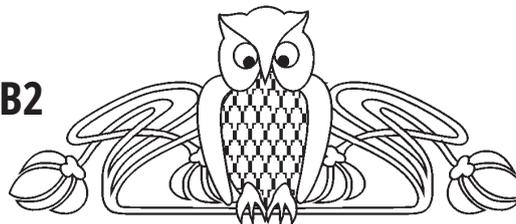




Научная статья
УДК 577.114.083

Активность липополисахарида типового штамма *Azospirillum palustre* B2 в отношении проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.)



Н. К. Кондюрина^{1,2}✉, Ю. П. Федоненко^{1,2}, Е. Н. Сигида², С. А. Коннова^{1,2}

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

²Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН), Россия, 410049, г. Саратов, пр. Энтузиастов, д. 13

Кондюрина Наталья Кирилловна, ¹студент кафедры биохимии и биофизики, ²лаборант лаборатории биохимии, natasha.kondyurina@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2975-6066>

Федоненко Юлия Петровна, кандидат биологических наук, доцент, ¹доцент кафедры биохимии и биофизики, ²заведующий лабораторией биохимии, fedonenko_yu@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0255-8190>

Сигида Елена Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии, sigida_e@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9223-4589>

Коннова Светлана Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, ¹заведующий кафедрой биохимии и биофизики, ²ведущий научный сотрудник, konnovasa@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9607-8173>

Аннотация. Липополисахарид – основной структурный компонент внешней мембраны грамотрицательных бактерий, который может также входить в состав экстраклеточных полимерных субстанций. Липополисахариды бактерий, стимулирующих рост и развитие растений, относятся к группе молекул, формирующих микроб-ассоциированный молекулярный паттерн (microbe-associated molecular pattern, MAMP). Эти гликоконъюгаты симбиотических, равно как и фитопатогенных бактерий, индуцируют активацию иммунных реакций у растений. Однако уровень ответного отклика растений при воздействии липополисахаридов симбионтов существенно отличается, в том числе благодаря их структурным особенностям, позволяющим обходить или ослаблять реакции врожденного фитоиммунитета. Мы приводим результаты анализа ответных реакций проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. после воздействия липополисахарида ассоциативных бактерий *Azospirillum palustre* B2(T). Инкубация проростков пшеницы в присутствии липополисахарида *A. palustre* B2 приводила к активации ростовых процессов растений, выражающейся в увеличении длины побегов, корней, площади первого листа, а также изменению содержания пигментов в листьях.

Ключевые слова: растительно-бактериальная ассоциация, *Azospirillum palustre*, липополисахарид, стимуляция роста

Для цитирования: Кондюрина Н. К., Федоненко Ю. П., Сигида Е. Н., Коннова С. А. Активность липополисахарида типового штамма *Azospirillum palustre* B2 в отношении проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2024. Т. 24, вып. 1. С. 67–75. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2024-24-1-67-75>, EDN: DILUUQ

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Effect of *Azospirillum palustre* B2 lipopolysaccharide on wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.)

Н. К. Kondyurina^{1,2}✉, Yu. P. Fedonenko^{1,2}, E. N. Sigida², S. A. Konnova^{1,2}

¹Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

²Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS) 13 Entuziastov Ave., Saratov 410049, Russia

Natalya K. Kondyurina, natasha.kondyurina@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2975-6066>

Yulia P. Fedonenko, fedonenko_yu@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0255-8190>

Elena N. Sigida, sigida_e@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9223-4589>

Svetlana A. Konnova, konnovasa@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9607-8173>



Abstract. Lipopolysaccharide is the main structural component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, which can also be a part of extracellular polymeric substances. Lipopolysaccharides of bacteria that stimulate the growth and development of plants belong to the group of molecules that form a microbe-associated molecular pattern (MAMP). These glycoconjugates of both symbiotic and phytopathogenic bacteria induce the activation of immune responses in plants. However, the level of plant response under the influence of symbiotic lipopolysaccharides differs significantly, also due to their structural features, which make it possible to bypass or weaken the reactions of innate autoimmunity. In this paper, we present the results of the analysis of the reactions of wheat seedlings *Triticum aestivum* L. after incubation with lipopolysaccharide of associative bacteria *Azospirillum palustre* B2(T). Incubation of wheat seedlings in the presence of *A. palustre* B2 lipopolysaccharide for three days led to the activation of plant growth processes, namely an increase in the length of shoots, roots, the area of the first leaf, and a change in the content of pigments in the leaves.

Keywords: plant-bacterial association, *Azospirillum palustre*, lipopolysaccharide, growth stimulation

For citation: Kondyurina N. K., Fedonenko Yu. P., Sigida E. N., Konnova S. A. Effect of *Azospirillum palustre* B2 lipopolysaccharide on wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2024, vol. 24, iss. 1, pp. 67–75 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2024-24-1-67-75>, EDN: DILUUQ

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

Введение

Почвенные азотфиксирующие бактерии рода *Azospirillum* вступают в ассоциативный симбиоз с широким кругом растений, включая кормовые и хлебные злаки. Стимулирующее действие на рост и развитие растений азоспириллы оказывают не столько благодаря фиксации атмосферного азота, сколько активному синтезу фитогормонов (ауксинов, гиббериллинов) и ряда других физиологически активных метаболитов [1, 2]. Среди последних следует отметить гликополимеры поверхности бактериальной клетки: секретируемые в окружающую среду экстраклеточные полисахариды, сохраняющие связь с клеткой капсульные полисахариды и локализованные во внешней мембране липополисахариды (ЛПС) [3, 4]. Эти биополимеры способны индуцировать у растений защитные реакции системной устойчивости, направленные против стрессоров различной природы [4]. Спектр и интенсивность подобных защитных реакций растения могут различаться, что, возможно, связано с отсутствием у непатогенных штаммов специфических сигнальных молекул [5, 6].

Для ЛПС нескольких штаммов *Azospirillum* spp. была продемонстрирована способность индуцировать деформацию корневых волосков у проростков пшеницы [7–9]. При этом механизм действия ЛПС неизвестен, но увеличение площади всасывания корневых волосков способствует активизации поступления питательных веществ и воды в проростки и, следовательно, их росту и развитию.

Обработка корневой системы проростков пшеницы ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 (10 мкг/мл) увеличивала в клетках меристемы корней митотический индекс (в 1,8 раза) и содержание пролиферативного антигена инициалей (при-

близительно в 1,4 раза), что было сопоставимо с эффектами, получаемыми при инокуляции бактериями (в 2 и 1,4 раза соответственно), а также увеличивала длину и сухой вес корней и побегов проростков (в 1,3, 2,2 и в 1,2, 1,3 раза соответственно) [10]. Также ЛПС штамма Sp245 влиял на морфогенетическую активность клеток каллуса пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и выход как морфогенных каллусов, так и растений-регенерантов [11].

Сравнительный анализ действия ЛПС трех штаммов *A. brasilense* SR55, *A. brasilense* SR75 и *A. lipoferum* SR65 [12] на каллусы двух различающихся по своей морфогенной активности линий *T. aestivum* L. (LRht-B1c и LRht-B1a) выявил наибольший стимулирующий эффект ЛПС *A. lipoferum* SR65 на морфогенез каллуса и развитие регенерантов у обеих линий пшеницы, в то время как ЛПС *A. brasilense* SR55 и SR75 увеличивали либо только формирование морфогенных каллусов, либо только – растений-регенерантов. При этом ЛПС *Azospirillum* spp. влияли на слабоморфогенную линию LRht-B1a сильнее, чем на высокоморфогенную линию LRht-B1c [13].

Было показано, что инокуляция *A. baldaniorum* Sp245 снижала уровень супероксид аниона приблизительно на 30 % в корнях проростков пшеницы, в отличие от обработанных папаином бактериальных клеток штамма Sp245, заметно увеличивающих продукцию супероксида всеми тканями растений. В то же время обработка проростков ЛПС этого же штамма в течение 24 ч (50 и 100 мкг/мл) не влияла на характер продукции O_2^- [14].

В работе Vallejo-Ochoa с соавт. было показано, что обработка *in vitro* проростков пшеницы ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 (100 мкг/мл) через 4 суток вызывала увеличение содержания супероксид аниона и перекиси водорода в корнях,



а также уменьшение содержания хлорофилла *b* в листьях. Ответные реакции растений полностью ингибировались при добавлении в систему ЛПС–растение проантоцианидина B2 (5 мкг/л) – фенольного соединения растительного происхождения, обладающего способностью связывать ЛПС [15].

Кроме того, обработка различными концентрациями ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 (от 10 до 1000 мкг/мл) приводила к стимулированию роста проростков пшеницы, о чем свидетельствовало значительное увеличение длины листьев и корней, а также веса в свежем виде, сопоставимого наблюдаемому при инокуляции гомологичными бактериями. Показано, что параллельное действие салицилгидроксамовой кислоты, ингибитора активности пероксидазы, и лантан-индуцированной блокады кальциевых каналов либо этиленгликольтетрауксусной кислоты снижали активность общей пероксидазы и рост растений, индуцированный ЛПС [16]. Следовательно, активность общей пероксидазы и уровень Ca^{2+} участвуют в опосредованной ЛПС биологической активности в отношении проростков пшеницы.

Данные этих работ свидетельствуют об активации ответных реакций растений после распознавания ЛПС азоспирилл, в том числе

задействованных в регуляции роста растений. Однако большая часть этих исследований выполнена на эндофитном штамме *A. baldaniorum* Sp245, одном из наиболее изученных представителей азоспирилл. Следует отметить, что в непосредственном контакте с растением задействована наиболее варибельная часть молекулы ЛПС – О-антиген, ориентированный в окружающую среду. Особенности структуры О-антигенов позволили разделить азоспириллы на три серогруппы. *A. baldaniorum* Sp245 отнесен к серогруппе I, для представителей которой характерны линейные D-рамнанные О-антигены [12]. В данной работе мы приводим результаты анализа ответных реакций проростков пшеницы (*T. aestivum* L.) на воздействие ЛПС, выделенного из кислых торфяников штамма бактерий *Azospirillum palustre* B2(T) [17] и отнесенного к серогруппе III, О-антиген которого представлен разветвленной цепью из четырёх моносахаридных остатков в повторяющемся звене (рис. 1) с тремя остатками α-L-рамнозы в основной цепи, причем один из них нестехиометрически ацелирован, и остатком β-D-глюкозы в боковой цепи [18]. Актуальность исследований также обусловлена наличием некоторых генетических и фенотипических признаков *A. palustre* B2 перспективных для использования в биоремедиации [17].

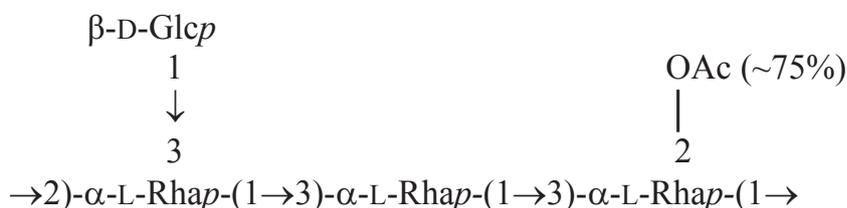


Рис. 1. Структура повторяющегося звена О-антигена *A. palustre* B2 [18]

Fig. 1. The structure of the repeating unit of the *A. palustre* B2 O-antigen [18]

Материалы и методы

В работе использован типовой штамм микроорганизмов *A. palustre* B2 (IBPRM 633), предоставленный Коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibprp.ru>). Бактерии культивировали в жидкой минеральной среде с малатом натрия и хлоридом аммония в качестве источников углерода и азота соответственно [19] при 30°C до окончания экспоненциальной фазы роста. Клетки осаждали центрифугированием на Allegra X-30R (3700 g, 30 мин, «Beckman Coulter», США),

промывали трехкратно 0,15 М раствором NaCl и высушивали ацетоном. Из ацетонового порошка биомассы бактериальных клеток горячим 45%-ным водным фенолом экстрагировали ЛПС по модифицированному методу Вестфала без разделения слоев [20]. Экстракт освобождали от фенола диализом против H_2O , концентрировали на вакуумном роторном испарителе Laborota 4000 («Heidolph», Германия), а затем осаждали примесные белки и нуклеиновые кислоты подкислением 40%-ной трихлоруксусной кислотой до конечного значения pH 2,7 с последующим центрифугированием (3700 g, 30 мин). Экстракт



диализовали против деионизированной воды, концентрировали и лиофильно высушивали с использованием Benchtop 2K («VirTis», США).

Концентрацию в ЛПС углеводов, белка, нуклеиновых кислот, состав жирных кислот и моносахаридный состав определяли с использованием методов, описанных в работе [19]. Макромолекулярную организацию ЛПС подтверждали методом электрофореза в полиакриламидном геле (12%) в денатурирующих условиях с последующей визуализацией нитратом серебра после периодатного окисления [21, 22]. Принадлежность к серогруппе III подтверждали методом двойной радиальной иммунодиффузии и иммуноферментным анализом с использованием кроличьих поликлональных антител, полученных к различным ЛПС азоспирилл ранее [12].

Объектом исследования являлись проростки пшеницы (*T. aestivum* L.) сорта Саратовская 58, любезно предоставленные сотрудниками ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока». Зерновки пшеницы заливали водой для набухания на 30 мин, промывали раствором детергента, тщательно отмывали водой, обрабатывали 30 с 80%-ным этиловым спиртом, после чего выдерживали в 0,1%-ном растворе диоксида (смесь этанолртутихлорида и *N*-цетилпиридиния хлорида) 7 мин, от которого зерновки многократно отмывали стерильной водой. Дальнейшие эксперименты проводились в асептических условиях. Стерилизованные зерновки раскладывали в чашки Петри на поверхности плотной питательной среды LB и проращивали при 25 °C в термостате. Трехсуточные этиолированные проростки переносили в контейнеры для культивирования с жидкой средой Фареуса [23]. Проростки выращивали в гидропонных условиях при постоянной температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 10-часовом темном периоде, относительной влажности 60% и освещенности 8000 лк.

В культуральную среду опытных шестисуточных проростков добавляли ЛПС *A. palustre* B2(T) в конечной концентрации 125 мкг/мл. В качестве контроля использовали необработанные растения. В качестве индикаторов биологического действия ЛПС на ранних стадиях онтогенеза пшеницы использовали морфометрические показатели опытных растений через 24 ч инкубации с гликополимером. Измерение содержания хлорофиллов и каротиноидов в первом настоящем листе производили по методу, описанному в работе [24]. Площадь поверхности первого настоящего листа определяли с использованием приложения Petiole [25]. У проростков фиксиро-

вали длину coleoptilya, побега, корней, первого настоящего листа (мм); количество корней; массу сырых побегов и корней (г). Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием программы Excel 2007 (Microsoft Corp., США). В каждом варианте опыта (в трех повторностях) анализировали не менее 10 растений. Доверительные интервалы даны для 95% надежности. Средние значения сравнивали с помощью *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Для изучения биоэффекторной активности ЛПС *A. palustre* B2 в отношении проростков пшеницы произведено выделение данного гликополимера из биомассы бактерий, культуру которых выращивали до окончания экспоненциальной фазы роста. Использование модифицированного метода Вестфалля для экстракции ЛПС из ацетонового порошка бактериальных клеток позволило выделить высокомолекулярный препарат, содержащий преимущественно молекулы S-формы, что подтверждено методом электрофореза в ПААГ.

Данные электрофоретического анализа, выявление в препарате маркерных компонентов ЛПС – 3-дезоксид-*D*-манно-окт-2-улозоновой кислоты (кетодезоксиоктоновой кислоты, Kdo) и 3-гидроксилированных жирных кислот, а также моносахаридный состав и иммунохимический перекрест с антисыворотками к ЛПБК штамма *A. lipoferum* Sp59b, свидетельствующий о принадлежности культуры бактерий к серогруппе III, позволяет говорить об идентичности вновь полученного препарата ЛПС исследованному нами ранее [18].

Анализ активности ЛПС *A. palustre* B2 в отношении шестисуточных проростков пшеницы проводили в условиях стерильности. На каждом этапе работы с растительным материалом (отбор зерновок, проращивание, перенос в контейнеры для растений) отбирались неповрежденные, без признаков бактериального и грибного заражения проростки. При постановке эксперимента мы вносили ЛПС в культуральную жидкую среду Фареуса до конечной концентрации 125 мкг/мл. Данная концентрация была подобрана эмпирически, как наиболее оптимальная для индукции фиксируемых ответных реакций растения без признаков чрезмерного стрессирования. Для проростков мягкой яровой пшеницы на данном этапе развития характерны активный рост корне-



вой системы, завершение формирования первого настоящего листа и достижение им максимально возможной площади. Изменение морфологических, физиологических и биохимических параметров под воздействием ЛПС фиксировали через 24 ч после инокуляции ЛПС.

Результаты измерений морфометрических параметров проростков пшеницы приведены в таблице. У опытных растений был отмечен значительный прирост биомассы (в среднем на

20%) в сравнении с контрольной группой. Длина coleoptily, корней и количество корней были сопоставимы для растений, как выращенных в присутствии ЛПС, так и в интактной группе. Следует отметить, что у инокулированных растений отмечалось статистически значимое увеличение таких показателей, как длина побегов и первого настоящего листа приблизительно на 42 и 64% соответственно, а также площади поверхности первого листа приблизительно на 58%.

Морфометрические показатели семидневных проростков пшеницы *T. aestivum* L. сорта Саратовская 58
Table. Morphometric parameters of wheat seven-day-old seedlings of *T. aestivum* L. cv. Saratovskaya 58

Параметр проростка / Parametr	Вариант / Variant	
	ЛПС/LPS <i>A. palustre</i> B2(T)	Контроль / Reference
Длина побега, мм / Shoot length, mm	133,4 ± 9,2*	94,0 ± 17,6
Длина coleoptily, мм / Coleoptile length, mm	28,7 ± 4,6	27,9 ± 2,6
Длина первого листа, мм / First sheet length, mm	107,0 ± 11,2*	65,3 ± 16,9
Площадь первого листа, см ² / Area of the first sheet, cm ²	5,7 ± 0,8*	3,6 ± 1,0
Длина корней, мм / Root length, mm	51,5 ± 19,0	38,2 ± 15,8
Количество корней, шт / Number of roots, pcs	3,0 ± 0,7	3,3 ± 0,5
Сырая масса побега, г / Raw weight of the shoot, g	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Сырая масса корня, г / Raw weight of the root, g	0,2 ± 0,05	0,14 ± 0,02

Примечание. * – отмечены достоверные отличия от контроля.
Note. * – marked significant differences from the control.

В стрессовых условиях, в том числе и при воздействии МАМР, растения генерируют активные формы кислорода, которые могут вызывать окислительные повреждения различных соединений в клетках. Одной из физиологических ответных реакций растения является изменение содержания основных пигментов, участвующих в фотосинтезе. Результаты определения содержания хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и каротиноидов в первом настоящем листе проростков пшеницы через сутки инкубации в питательной среде в присутствии ЛПС исследуемого штамма, а также соотношение суммарного содержания хлорофиллов *a* и *b* к каротиноидам представлены на рис. 2.

Следует отметить, что инкубация в присутствии ЛПС через сутки индуцировала снижение содержания пигментов в листьях проростков пшеницы. Анализ данных продемонстрировал, что увеличение отношения содержания суммы хлорофиллов *a* и *b* к каротиноидам по отно-

шению к контролю совпадает с уменьшением отношения содержания хлорофилла *a* к *b* и наоборот. Можно предполагать, что наблюдаемые изменения являются следствием запуска реакций неспецифического иммунного ответа после распознавания О-антигена и последующей адаптации растений.

Природа индукции ростовых процессов у растения под воздействием ЛПС неизвестна, но можно предположить, что молекулы ЛПС распознаются рецепторами растительных клеток [26], после чего запускается каскад биохимических реакций, которые приводят к включению защитных и компенсаторных механизмов. При учёте специфики полученных результатов можно говорить об индукции роста растяжением под воздействием гормонов ауксинового ряда с дальнейшим увеличением вегетативных органов проростков. Подобное предположение согласуется с данными, полученными другими исследователями [15, 16, 27, 28].

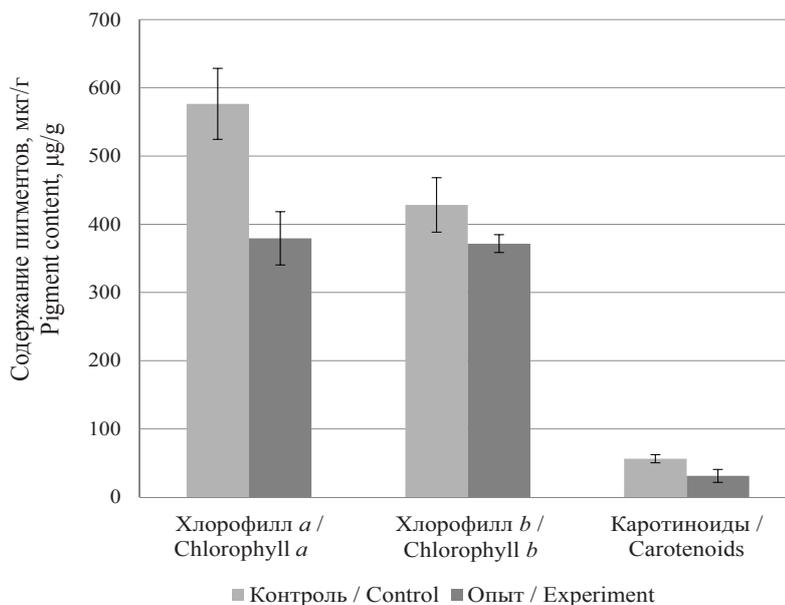


Рис. 2. Содержание пигментов в первых настоящих листьях интактных семидневных проростков пшеницы (*T. aestivum* L. сорта Саратовская 58) и при инкубации с ЛПС *A. palustre* B2 («*» – отмечены достоверные отличия от контроля)

Fig. 2. The content of pigments in the first true leaves of intact 7-day-old wheat seedlings (*T. aestivum* L. cv. Saratovskaya 58) and after incubation with LPS of *A. palustre* (B2 “*” – marked significant differences from the control)

Заключение

Азоспириллы на протяжении многих лет являются модельным объектом для изучения феномена ассоциативного симбиоза. В то же время среди представителей р. *Azospirillum* присутствуют штаммы, выделенные из биотопов, в которых либо отсутствуют высшие растения, либо доминируют не типичные для данных бактерий растения (водоросли, мхи и т.д.), для которых выявление симбиотических реакций вызывает определенный интерес с точки зрения выяснения механизма растительно-микробного взаимодействия без выраженного влияния коэволюции. Выделенный из метан-обогащенного верхового торфяника с преобладанием сфагнома *A. palustre* B2(T) синтезирует S-форму ЛПС, который, как было показано ранее, по структуре липида А сходен с другими *Azospirillum* spp. Особенности структуры повторяющегося звена O-антигена и наличие серологических перекрестов позволили отнести *A. palustre* B2(T) к серогруппе III азоспирилл. При инкубации проростков пшеницы *T. aestivum* L. в присутствии ЛПС *A. palustre* B2 были зафиксированы ответные реакции растений, заключающиеся в активации ростовых процессов, а также изменении уровня основных

пигментов в листьях, свидетельствующие об активации реакций системной устойчивости. Учитывая способность штамма *A. palustre* B2 к азотфиксации, стимулирующий характер действия его поверхностных гликополимеров на физиологические параметры растений, а также способность метаболизировать метанол и формиаат, можно рекомендовать его использование в качестве компонента комплексных биопрепаратов для ликвидации последствий разливов и отходов газового конденсата и метанола в газовой промышленности.

Список литературы

1. Cunha E. T. da, Pedrolo A. M., Arisi A. C. M. Effects of sublethal stress application on the survival of bacterial inoculants: A systematic review // Arch. Microbiol. 2023. Vol. 205, iss. 5. Article number 190. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03542-8>
2. Bhadrecha P., Singh S., Dwibedi V. ‘A plant’s major strength in rhizosphere’: The plant growth promoting rhizobacteria // Arch. Microbiol. 2023. Vol. 205. Article number 165. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03502-2>
3. Rodríguez-Navarro D. N., Dardanelli M. S., Ruíz-Sáinz J. E. Attachment of bacteria to the roots of higher plants // FEMS Microbiol. Lett. 2007. Vol. 272, iss. 2. P. 127–136. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00761.x>



4. Федоненко Ю. П., Коннова С. А., Сигида Е. Н. Гликополимеры ассоциативных микроорганизмов: фундаментальные и прикладные аспекты / под ред. В. В. Игнатова. Саратов : Изд-во Саратов. ун-та, 2018. 128 с.
5. Raaijmakers J. M., Vlami M., De Souza J. T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002. Vol. 81. P. 537–547. <https://doi.org/10.1023/A:1020501420831>
6. Gureeva M. V., Gureev A. P. Molecular Mechanisms determining the role of bacteria from the genus *Azospirillum* in plant adaptation to damaging environmental factors // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24, iss. 11. Article number 9122. <https://doi.org/10.3390/ijms24119122>
7. Федоненко Ю. П., Егоренкова И. В., Коннова С. А., Игнатов В. В. Участие липополисахаридов азоспирилл в взаимодействии с поверхностью корней пшеницы // *Микробиология*. 2001. Т. 70, № 3. С. 384–390.
8. Boyko A. S., Konnova S. A., Fedonenko Yu. P., Zdorovenko E. L., Smol'kina O. N., Kachala V. V., Ignatov V. V. Structural and functional peculiarities of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* SR55 isolated from the roots of *Triticum durum* // *Microbial. Res.* 2011. Vol. 166. P. 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.01.002>
9. Sigida E., Shashkov A., Shelud'ko A., Zdorovenko E., Toukach P. V., Konnova S., Fedonenko Yu., Knirel Yu. Structural studies of O-specific polysaccharide(s) and biological activity toward plants of the lipopolysaccharide from *Azospirillum brasilense* SR8 // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. Vol. 126. P. 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.229>
10. Evseeva N. V., Matora L. Y., Burygin G. L., Dmitrienko V. V., Shchyogolev S. Y. Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharide on the functional activity of wheat root meristematic cells // *Plant Soil*. 2011. Vol. 346. P. 181–188. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0808-9>
11. Evseeva N. V., Tkachenko O. V., Burygin G. L., Matora L. Y., Lobachev Y. V., Shchyogolev S. Y. Effect of bacterial lipopolysaccharides on morphogenetic activity in wheat somatic calluses // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. Vol. 34, iss. 3. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2386-3>
12. Fedonenko Y. P., Sigida E. N., Konnova S. A., Ignatov V. V. Structure and serology of O-antigens of nitrogen-fixing rhizobacteria of the genus *Azospirillum* // *Russ. Chem. Bull.* 2015. Vol. 64, iss. 5. P. 1024–1031. <https://doi.org/10.1007/s11172-015-0971-x>
13. Tkachenko O. V., Burygin G. L., Evseeva N. V., Fedonenko Y. P., Matora L. Y., Lobachev Y. V., Shchyogolev S. Y. Morphogenesis of wheat calluses treated with *Azospirillum* lipopolysaccharides // *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 2021. Vol. 147. P. 147–155. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02114-2>
14. Méndez-Gómez M., Castro-Mercado E., Alexandre G., García-Pineda E. Oxidative and antioxidative responses in the wheat-*Azospirillum brasilense* interaction // *Protoplasma*. 2016. Vol. 253. P. 477–486. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0826-1>
15. Vallejo-Ochoa J., López-Marmolejo M., Hernández-Esquivel A. A., Méndez-Gómez M., Suárez-Soria L. N., Castro-Mercado E., García-Pineda E. Early plant growth and biochemical responses induced by *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings are attenuated by pro-cyanidin B2 // *Protoplasma*. 2018. Vol. 255. P. 685–694. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1180-2>
16. Hernández-Esquivel A. A., Castro-Mercado E., Valencia-Cantero E., Alexandre G., García-Pineda E. Application of *Azospirillum brasilense* lipopolysaccharides to promote early wheat plant growth and analysis of related biochemical responses // *Front. Sustain. Food Syst.* 2020. Vol. 4. Article number 579976. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.579976>
17. Tikhonova E. N., Grouzdev D. S., Kravchenko I. K. *Azospirillum palustre* sp. nov., a methylotrophic nitrogen-fixing species isolated from raised bog // *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.* 2019. Vol. 69, iss. 9. P. 2787–2793. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003560>
18. Сигида Е. Н., Гринёв В. С., Здоровенко Э. Л., Дмитриенко А. С., Бурьгин Г. Л., Кондюрина Н. К., Коннова С. А., Федоненко Ю. П. Характеристика структуры и генов биосинтеза O-антигенов *Azospirillum zeae* N7(T), *Azospirillum melinis* TMCY 0552(T) и *Azospirillum palustre* B2(T) // *Биоорг. химия*. 2022. Т. 48, № 3. С. 302–312. <https://doi.org/10.31857/S0132342322030174>
19. Konnova S. A., Makarov O. E., Skvortsov I. M., Ignatov V. V. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum*-wheat root interactions // *FEMS Microbiol. Lett.* 1994. Vol. 118. P. 93–99. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06809.x>
20. Кульшин В. А., Яковлев А. П., Аваева С. Н., Дмитриев Б. А. Улучшенный метод выделения липополисахаридов из грамотрицательных бактерий // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 1987. № 5. С. 44–46.
21. Hitchcock P. J., Brown T. M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stain polyacrylamide gels // *J. Bacteriol.* 1983. Vol. 154. P. 269–277. <https://doi.org/10.1128/jb.154.1.269-277.1983>
22. Tsai C. M., Frasch C. E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1982. Vol. 119. P. 115–119. [https://doi.org/10.1016/0165-022X\(93\)90024-I](https://doi.org/10.1016/0165-022X(93)90024-I)
23. Коннова С. А., Скворцов И. М., Макаров О. Е., Прохорова Р. Н., Рогова Т. А., Игнатов В. В. Полисахаридные комплексы выделяемые *Azospirillum brasilense* и их возможная роль во взаимодействии бактерий с корнями пшеницы // *Микробиология*. 1995. Т. 64, № 6. С. 762–768.
24. Wellburn A. R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using



various solvents with spectrophotometers of different resolution // *J. Plant Physiol.* 1994. Vol. 144. P. 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

25. Дорофеева М. М., Бонецкая С. А. Сравнительный анализ некоторых классических и современных методик определения площади листовой поверхности // *Растительные ресурсы.* 2020. Т. 56, № 2. С. 182–192. <https://doi.org/10.31857/S0033994620020041>
26. Luo X., Wu W., Liang Y., Xu N., Wang Z., Zou H., Liu J. Tyrosine phosphorylation of the lectin receptor-like kinase LORE regulates plant immunity // *EMBO J.* 2020. Vol. 39, iss. 4. Article number e102856. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102856>
27. Bashan Y., Singh M., Levanony H. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation // *Can. J. Bot.* 1989. Vol. 67, iss. 8. P. 2429–2434. <https://doi.org/10.1139/b89-312>
28. Вологон В. В., Димова С. Б., Мамчур А. Е. Особенности взаимоотношений бактерий рода *Azospirillum* с растениями картофеля, культивируемыми *in vitro* // *Сільськогосподарська мікробіологія.* 2005. № 3. С. 19–25.

References

1. da Cunha E. T., Pedrolo A. M., Arisi A. C. M. Effects of sublethal stress application on the survival of bacterial inoculants: A systematic review. *Arch. Microbiol.*, 2023, vol. 205, iss. 5, article number 190. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03542-8>
2. Bhadrecha P., Singh S., Dwibedi V. 'A plant's major strength in rhizosphere': The plant growth promoting rhizobacteria. *Arch. Microbiol.*, 2023, vol. 205, article number 165. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03502-2>
3. Rodríguez-Navarro D. N., Dardanelli M. S., Ruíz-Saínz J. E. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007, vol. 272, iss. 2, pp. 127–136. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00761.x>
4. Fedonenko Yu. P., Konnova S. A., Sigida E. N. *Гликополимеры ассоциативных микроорганизмов: фундаментальные и прикладные аспекты. Под ред. В. В. Игнатова* [Ignatov V. V., ed. Glycopolymers of associative microorganisms: Fundamental and applied aspects]. Saratov, Saratov State University Publ., 2018. 128 p. (in Russian).
5. Raaismakers J. M., Vlami M., De Souza J. T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, vol. 81, pp. 537–547. <https://doi.org/10.1023/A:1020501420831>
6. Gureeva M. V., Gureev A. P. Molecular Mechanisms determining the role of bacteria from the genus *Azospirillum* in plant adaptation to damaging environmental factors. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, iss. 11, article number 9122. <https://doi.org/10.3390/ijms24119122>
7. Fedonenko Y. P., Egorenkova I. V., Konnova S. A., Ignatov V. V. Involvement of the lipopolysaccharides of azospirilla in the interaction with wheat seedling roots. *Microbiology*, 2001, vol. 70, pp. 329–334 (in Russian). <https://doi.org/10.1023/A:1010411629428>
8. Boyko A. S., Konnova S. A., Fedonenko Yu. P., Zdorovenko E. L., Smol'kina O. N., Kachala V. V., Ignatov V. V. Structural and functional peculiarities of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* SR55 isolated from the roots of *Triticum durum*. *Microbiol. Res.*, 2011, vol. 166, pp. 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.01.002>
9. Sigida E., Shashkov A., Shelud'ko A., Zdorovenko E., Toukach P. V., Konnova S., Fedonenko Yu., Knirel Yu. Structural studies of O-specific polysaccharide(s) and biological activity toward plants of the lipopolysaccharide from *Azospirillum brasilense* SR8. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, vol. 126, pp. 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.229>
10. Evseeva N. V., Matora L. Y., Burygin G. L., Dmitrienko V. V., Shchyogolev S. Y. Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharide on the functional activity of wheat root meristematic cells. *Plant Soil*, 2011, vol. 346, pp. 181–188. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0808-9>
11. Evseeva N. V., Tkachenko O. V., Burygin G. L., Matora L. Y., Lobachev Y. V., Shchyogolev S. Y. Effect of bacterial lipopolysaccharides on morphogenetic activity in wheat somatic calluses. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, vol. 34, iss. 3. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2386-3>
12. Fedonenko Y. P., Sigida E. N., Konnova S. A., Ignatov V. V. Structure and serology of O-antigens of nitrogen-fixing rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. *Rus. Chem. Bull.*, 2015, vol. 64, iss. 5, pp. 1024–1031. <https://doi.org/10.1007/s11172-015-0971-x>
13. Tkachenko O. V., Burygin, G. L., Evseeva, N. V., Fedonenko Y. P., Matora L. Y., Lobachev Y. V., Shchyogolev S. Y. Morphogenesis of wheat calluses treated with *Azospirillum* lipopolysaccharides. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 2021, vol. 147, pp. 147–155. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02114-2>
14. Méndez-Gómez M., Castro-Mercado E., Alexandre G., García-Pineda E. Oxidative and antioxidative responses in the wheat-*Azospirillum brasilense* interaction. *Protoplasma*, 2016, vol. 253, pp. 477–486. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0826-1>
15. Vallejo-Ochoa J., López-Marmolejo M., Hernández-Esquivel A. A., Méndez-Gómez M., Suárez-Soria L. N., Castro-Mercado E., García-Pineda E. Early plant growth and biochemical responses induced by *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings are attenuated by procyandin B2. *Protoplasma*, 2018, vol. 255, pp. 685–694. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1180-2>
16. Hernaández-Esquivel A. A., Castro-Mercado E., Valencia-Cantero E., Alexandre G., García-Pineda E. Application of *Azospirillum brasilense* lipopolysaccharides to promote early wheat plant growth and analysis of related biochemical responses. *Front. Sustain. Food Syst.*, 2020, vol. 4, article number 579976. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.579976>
17. Tikhonova E. N., Grouzdev D. S., Kravchenko I. K. *Azospirillum palustre* sp. nov., a methylotrophic nitrogen-fixing species isolated from raised bog.



- Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.*, 2019, vol. 69, iss. 9, pp. 2787–2793. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003560>
18. Sigida E. N., Grinev V. S., Zdorovenko E. L., Dmitrenok A. S., Burygin G. L., Kondurina N. K., Konnova S. A., Fedonenko Y. P. O-Antigens of *Azospirillum zaeae* N7 (T), *Azospirillum melinis* TMCY 0552 (T), and *Azospirillum palustre* B2 (T): Structure elucidation and analysis of biosynthesis genes. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2022, vol. 48, iss. 3, pp. 519–528 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S1068162022030177>
 19. Konnova S. A., Makarov O. E., Skvortsov I. M., Ignatov V. V. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum*-wheat root interactions. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1994, vol. 118, pp. 93–99. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06809.x>
 20. Kulshin V. A., Yakovlev A. P., Avaeva S. N., Dmitriev B. A. An improved method for the isolation of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 1987, no. 5, pp. 44–46 (in Russian).
 21. Hitchcock P. J., Brown T. M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stain polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 154, pp. 269–277. <https://doi.org/10.1128/jb.154.1.269-277.1983>
 22. Tsai C. M., Frasch C. E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 1982, vol. 119, pp. 115–119. [https://doi.org/10.1016/0165-022X\(93\)90024-I](https://doi.org/10.1016/0165-022X(93)90024-I)
 23. Konnova S. A., Skvortsov I. M., Makarov O. E., Prokhorova R. N., Rogova T. A., Ignatov V. V. Polysaccharide complexes isolated by *Azospirillum brasilense* and their possible role in the interaction of bacteria with wheat roots. *Microbiology*, 1995, vol. 64, no. 6, pp. 762–768 (in Russian).
 24. Wellburn A. R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.*, 1994, vol. 144, pp. 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
 25. Dorofeeva M. M., Bonetskaya S. A. Comparative analysis of some classical and modern methods for determining the area of the leaf surface. *Plant Resources*, 2020, vol. 56, no. 2, pp. 182–192 (in Russian). <https://doi.org/10.31857/S0033994620020041>
 26. Luo X., Wu W., Liang Y., Xu N., Wang Z., Zou H., Liu J. Tyrosine phosphorylation of the lectin receptor-like kinase LORE regulates plant immunity. *EMBO J.*, 2020, vol. 39, iss. 4, article number e102856. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102856>
 27. Bashan Y., Singh M., Levanony H. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. *Can. J. Bot.*, 1989, vol. 67, iss. 8, pp. 2429–2434. <https://doi.org/10.1139/b89-312>
 28. Volkogon V. V., Dimova S. B., Mamchur A. E. Features of the relationship of bacteria of the genus *Azospirillum* with potato plants cultivated *in vitro*. *Agricultural Microbiology*, 2005, no. 3, pp. 19–25 (in Russian).

Поступила в редакцию 08.09.2023; одобрена после рецензирования 07.11.2023; принята к публикации 17.11.2023
The article was submitted 08.09.2023; approved after reviewing 07.11.2023; accepted for publication 17.11.2023