и других фитопатогенных бактерий [Kakimoto, 2003].

Гипотетические гены для аденилат-IPT также были обнаружены у *Pantoea agglomerans* [Barash and Manulis-Sasson, 2007], *Ralstonia solanacearum* (возбудитель бактериальной гнили пасленовых) и *Pseudomonas syringae*[Takei et al., 2001].

Влияние цитокининов на взаимодействие бактериального патогена с растением-хозяином было детально изучено у фитопатогенного актиномицета *Rhodococcus*

*fascians*D188 [Pertry et al., 2009]. Для обеспечения своей вирулентности бактерия использует *fas* оперон (рис. 10). Оперон кодирует шесть генов, участвующих в синтезе и деградации цитокининов, в частности, изопентенилтрансферазу, цитокининоксидазу и глутатион-с трансферазу. Предполагается, что продукты первых трех генов дают энергию для синтеза и деградации цитокинина, формируемого продуктами трех последних генов оперона: *Rhodococcus fascians* могут продуцировать и деградировать зеатин и изопентенил аденин [Francis et al., 2007].



**Рисунок 10. Схематическое изображение *fas* оперона [Francis et al., 2007].**

Предполагаемые белки, сходные с белками *Rhodococcus fascians*, были идентифицированы у многих других видов бактерий, таких как *Streptoalloteichushindustanus*, *Mycococcusxanthus*, *Saccharopolysporaerythrae*, *Herpetosiphonaurantiacus*, *Stigmatellaaurantiaca* и *Streptomycespristinaespiralis*, но поскольку нет данных об их функциональной роли, и в геномах этих организмов не были обнаружены предполагаемые гены аденилат-ИПТ, их функция остается гипотетической [Pertry et al., 2010].

Микроорганизмы демонстрируют разнообразные ответы на введение в культуру цитокининов. Например, кинетин, который не влияет на морфологию, рост и нитрогеназную активность diaзотрофных бактерий (*Azospirillum lipoferum* и *A. brasilense*), способствовал росту и развитию грамположительных и грамотрицательных бактерий родов: *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, и *Ervinia*.

Несмотря на то, что у многих прокариот (особенно у фитопатогенных), были обнаружены гены биосинтеза цитокининов, до последнего времени не было данных о наличии таковых у пурпурных бактерий, хотя они являются близкими родственниками агробактерий. Данная работа посвящена поиску гена биосинтеза цитокининов *ipt* у фототрофных несерных пурпурных бактерий *Rba. sphaeroides* 2.4.1 и *Rps. palustris*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Штаммы микроорганизмов

Штаммы микроорганизмов, использованные в работе, представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Штаммы микроорганизмов, используемые в работе**

Штамм	Источник получения штамма
<i>Rba. sphaeroides</i> 2.4.1	Prof. Niel Hunter, University of Sheffield, UK
<i>Rba. sphaeroides</i> 2.4.1	лаборатория биофизики и биохимии растительной клетки института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси
<i>Rps. palustris</i> КМ (МГУ 285)	лаборатория института фундаментальных проблем биологии РАН
<i>Rba. sphaeroides</i> 2R	лаборатория института фундаментальных проблем биологии РАН

### 2.2 Питательные среды и условия выращивания

Исследуемые штаммы пурпурных бактерий выращивали на трис-ацетатной среде ТАР с добавлением аргинина (табл. 2) при температуре 24-25°C на свету и в темноте. Клетки *E.coli* выращивали на среде LB.

**Таблица 2. Составы сред, используемых в работе**

Название среды	Состав среды (На 1 л. раствора:
ТАР	Раствор Бейеринка 25 мл, фосфатный буфер 1 мл, Tris-буфер 100 мл, ацетат натрия 2 г, раствор микроэлементов 1 мл, дрожжевой автолизат 0,4 г, агар 15 г <b>Состав раствора Бейеринка на 1л:</b> NH <sub>4</sub> Cl 16 г, MgSO <sub>4</sub> 4 г, CaCl <sub>2</sub> 2 г Состав фосфатного буфера на 100 мл: K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 9,36 г, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6,3 г Состав Tris-буфера на 1 л: Trisbase 24,2 г, HCl 15 мл <b>Состав раствора микроэлементов на 1 л:</b> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 1 г, ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O 1 г, MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O 0,4 г, CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O 0,2 г, CuSO <sub>4</sub> 0,04 г, Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O 0,2 г
LB	На 1 л: триптон 10 г, дрожжевой автолизат 5 г, NaCl 10 г, pH 7.0

## **2.3 Молекулярно-генетические методы**

### **2.3.1 Выделение плазмидной ДНК**

Для выделения плазмидной ДНК из бактериальных клеток использовали метод щелочного лизиса. Культуры бактерий в экспоненциальной фазе роста осаждали центрифугированием, промывали 200 мкл раствора "I" (50 mM Трис-НСl pH 8.0; 25 mM ЭДТА; 10% сахароза) и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Денатурацию проводили добавлением 400 мкл раствора "II", состоящего из 200 mM NaOH и 1%-ого SDS в течение 1-2 мин. Ренатурацию - на холоде в течение 10 мин добавлением 200 мкл 10 M ацетата натрия. После центрифугирования в течение 5 мин отбирали супернатант и добавляли равный объем изопропанола. ДНК осаждали центрифугированием (10 минут, максимальная скорость). Далее промывали осадок 75% этанолом, подсушивали и растворяли в TE буфере.

### **2.3.2 Выделение геномной ДНК**

Геномную ДНК из клеток исследуемых бактерий выделяли методом, основанном на использовании детергента СТАВ (cetyl trimethyl ammonium bromid). СТАВ – буфер (5 м NaCl, 0.5 MEDTA, 2 MTris-НСl) хорошо растворяет мембраны клеток. Кроме того, его применение позволяет разделить ДНК и полисахариды, поскольку они отличаются по растворимости в присутствии этого поверхностно-активного вещества. При высоких концентрациях солей нуклеиновые кислоты образуют стабильные, но вместе с тем растворимые комплексы со СТАВ.

Для выделения ДНК из клеток ФНПБ200-300 мкг их сырого веса рессуспезировали в 300-400 мкл СТАВ-буфера и фиксировали в жидком азоте. В таком виде их можно хранить при -20°C. Затем клетки в лизирующем буфере помещали на 1 час в термостатируемый шейкер при 56°C (EnviromentalShaker – IncubatorES-20/60, «BIOSAN»). Для депротеинизации к лизированным клеткам добавляли равный объем хлороформа и перемешивали 30-50 минут на ротаторе (MultiBioRS-24, «BIOSAN»). Разделение фаз проводили центрифугированием (5 минут при 5000 об/мин). При этом клеточный дебрис остается на границе фаз. Водную (верхнюю) фазу отбирали в чистую пробирку и из нее осаждали ДНК равным объемом изопропанола (1 час при комнатной температуре) с последующим центрифугированием (15 минут 15°C при максимальных оборотах). Осадок несколько раз промывали 75% этанолом, подсушивали и растворяли в 100 мкл TE буфера. При необходимости очистку повторяли.

### **2.3.3 Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ)**

ПЦР-РВ проводили на приборе АНК-32 (Институт аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург, Россия) с использованием набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green (С 110615-095, «Синтол», Москва). Использовалась *SynTaq* ДНК-полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами.

Для амплификации фрагмента гена *ipt* (394 п.н.) использовали праймеры: *ipt-F* – TCGACTGCGATAGCTCTTGCC и *ipt-R* – GCAGAGGGGCGТААСАТСТGС. Для амплификации фрагмента гена *groZ* (108 п.н.) использовали праймеры: *groZ-A* – ATCGCGGAAGAGACCCAGAG и *groZ-B* – GAGCAGCGCCATCTGATCCT.

Амплификацию проводили в режиме: 95<sup>0</sup>С – 3 мин (1 цикл); 95<sup>0</sup>С – 30 сек, 60<sup>0</sup>С – 30 сек, 72<sup>0</sup>С – 30 сек (40 циклов). ДНК-электрофорез проводили в 1,5 %-м агарозном геле (в 0,5x TAE буфере) для контроля соответствия размеров ПЦР-фрагментов ожидаемому.

### **2.3.4 Электрофорез в агарозном геле**

Разделение фрагментов ДНК осуществляли с использованием 1% агарозного геля при напряжении 100 В. В качестве буферной системы использовали TAE-буфер. Источниками питания служили приборы модели «Эльф – 4» фирмы ДНК-технология, Россия. Флуоресценцию нуклеиновых кислот наблюдали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 312 нм.

### **2.3.5 Рестрикция ДНК**

Рестрикцию плазмидной и тотальной ДНК исследуемых штаммов проводили с использованием ферментов *FastDigestSpeI* и *XbaI* фирмы Fermentas. Состав реакционной смеси указан в таблице 3.

**Таблица 3. Состав реакционной смеси для рестрикции**

Компонент	Объем (мкл)
H <sub>2</sub> O	2
10x FastDigest буфер	2
ДНК	15
FastDigest фермент	1
Итоговый объем смеси	20

Реакционную смесь инкубировали в термостате при 37<sup>0</sup>С в течение 5 минут.

Фермент инактивировали хлороформом. Далее проводили ДНК-электрофорез полученных фрагментов.

### **2.3.6 Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля**

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили с помощью центрифугирования через фильтр со стекловатой. Для осаждения ДНК к полученному осадку добавляли 5М NaCl и 90% этанол в соотношении 4:1:16 соответственно. Пробирки оставляли на -20 °С на одну ночь или инкубировали при -70 °С в течение 1 часа.

Затем ДНК осаждали центрифугированием в течение 10 минут при максимальной скорости. Далее промывали осадок 75% этанолом, подсушивали и растворяли в 100 мкл TE буфера.

### **2.3.7 Выделение РНК с помощью реагента Тризол**

Выделение РНК из бактериальных клеток проводилось с помощью реагента Тризол. Он одновременно поддерживает целостность РНК и способствует разрушению клеток и их компонентов. Клетки ресуспензировали в 750 мкл Тризола и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Для депротеинизации к лизированным клеткам добавляли равный объем хлороформа и перемешивали 10 минут на ротаторе (Multi Bio RS-24, «BIOSAN»). Разделение фаз проводили центрифугированием (12 минут 8°С при максимальных оборотах). При этом клеточный дебрис остается на границе фаз. Водную (верхнюю) фазу отбирали в чистую пробирку и из нее осаждали РНК равным объемом изопропанола (20 минут при комнатной температуре) с последующим центрифугированием (15 минут при максимальных оборотах). Осадок несколько раз промывали 75% этанолом, подсушивали и растворяли в TE буфере.

Оценка концентрации нуклеиновых кислот по оптической плотности проводилась при длине волны 260 нм на спектрофотометре bioPhotometer фирмы Eppendorf.

### **2.3.8 Обратная транскрипция**

Обратная транскрипция — это процесс образования ДНК на матрице РНК. Данный процесс называется обратной транскрипцией, так как передача генетической информации при этом происходит в «обратном», относительно транскрипции, направлении. Катализ этой реакции осуществляет обратная транскриптаза, или ревертаза - фермент РНК-зависимая ДНК-полимераза, встречающийся в природе только в ретровирусах, который переводит РНК в ДНК и, за счет этого, позволяет обнаруживать специфические РНК в биологических образцах методом ПЦР.

Реакции осуществляли следующим образом: к 2 мкл раствора РНК добавляли 2 мкл

iScriptRTSupermix фирмы Bio-Rad (содержащий обратную транскриптазу, ингибитор РНКаз, dNTPs, праймеры, MgCl<sub>2</sub>, стабилизаторы) и 6 мкл nuclease-free H<sub>2</sub>O. Далее в соответствии с протоколом фирмы производителя следовали: прайминг (5 мин при 25°C), обратная транскрипция (20 мин при 46°C), инактивация обратной транскриптазы (1-2 мин при 95°C).

### **2.3.9 Лигирование фрагментов ДНК в плазмиды**

Лигирование вектора и вставки (в соотношении 1:3) проводили при помощи ДНК-лигазы фага T4 (Thermo Scientific) в соответствии с протоколом производителя (<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EL0014>) (табл. 4).

**Таблица 4. Состав реакционной смеси для лигирования**

Компонент	Объем (мкл)
ДНК линейного вектора	5
ДНК вставки	10
10x T4 DNA Ligase буфер	2
T4 DNA Ligase фермент	0,4
H <sub>2</sub> O, nuclease-free	2,6
Итоговый объем смеси	20

Трансформацию бактериального штамма *E.coli* XL10GOLD продуктами лигазной реакции проводили по методу, описанному в пункте 2.3.10.

### **2.3.10 Трансформация клеток *E.coli***

Для трансформации использовались компетентные клетки *E.coli* XL10GOLD. К аликвоте компетентных клеток *E.coli* добавляли 2 мкл плазмидной ДНК, содержащей вектор pBluescript II KS (+) и 4 мкл 0,5 М меркаптоэтанола. Инкубировали 30 минут на льду, затем осуществляли тепловой шок (35 секунд при 42°C). После этого клетки снова инкубировали на льду 2 минуты. Далее добавляли 400 мкл жидкой среды LB и помещали на 1 час в термостатируемый шейкер на 37°C (Environmental Shaker – Incubator ES-20/60, «BIOSAN») для индукции экспрессии кодируемого плазмидой маркера устойчивости к антибиотикам. Затем трансформированные компетентные клетки переносили на чашки Петри со средой LB, содержащей ампициллин, X-gal и IPTG, и инкубировали при 37°C 12-16 часов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Освоение методов работы с ФНПБ: подбор сред и оптимальных условий для культивирования этих бактерий

Исследуемые штаммы ФНПБ *Rba. sphaeroides* 2.4.1, *Rba. sphaeroides* 2R и *Rps. palustris* выращивали на трис-ацетатной среде ТАР с добавлением аргинина в качестве источника азота при температуре 24-25°C. Штаммы выращивали в миксотрофных условиях, в темноте, на свету в присутствии кислорода и на свету аноксигенно.

Установлено, что миксотрофные условия выращивания культур являются оптимальными для роста всех исследуемых штаммов бактерий.

### 3.2 Поиск последовательности гена *ipt* в выделенных образцах ДНК методом ПЦР и ПЦР-РВ.

Плазмидная ДНК, выделенная из штамма *Rba. sphaeroides* 2.4.1, была использована для амплификации фрагмента гена интереса *ipt* (394 п.н.) с помощью ПЦР-РВ с использованием праймеров *ipt-F* и *ipt-R*. Полученные амплифицированные фрагменты разделяли методом электрофореза в агарозном геле, который показал наличие у штамма *Rba. sphaeroides* 2.4.1 фрагмента ожидаемой длины (рис.11). В дальнейшем этот ампликон был секвенирован и установлено, что его последовательность соответствует последовательности фрагмента гена *ipt*.



Рисунок 11. Гель-электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК

1. *Rba. sphaeroides* 2.4.1
2. ДНК-маркер GeneRuler 100 bp

Геном *Rba. sphaeroides* 2.4.1 секвенирован и, в соответствии с информацией, полученной из базы данных NCBI, содержит пять эндогенных плазмид: А (0.11 Mb), В (0.11 Mb), С (0.11 Mb), D (0.10 Mb) и Е (0.04 Mb), из которых В, С, и D секвенированы

полностью, а А и Е – частично.

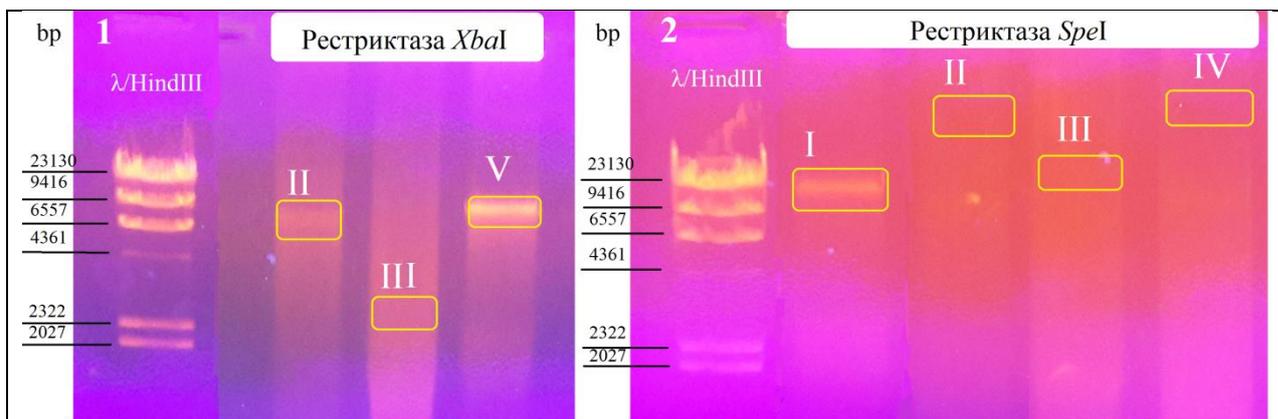
Для того чтобы сузить зону поиска фрагмента гена интереса *ipt* среди всех плазмидных ДНК, были составлены рестрикционные карты этих плазмид (с помощью программы restriction analyzer: [www.molbiotools.com/restrictionanalyzer.html](http://www.molbiotools.com/restrictionanalyzer.html)) и на их основе подобраны те ферменты рестрикции, которые имеют сайты распознавания на каждой из пяти плазмид и этих сайтов минимальное количество. Этим условиям соответствовало два фермента – *SpeI* и *XbaI* (табл. 5). В экспериментах по рестрикции были использованы ДНК штаммов *Rba. sphaeroides* 2.4.1, *Rba. sphaeroides* 2R и *Rps. palustris*.

**Таблица 5. Рестрикционный анализ плазмид штамма *Rba. sphaeroides* 2.4.1**

Фермент	Плазида	Количество сайтов рестрикции	Ожидаемые размеры фрагментов (п.н.)
<i>SpeI</i>	А	1	114045
	В	1	114179
	С	3	85403, 19872, 9
	Д	4	53502, 37642, 5891, 3792
	Е	1	37100
<i>XbaI</i>	А	1	114045
	В	1	114179
	С	3	69406, 22300, 13578
	Д	1	100827
	Е	1	37100

Была выделена плазмидная ДНК из штаммов *Rba. sphaeroides* 2.4.1, *Rba. sphaeroides* 2R и *Rps. Palustris* и геномная ДНК из штаммов *Rba. sphaeroides* 2.4.1 и *Rps. palustris*. Далее была осуществлена рестрикция полученных образцов ДНК с помощью ферментов *SpeI* и *XbaI*.

Продукты рестрикции визуализировали с помощью гель-электрофореза (рис. 12). Рестрикционные фрагменты ДНК изолировали из геля и использовали в качестве матрицы для амплификации фрагмента гена *ipt* (394 п.н.) методом ПЦР-РВ с праймерами *ipt-F* и *ipt-R* (табл. 6, рис. 13).

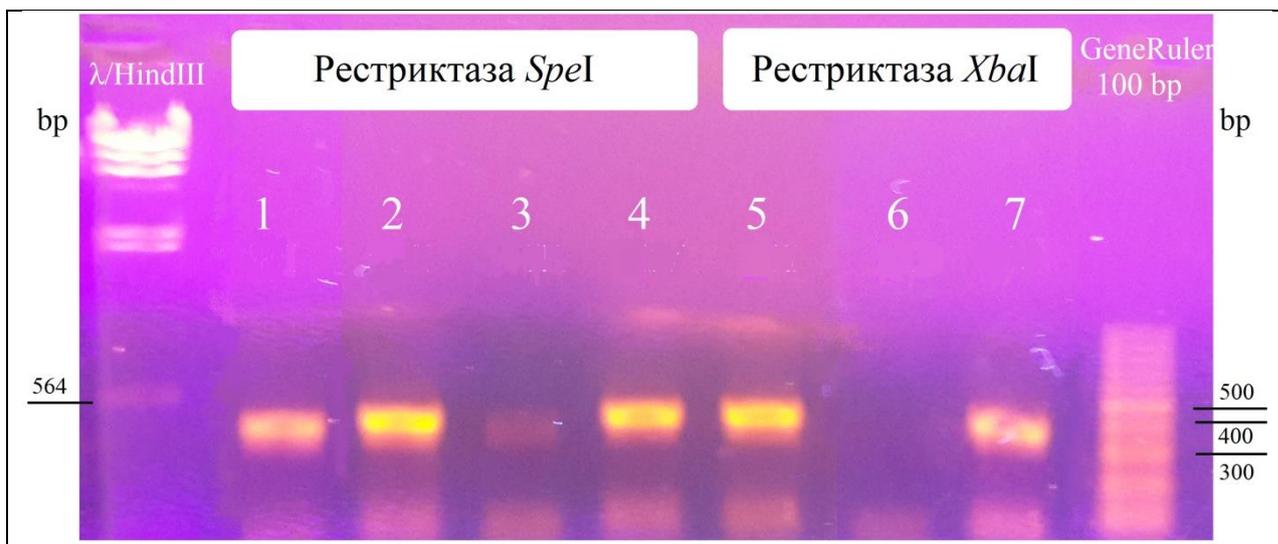


**Рисунок 12. Результаты рестрикции геномной и плазмидной ДНК штаммов *Rba. sphaeroides 2.4.1*, *Rba. sphaeroides 2R* и *Rps. palustris*, полученные с помощью геле-электрофореза.**

I – геномная ДНК *Rba. sphaeroides 2.4.1*, II – плазмидная ДНК *Rba. sphaeroides 2.4.1*, III – плазмидная ДНК *Rps. palustris*, IV – плазмидная ДНК *Rba. sphaeroides 2R*, V – геномная ДНК *Rps. palustris*;

**Таблица 6. Результаты экспериментов по рестрикции и ПЦР-РВ**

Штамм	ДНК	Фермент	№ рестрикционного фрагмента	Приблизительная длина фрагмента	Наличие фрагмента интереса	Пороговый цикл
<i>Rba. sphaeroides 2.4.1</i>	геномная	<i>SpeI</i>	1	22000	+	23,5
	плазмидная	<i>SpeI</i>	2	40000	+	23,3
		<i>XbaI</i>	5	6500	+	23,7
<i>Rps. palustris</i>	геномная	<i>XbaI</i>	7	6500	+	23,1
	плазмидная	<i>SpeI</i>	3	24000	–	32,3
		<i>XbaI</i>	6	2500	–	32,7
<i>Rba. sphaeroides 2R</i>	плазмидная	<i>SpeI</i>	4	41000	+	23,4



**Рисунок 13. Результаты ПЦР-РВ амплифицированных рестрикционных фрагментов ДНК с праймерами *ipt-F* и *ipt-R*, полученные с помощью электрофореза. Номера рестрикционных фрагментов соответствуют данным из таблицы 5.**

Таким образом, вышеописанные эксперименты позволили установить, что искомый фрагмент гена *ipt* присутствует в плазмидах штаммов *Rba. sphaeroides* 2.4.1 и *Rba. sphaeroides* 2R, однако у штамма *Rps. palustris* он обнаружен только в геномной ДНК. В случае использования рестриктазы *SpeI*, размеры фрагментов ДНК, используемых для амплификации фрагмента гена интереса, дают основание предположить, что он находится на D или E плазмидах, а в случае использования рестриктазы *XbaI* можно предполагать наличие фрагмента только в E плазмиде. Однако из-за того, что секвенирование плазмид А и Е еще не закончено, нельзя это утверждать со стопроцентной вероятностью.

### **3.3 Анализ экспрессии гена *ipt* в различных условиях выращивания культур бактерий**

Для анализа экспрессии гена биосинтеза цитокининов *ipt* в различных условиях выращивания культур бактерий, штаммы *Rba. sphaeroides* 2.4.1 и *Rps. palustris* выращивали 2 суток в полутемноте, часть культуры фиксировали. Оставшуюся культуру переносили на 2 часа на свет и в темноту. По истечении 2 часов культуры фиксировали. Также культуры выращивали 2 суток в темноте, 2 суток на свету и в условиях аноксигенного фотосинтеза.

Из полученных фиксированных культур клеток выделяли РНК и с помощью обратной транскрипции получали кДНК. Концентрацию кДНК приводили к единому значению во всех образцах равному 0,9 мкг/мкл. Далее эту кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР-РВ с праймерами к фрагменту гена *ipt* (394 п.н.) - *ipt-F* и *ipt-R* и с

праймерами к фрагменту гена *rpoZ* (108 п.н.) - *rpoZ*-А и *rpoZ*-В. Ген *rpoZ* кодирует  $\Omega$  субъединицу РНК полимеразы и используется в качестве контроля, так как его экспрессия не зависит от условий роста бактерий. Анализ экспрессии проводили методом  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  [Livak and Schmittgen, 2001]. Результаты анализа представлены на рисунке 14.

Ген биосинтеза цитокининов *ipt* экспрессируется в клетках штаммов *Rba. sphaeroides*2.4.1 и *Rps. palustris*, выращенных в миксотрофных условиях (базовые условия), и при переносе культур из базовых условий на 2 часа на свет, или в темноту. Наличие экспрессии фиксировали и в клетках, выращенных в полной темноте, на свету и в условиях аноксигенного фотосинтеза (табл. 7). Во всех случаях уровень *ipt*-транскриптов оказался выше, чем у гена «домашнего хозяйства» *rpoZ*, локализованного на хромосоме I.

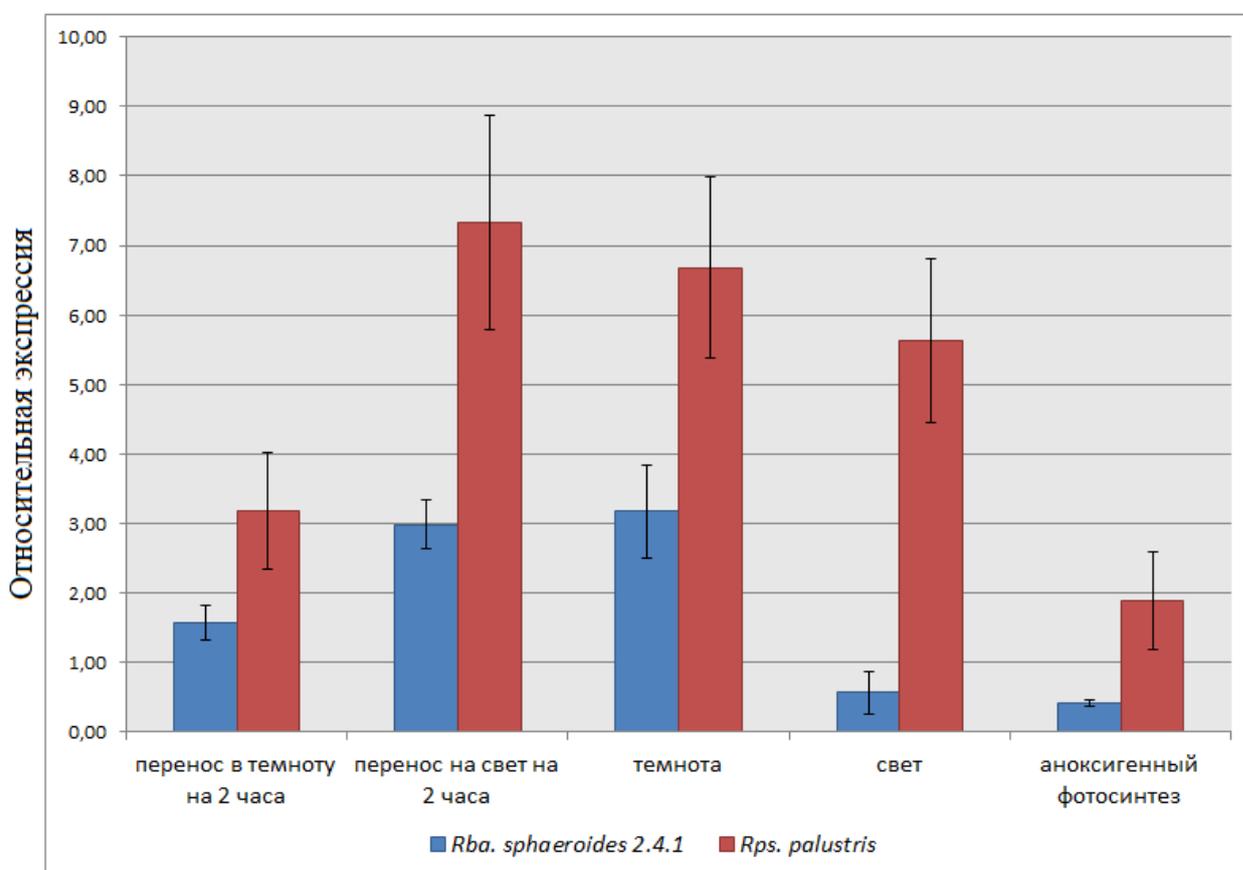
**Таблица 7. Результаты ПЦР-РВ с кДНК штаммов *Rba. sphaeroides*2.4.1 и *Rps. palustris* в качестве матрицы**

Условия	Ген	Среднее значение порогового цикла	
		<i>Rba. sphaeroides</i> 2.4.1	<i>Rps. palustris</i>
Миксотрофные	<i>ipt</i>	25,11	26,68
	<i>rpoZ</i>	31,17	31,89
Перенос в темноту на 2 часа	<i>ipt</i>	25,79	27,86
	<i>rpoZ</i>	29,91	30,62
Перенос на свет на 2 часа	<i>ipt</i>	26,12	28,36
	<i>rpoZ</i>	31,51	30,20
Темнота	<i>ipt</i>	28,00	29,48
	<i>rpoZ</i>	32,41	32,04
Свет	<i>ipt</i>	27,48	32,34
	<i>rpoZ</i>	34,45	35,07
Аноксигенный фотосинтез	<i>ipt</i>	24,70	26,20
	<i>rpoZ</i>	32,05	30,64

В случае штамма *Rba. Sphaeroides* 2.4.1, при выращивании культур бактерий на свету как в присутствии кислорода, так и без него относительный уровень экспрессии гена *ipt* был ниже, чем в миксотрофных условиях (рис. 14). При выращивании в темноте экспрессия наоборот повышалась. Перенос культур из миксотрофных условий на 2 часа в темноту и на свет ведет к индукции экспрессии гена *ipt*, причем индукция светом более

эффективна. Таким образом, экспрессия гена *ipt* подвержена световой регуляции.

В отличие от *Rba. sphaeroides* 2.4.1, было показано, что экспрессии гена *ipt* в клетках штамма *Rps. palustris* во всех проверенных условиях выращивания культур бактерий была выше базовой. То есть миксотрофные условия не являются оптимальными для синтеза этого гена. При выращивании в темноте и на свету уровень экспрессии гена *ipt* был примерно одинаков, однако в условиях аноксигенного фотосинтеза, как и в случае *Rba. sphaeroides* 2.4.1, он был заметно ниже, чем в присутствии кислорода. Так же как и в случае *Rba. sphaeroides* 2.4.1, перенос клеток штамма *Rps. palustris* из миксотрофных условий на 2 часа на свет и в темноту ведет к индукции синтеза гена *ipt*.



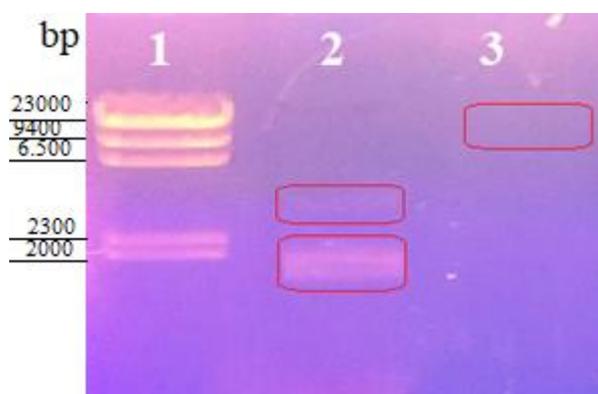
**Рисунок 14.** Относительная экспрессия мРНК штаммов *Rba. sphaeroides* 2.4.1 и *Rps. palustris*. Значение 1 по оси ординат соответствует уровню экспрессии гена *ipt* в миксотрофных (базовых) условиях.

По-видимому, для штамма *Rba. sphaeroides* 2.4.1. оптимальным условием для экспрессии гена *ipt* является выращивание его в темноте. А штамм *Rps. palustris* в присутствии кислорода и в темноте, и на свету экспрессирует ген *ipt* примерно на одном уровне. Тем не менее, для обоих штаммов показано, что он подвержен световой

регуляции.

### 3.4 Определение генетического контекста гена *ipt* в геномах исследуемых штаммов ФНПБ

Для установления генетического контекста гена была предпринята попытка лигировать один из рестрикционных фрагментов (фрагмент номер 5 из табл.6) в плазмиду pBluescript II KS (+) для его дальнейшего секвенирования. Рекомбинантную плазмиду с лигированным фрагментом ДНК использовали для трансформации бактериального штамма *E.coli* XL10GOLD (как описано в пункте 2.3.10). Из положительных клонов была выделена плазмидная ДНК и визуализирована с помощью гель электрофореза (рис. 15).



**Рисунок 15. Гель электрофорез плазмидной ДНК, выделенной из положительных клонов *E.coli*.**

1. маркер  $\lambda$ HindIII
2. pBluescript II KS (+)
3. pBluescriptIIKS (+) + встроенный фрагмент ДНК

Плазмидная ДНК, выделенная из этих положительных клонов, значительно превышала по размеру исходную плазмиду. В дальнейшем эта ДНК будет использована для секвенирования встроенного фрагмента ДНК.

Таким образом, было установлено, что в геномах ФНПБ *Rba. sphaeroides* 2.4.1 и *Rps. palustris* присутствует ген биосинтеза цитокининов *ipt* и показана его экспрессия. У фитопатогенных бактерий основная функция этого гена связана с их вирулентностью, однако функция его у пурпурных бактерий остается неясной.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Цитокинины – биологически активные вещества, которые очень широко распространены во всех царствах. Среди прокариотических микроорганизмов наличие цитокининов показано в основном для фитопатогенных бактерий, в которых их основная функция заключается в стимуляции избыточного синтеза фитогормонов у растения-хозяина. Фототрофные несерные пурпурные бактерии филогенетически близки с агро- и другими фитопатогенными бактериями, однако до недавнего времени у них не было показано наличие генов биосинтеза цитокининов. Предметом данного исследования стали штаммы ФНПБ *Rba. sphaeroides* 2.4.1, *Rba. sphaeroides* 2R и *Rps. palustris*. Были установлены оптимальные условия и подобрана среда для выращивания исследуемых культур ФНПБ. Методами рестрикционного анализа и ПЦР-амплификации удалось подтвердить наличие в геномах исследуемых штаммов фрагмента гена *ipt* длиной 364 п.н. Был проведен анализ экспрессии этого гена в различных условиях выращивания исследуемых штаммов ФНПБ: в миксотрофных условиях, в темноте, на свету в присутствии кислорода и на свету аноксигенно.

По результатам проведенной работы можно сформулировать следующие **выводы**:

1. Исследуемые штаммы *Rba. sphaeroides* 2.4.1, *Rba. sphaeroides* 2R и *Rps. palustris* оптимально растут на трис-ацетатной среде ТАР с добавлением аргинина в качестве источника азота при температуре 24-25°C в миксотрофных условиях.
2. Ген биосинтеза цитокининов *ipt* экспрессируется во всех исследуемых штаммах ФНПБ.
3. Для штамма *Rba. sphaeroides* 2.4.1. оптимальным условием для экспрессии гена *ipt* является выращивание его в темноте. Штамм *Rps. palustris* в присутствии кислорода и в темноте, и на свету экспрессирует ген *ipt* примерно на одном уровне. Для обоих штаммов показано, что ген *ipt* подвержен световой регуляции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Akiyoshi D. E. et al. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1984. – Т. 81. – №. 19. – С. 5994-5998.
2. Atsumi S., Higashide W., Liao J. C. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde //Nature biotechnology. – 2009. – Т. 27. – №. 12. – С. 1177.
3. Barash I., Manulis-Sasson S. Virulence mechanisms and host specificity of gall-forming *Pantoea agglomerans* //TRENDS in Microbiology. – 2007. – Т. 15. – №. 12. – С. 538-545.
4. Barry G. F. et al. Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1984. – Т. 81. – №. 15. – С. 4776-4780.
5. Beatty J. T., Gest H. Generation of succinyl-coenzyme A in photosynthetic bacteria //Archives of Microbiology. – 1981. – Т. 129. – №. 5. – С. 335-340.
6. Bentley R., Thiessen C. P. Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus* I. Tracer studies with C14-labeled substrates //Journal of Biological Chemistry. – 1957. – Т. 226. – №. 2. – С. 673-687.
7. Blackwell J. R., Horgan R. Cloned *Agrobacterium tumefaciens* ipt1 gene product, DMAPP: AMP isopentenyl transferase //Phytochemistry. – 1993. – Т. 34. – №. 6. – С. 1477-1481.
8. Bonam D. et al. Regulation of carbon monoxide dehydrogenase and hydrogenase in *Rhodospirillum rubrum*: effects of CO and oxygen on synthesis and activity //Journal of bacteriology. – 1989. – Т. 171. – №. 6. – С. 3102-3107.
9. Bryantseva I. et al. *Thiorhodospira sibirica* gen. nov., sp. nov., a new alkaliphilic purple sulfur bacterium from a Siberian soda lake //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1999. – Т. 49. – №. 2. – С. 697-703.
10. Caillet J., Droogmans L. Molecular cloning of the *Escherichia coli* miaA gene involved in the formation of delta 2-isopentenyl adenosine in tRNA //Journal of bacteriology. – 1988. – Т. 170. – №. 9. – С. 4147-4152.
11. Chandler D. E. et al. Intrinsic curvature properties of photosynthetic proteins in chromatophores //Biophysical journal. – 2008. – Т. 95. – №. 6. – С. 2822-2836.
12. Chidgey J. W. et al. PufQ regulates porphyrin flux at the haem/bacteriochlorophyll branchpoint of tetrapyrrole biosynthesis via interactions with ferrochelatase //Molecular microbiology. – 2017. – Т. 106. – №. 6. – С. 961-975.
13. Choudhary M. et al. Genome analyses of three strains of *Rhodobacter sphaeroides*: evidence of rapid evolution of chromosome II //Journal of bacteriology. – 2007. – Т. 189. – №. 5.

– C. 1914-1921.

14. Chu H. M., Ko T. P., Wang A. H. J. Crystal structure and substrate specificity of plant adenylate isopentenyltransferase from *Humulus lupulus*: distinctive binding affinity for purine and pyrimidine nucleotides //Nucleic acids research. – 2009. – T. 38. – №. 5. – C. 1738-1748.
15. Cogdell R. J. et al. How photosynthetic bacteria harvest solar energy //Journal of bacteriology. – 1999. – T. 181. – №. 13. – C. 3869-3879.
16. Connor M. R., Atsumi S. Synthetic biology guides biofuel production //BioMed Research International. – 2010. – T. 2010.
17. Conrad R., Schlegel H. G. Different degradation pathways for glucose and fructose in *Rhodospseudomonas capsulata* //Archives of microbiology. – 1977. – T. 112. – №. 1. – C. 39-48.
18. Corzo R. H., Tatum E. L. Biosynthesis of itaconic acid //Fed. Proc. – 1953. – T. 12. – C. 470.
19. Eady R. R. Structure– function relationships of alternative nitrogenases //Chemical reviews. – 1996. – T. 96. – №. 7. – C. 3013-3030.
20. Eglund P. G., Gibson J., Harwood C. S. Reductive, Coenzyme A-Mediated Pathway for 3-Chlorobenzoate Degradation in the Phototrophic Bacterium *Rhodospseudomonas palustris* //Applied and environmental microbiology. – 2001. – T. 67. – №. 3. – C. 1396-1399.
21. Francis I. et al. Linear plasmids and phytopathogenicity //Microbial Linear Plasmids. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2007. – C. 99-115.
22. Frébort I. et al. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation //Journal of Experimental Botany. – 2011. – T. 62. – №. 8. – C. 2431-2452.
23. Gall A., Robert B. Characterization of the different peripheral light-harvesting complexes from high-and low-light grown cells from *Rhodospseudomonas palustris* //Biochemistry. – 1999. – T. 38. – №. 16. – C. 5185-5190.
24. Gerritse J., Gottschal J.C., (1993). Oxic and anoxic growth of a new *Citrobacter* species on amino acids. Arch. Microbiol. V. -160. pp. 51–61.
25. Golovko A. et al. Cloning of a human tRNA isopentenyl transferase //Gene. – 2000. – T. 258. – №. 1. – C. 85-93.
26. Golovko A. et al. Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana* //Plant molecular biology. – 2002. – T. 49. – №. 2. – C. 161-169.
27. Hansen T. A., van Gemerden H. Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria //Archiv für Mikrobiologie. – 1972. – T. 86. – №. 1. – C. 49-56.
28. Imam S., Noguera D. R., Donohue T. J. Global insights into energetic and metabolic networks in *Rhodobacter sphaeroides* //BMC systems biology. – 2013. – T. 7. – №. 1. – C. 89.
29. Kakimoto T. Biosynthesis of cytokinins //Journal of plant research. – 2003. – T. 116. – №.

3. – C. 233-239.
30. Kakimoto T. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases // *Plant Cell Physiol.* - 2001. - Vol. 42. - P. 677-685. A.
31. Kakimoto T. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases // *Plant and Cell Physiology.* – 2001. – T. 42. – №. 7. – C. 677-685.
32. Kakimoto T. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases // *Plant and Cell Physiology.* – 2001. – T. 42. – №. 7. – C. 677-685.
33. Kamada-Nobusada T, Sakakibara H. Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry.* 2009 V. 70, N 4, P. 444-9.
34. Kaplan S. Photosynthesis genes and their expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4. 1: a tribute to my students and associates // *Discoveries in Photosynthesis.* – Springer, Dordrecht, 2005. – C. 1003-1016.
35. Khatipov E. et al. Polyhydroxybutyrate accumulation and hydrogen evolution by *Rhodobacter sphaeroides* as a function of nitrogen availability // *Biohydrogen.* – Springer, Boston, MA, 1998. – C. 157-161.
36. Kien N. B. et al. Coenzyme Q10 production in a 150-l reactor by a mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides* // *Journal of industrial microbiology & biotechnology.* – 2010. – T. 37. – №. 5. – C. 521-529.
37. Kim E. J. et al. Molecular hydrogen production by nitrogenase of *Rhodobacter sphaeroides* and by Fe-only hydrogenase of *Rhodospirillum rubrum* // *International Journal of Hydrogen Energy.* – 2008. – T. 33. – №. 5. – C. 1516-1521.
38. Klämbt D. The biosynthesis of cytokinins in higher plants: our present knowledge // *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants.* SPB Academic Publishing, The Hague, pp25-27 Google Scholar. – 1992.
39. Kompantseva E. I., Gorlenko V. M. A new species of the temperate halophilic purple bacterium *Rhodospirillum mediosalinum* sp. nov // *MIKROBIOLOGIYA.* – 1984. – T. 53. – №. 6. – C. 954-961.
40. Kondratieva E. N., Ivanovsky R. N., Krasilnikova E. N. Light and dark metabolism in purple sulfur bacteria // *Soviet Science Review.* – 1981. – T. 2. – C. 325-364.
41. Kontur W. S. et al. Pathways involved in reductant distribution during photobiological H<sub>2</sub> production by *Rhodobacter sphaeroides* // *Applied and environmental microbiology.* – 2011. – T. 77. – №. 20. – C. 7425-7429.

42. Kontur W. S. et al. Revised sequence and annotation of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4. 1 genome //Journal of bacteriology. – 2012. – T. 194. – №. 24. – C. 7016-7017.
43. Krall et al. The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP //FEBS Lett. – 2002. – Vol. 527 – P. 315-318.
44. Krall L. et al. The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP //FEBS letters. – 2002. – T. 527. – №. 1-3. – C. 315-318.
45. Larimer F. W. et al. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* //Nature biotechnology. – 2004. – T. 22. – №. 1. – C. 55.
46. Lichtenstein C. et al. Nucleotide sequence and transcript mapping of the *tmr* gene of the pTiA6NC octopine Ti-plasmid: a bacterial gene involved in plant tumorigenesis //Journal of molecular and applied genetics. – 1984. – T. 2. – №. 4. – C. 354-362.
47. Lindner A. C. et al. Isopentenyltransferase-1 (IPT1) knockout in *Physcomitrella* together with phylogenetic analyses of IPTs provide insights into evolution of plant cytokinin biosynthesis //Journal of experimental botany. – 2014. – T. 65. – №. 9. – C. 2533-2543.
48. Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method //methods. – 2001. – T. 25. – №. 4. – C. 402-408.
49. Mackenzie C. et al. Postgenomic adventures with *Rhodobacter sphaeroides* //Annu. Rev. Microbiol. – 2007. – T. 61. – C. 283-307.
50. Madigan M. T., Gest H. Growth of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* chemoautotrophically in darkness with H<sub>2</sub> as the energy source //Journal of bacteriology. – 1979. – T. 137. – №. 1. – C. 524-530.
51. McGrath J. E., Harfoot C. G. Reductive dehalogenation of halocarboxylic acids by the phototrophic genera *Rhodospirillum* and *Rhodospseudomonas* //Applied and environmental microbiology. – 1997. – T. 63. – №. 8. – C. 3333-3335.
52. Miyawaki K. et al. Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – T. 103. – №. 44. – C. 16598-16603.
53. Morris R. O. et al. Cytokinins in plant pathogenic bacteria and developing cereal grains //Functional Plant Biology. – 1993. – T. 20. – №. 5. – C. 621-637.
54. Neutzling O., Imhoff J. F., Trüper H. G. *Rhodospseudomonas adriatica* sp. nov., a new species of the Rhodospirillaceae, dependent on reduced sulfur compounds //Archives of microbiology. – 1984. – T. 137. – №. 3. – C. 256-261.

55. Oda Y. et al. Biogeography of the purple nonsulfur bacterium *Rhodopseudomonas palustris* // *Applied and environmental microbiology*. – 2003. – T. 69. – №. 9. – C. 5186-5191.
56. Pandey R., Armitage J. P., Wadhams G. H. Use of transcriptomic data for extending a model of the AppA/PpsR system in *Rhodobacter sphaeroides* // *BMC systems biology*. – 2017. – T. 11. – №. 1. – C. 146.
57. Persson B. C. et al. Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA // *Biochimie*. – 1994. – T. 76. – №. 12. – C. 1152-1160.
58. Pertry I. et al. Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – T. 106. – №. 3. – C. 929-934.
59. Pertry I. et al. *Rhodococcus fascians* impacts plant development through the dynamic fas-mediated production of a cytokinin mix // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2010. – T. 23. – №. 9. – C. 1164-1174.
60. Quale J.R., Pfenning N. (1975). Utilization of metanol by Rhodospirillaceae // *Archives of microbiology*. – 1975. – T. 102. – C. 193-198.
61. Sahm H., Cox R. B., Quayle J. R. Metabolism of methanol by *Rhodopseudomonas acidophila* // *Microbiology*. – 1976. – T. 94. – №. 2. – C. 313-322.
62. Sakakibara H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol*. 2006; 57:431-49. Review.
63. Sakakibara H. et al. *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2005. – T. 102. – №. 28. – C. 9972-9977.
64. Sasikala C., Ramana C. V. Biodegradation and metabolism of unusual carbon compounds by anoxygenic phototrophic bacteria // *Advances in microbial physiology*. – Academic Press, 1997. – T. 39. – C. 339-377.
65. Straub K. L., Rainey F. A., Widdel F. *Rhodovulum iodosum* sp. nov. and *Rhodovulum robiginosum* sp. nov., two new marine phototrophic ferrous-iron-oxidizing purple bacteria // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1999. – T. 49. – №. 2. – C. 729-735.
66. Strümpfer J., Schulten K. Excited state dynamics in photosynthetic reaction center and light harvesting complex 1 // *The Journal of chemical physics*. – 2012. – T. 137. – №. 6. – C. 065101.
67. Suwanto A., Kaplan S. Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: presence of two unique circular chromosomes // *Journal of Bacteriology*. – 1989. – T. 171. – №. 11. – C. 5850-5859.

68. Takei K. et al. AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis* // *Plant and Cell Physiology*. – 2004. – Т. 45. – №. 8. – С. 1053-1062.
69. Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana* // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Т. 276. – №. 28. – С. 26405-26410.
70. Taller B. J., Murai N., Skoog F. Endogenous cytokinins in the ribosomal RNA of higher plants // *Plant physiology*. – 1987. – Т. 83. – №. 4. – С. 755-760.
71. Tholozan J. L. et al. Propionate metabolism in a methanogenic enrichment culture. Direct reductive carboxylation and acetogenesis pathways // *FEMS microbiology ecology*. – 1990. – Т. 6. – №. 4. – С. 291-297.
72. Timothy J. Strabala, Sebastian Y. Bednarek, Gregory Bertoni, and Richard M. Amasino. Isolation and characterization of an ipt gene from the Ti plasmid Bo542 *Mol Gen Genet* (1989) 216:388-394
73. Tsavkelova E. A. et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review // *Applied biochemistry and microbiology*. – 2006. – Т. 42. – №. 2. – С. 117-126.
74. Uffen R. L., Clayton R. K., Siström W. R. Fermentative metabolism and growth of photosynthetic bacteria // *The photosynthetic bacteria*. Plenum Press, New York. – 1978. – С. 857-872.
75. Wahlund T. M., Conway T., Tabira F. R. Bioconversion of CO<sub>2</sub> to Ethanol and Other Compounds // *PREPRINTS OF PAPERS-AMERICAN CHEMICAL SOCIETY DIVISION FUEL CHEMISTRY*. – 1996. – Т. 41. – С. 1403-1406.
76. Winkler N. Tricarboxylic acid cycle activity in relation to itaconic acid biosynthesis by *Aspergillus terreus* // *Microbiology*. – 1983. – Т. 129. – №. 9. – С. 2877-2883.
77. Woese C.R. On the evolution of cells // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2002. – Vol. 13. – P. 8742–8747.
78. Yevdakova N. A., von Schwartzberg K. Characterisation of a prokaryote-type tRNA-isopentenyltransferase gene from the moss *Physcomitrella patens* // *Planta*. – 2007. – Т. 226. – №. 3. – С. 683-695.
79. Yilmaz L. S. et al. Electron partitioning during light-and nutrient-powered hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* // *BioEnergy Research*. – 2010. – Т. 3. – №. 1. – С. 55-66.
80. Zhou C., Huang R. H. Crystallographic snapshots of eukaryotic dimethylallyltransferase acting on tRNA: insight into tRNA recognition and reaction mechanism // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Т. 105. – №. 42. – С. 16142-16147.
81. Алексеева В.В., Рукавцова Е.Б., Шутова Т.В., Хоробрых А.А., Бурьянов Я.И.

- Физиолого-биохимические особенности растений табака с агробактериальным геном изопентенилтрансферазы // Физиология растений. – 2000. – №47. – С. 408-415.
82. Кондратьева Е. Н. Автотрофные прокариоты. – М. : Изд-во Моск. ун-та, 1996.
83. Лутова Л.А., Павлова З.Б., Иванова М.М. Агробактериальная трансформация как способ изменения гормонального метаболизма у высших растений: (Обзор) // 1998, Генетика. Т. 34, №2. С. 165-182.
84. Сердюк О.П., Л.Д. Смольгина, А.С. Бутанаев, Г.Н. Ширшикова, Н.В. Ярцева, Е.М. Чекунова. Ген биосинтеза цитокининов *ipt* у фототрофных пурпурных бактерий *Rhodobacter sphaeroides* и *Rhodospseudomonas palustris* // Генетика, 2017, – Том 53. – № 10. – С. 1179-1186.
85. Романов. Г. А. Как цитокинины действуют на клетку Физиология растений 2009, Т.56, № 2, С.295-319.
86. Филатова Л. В. Механизм ассимиляции ацетата у пурпурных несерных бактерий, не имеющих глиоксилатного шунта : дис. – М. : МГУ им. МВ Ломоносова. Биол. фак., 2004.