

Научная статья
УДК 579.222:579.64
doi: 10.28983/asj.y2022i2pp75-81

Характеристика нового штамма *Agrobacterium tumefaciens* 32, выделенного из эпифитного микробоценоза *Oryza sativa* L.

Алла Ивановна Якубовская¹, Ирина Алексеевна Каменева¹, Ян Викторович Пухальский², Татьяна Валерьевна Матвеева³, Максим Владимирович Гритчин¹

¹ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», г. Симферополь, Россия, e-mail: yakubovskaya_alla@mail.ru

²ФГБУН «Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук» – Санкт-Петербургский институт информатики и автоматизации Российской академии наук (СПИИРАН), г. Санкт-Петербург, Россия, e-mail: puhalskyan@gmail.com

³Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Россия, e-mail: radishlet@yahoo.com.

Аннотация. Изучена генетическая структура штамма diaзотрофных бактерий, выделенного из эпифитного сообщества растений риса посевного (*Oryza sativa* L.). Штамм был идентифицирован как *Agrobacterium tumefaciens* 32 и депонирован в ВКСМ под инвентарным номером RCAM04326. Представлены результаты изучения свойств штамма, включающие в себя оценку нитрогеназной активности в чистой культуре (549,7 нмоль C₂H₄/мл/ч), продукцию индолилмолочной кислоты (ИМК) на уровне 229,6 нг/мл, а также его стимулирующее действие на развитие корневой системы у бобовых (на 15–31 %) и зерновых культур (на 8–23 %). Результаты филогенетического анализа показали отсутствие Ti-плазмид в структуре генома нового штамма, что характеризует его как непатогенный.

Ключевые слова: ассоциативные микроорганизмы; плазида; ростстимуляция; *Agrobacterium tumefaciens*; *Oryza sativa* L.

Для цитирования: Якубовская А. И., Каменева И. А., Пухальский Я. В., Матвеева Т. В., Гритчин М. В. Характеристика нового штамма *Agrobacterium tumefaciens* 32, выделенного из эпифитного микробоценоза *Oryza sativa* L. // Аграрный научный журнал. 2023. № 2. С. 75–81. <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2022i2pp75-81>.

AGRONOMY

Original article

Characteristic of a new strain *Agrobacterium tumefaciens* 32 isolated from epiphytic microbocenosis *Oryza sativa* L.

Alla I. Yakubovskaya¹, Irina A. Kameneva¹, Jan V. Puhalsky², Tatiana V. Matveeva³, Maxim V. Gritchyn¹

¹FSBSI “Scientific Research Institute of Agriculture of Crimea”, Simferopol, Russia, e-mail: yakubovskaya_alla@mail.ru

²St. Petersburg Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences - St. Petersburg Institute for Informatics and Automation of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia, e-mail: puhalskyan@gmail.com

³St. Petersburg University, St. Petersburg, Russia, e-mail: radishlet@yahoo.com

Abstract. The study of genetic structure of a strain of diazotrophic bacteria isolated from the epiphytic community of rice plants (*Oryza sativa* L.) was carried out. The strain was identified as *Agrobacterium tumefaciens* 32 and deposited with VKSM under accession number RCAM04326. The results of studying the properties of the strain are given, including the assessment of nitrogenase activity in pure culture (549.7 nmol C₂H₄/ml/hour), the production of indolyl lactic acid (IMA) at the level of 229.6 ng/ml, as well as a stimulating effect on the development of the root system in legumes. crops (by 15-31%) and cereals (by 8-23%). The results of phylogenetic analysis showed the absence of Ti-plasmids in the genome structure of the new strain, which characterizes it as non-pathogenic.

Keywords: associative microorganisms; plasmid; growth stimulation; *Agrobacterium tumefaciens*; *Oryza sativa* L.

For citation: Yakubovskaya A. I., Kameneva I. A., Puhalsky Ja. V., Matveeva T. V., Gritchyn M. V. Characteristic of a new strain *Agrobacterium tumefaciens* 32 isolated from epiphytic microbocenosis *Oryza sativa* L. Agrarnyy nauchnyy zhurnal = Agrarian Scientific Journal. 2023;(2):75–81. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2022i2pp75-81>.





Введение. В настоящее время в рамках концепции органического земледелия экологически безопасным и экономически выгодным агроприемом для возделывания сельскохозяйственных культур является внесение в ризосферу растений активных полифункциональных бактерий. Данный метод позволяет создавать растительно-микробные симбиосистемы, что обеспечивает стабильность прохождения всех фаз онтогенеза для культуры, а также способствует улучшению качества конечной товарной продукции [7].

Из таксономического разнообразия бактерий, используемых для интродукции в ризосферу различных сельскохозяйственных культур, широкое применение находят агробактерии рода *Rhizobium*. Данная группа бактерий встречается практически во всех известных типах почв, ризосфере и ризоплане растений. В зависимости от своего вида они оказывают как положительное, так и отрицательное воздействие на растение [1]. Так, штаммы *Agrobacterium radiobacter*, выделенные из ризопланы овощных культур, активно продуцируют физиологически активные вещества [4] и трансформируют фосфорорганические соединения, что способствует эффективному их применению для инокуляции других сельскохозяйственных культур [11]. Известно антистрессовое действие агробактерий в отношении растений, подвергшихся токсичному воздействию солей тяжелых металлов [6]. Данная способность позволяет использовать ризобактерии в технологиях биоремедиации техногенно-нарушенных земель [11]. Все перечисленные свойства агробактерий способствуют также повышению всхожести семян и урожайности растений, увеличению содержания в сухом веществе доли общего азота, фосфора и калия [3].

Почвенные бактерии *Agrobacterium tumefaciens* обладают антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным грибам. При этом стоит отметить, что вид сам является патогенным для растений, возбудителем корневого рака [13]. Ризобактерии способны вызывать заболевания практически у всех представителей двудольных и некоторых голосеменных растений; однодольные при этом практически не поражаются. Эта особенность обусловлена наличием в клетках агробактерий крупных Ti- и Ri-плазмид [13,14]. T-ДНК Ti (Ri)-плазида способна встраиваться в ядерную ДНК растительных клеток, вызывая их неупорядоченный рост и неконтролируемый синтез опинов, которые служат источником питания для агробактерии. Следовательно, дифференцирующий признак патогенности агробактерий определяется наличием плазмид [1, 13].

Методика исследований. С применением оригинального методического подхода по выделению и изучению ассоциативных бактерий, где селективным фактором выступает корень конкретного вида растений, нами была создана коллекция штаммов, ассоциативных с растениями риса посевного (*Oryza sativa* L.).

Таксономическое положение изучаемых штаммов бактерий изучено с помощью метода секвенирования последовательностей гена 16S рРНК, анализа морфологических, культурально-биохимических свойств штаммов, ассоциативных к конкретному виду растений (*Oryza sativa* L.). Для амплификации использованы тотальная ДНК бактерий, экстрагированная из суточных клеток, и праймеры, универсальные для этого гена. Результаты ПЦР-анализа визуализированы методом электрофореза. ПЦР-продукт выделен из 1%-го агарозного геля с использованием сорбента Silica (Sigma-Aldrich, США). Подготовленные пробы секвенированы на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xl (Life Technologies, США). Поиск гомологичных последовательностей проводили в базе данных NCBI методами BLAST-анализа. По результатам были найдены ближайшие к изучаемым штаммам виды бактерий.

Генетическая идентификация штаммов ассоциативных ростстимулирующих бактерий риса позволила установить родовую принадлежность ряда нововыделенных штаммов, три из которых сформировали отдельные кластеры – *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Bacillus* (рис. 1).

Методом секвенирования фрагмента гена 16S рРНК идентифицирован перспективный для микробных технологий штамм ризобактерий – *A. tumefaciens* 32 (RCAM04326). Штамм имел комплекс свойств, характерных для ростстимулирующих ризобактерий (PGPR) рода *Agrobacterium* [5]. В культуральной жидкости штамма были выявлены гормоны-ауксины, стимулирующие рост растений за счет биосинтеза в них собственных фитогормонов, а также прочие физиологически активные экзометаболиты, способные улучшать питание макросимбионта [8]. Также отме-

чали антагонистическую активность штамма, в частности угнетение развития фитопатогенных микромицетов рода *Fusarium spp.* Стимулирующие свойства *A. tumefaciens* 32 установлены на фитотестах – тест-культура пшеница.

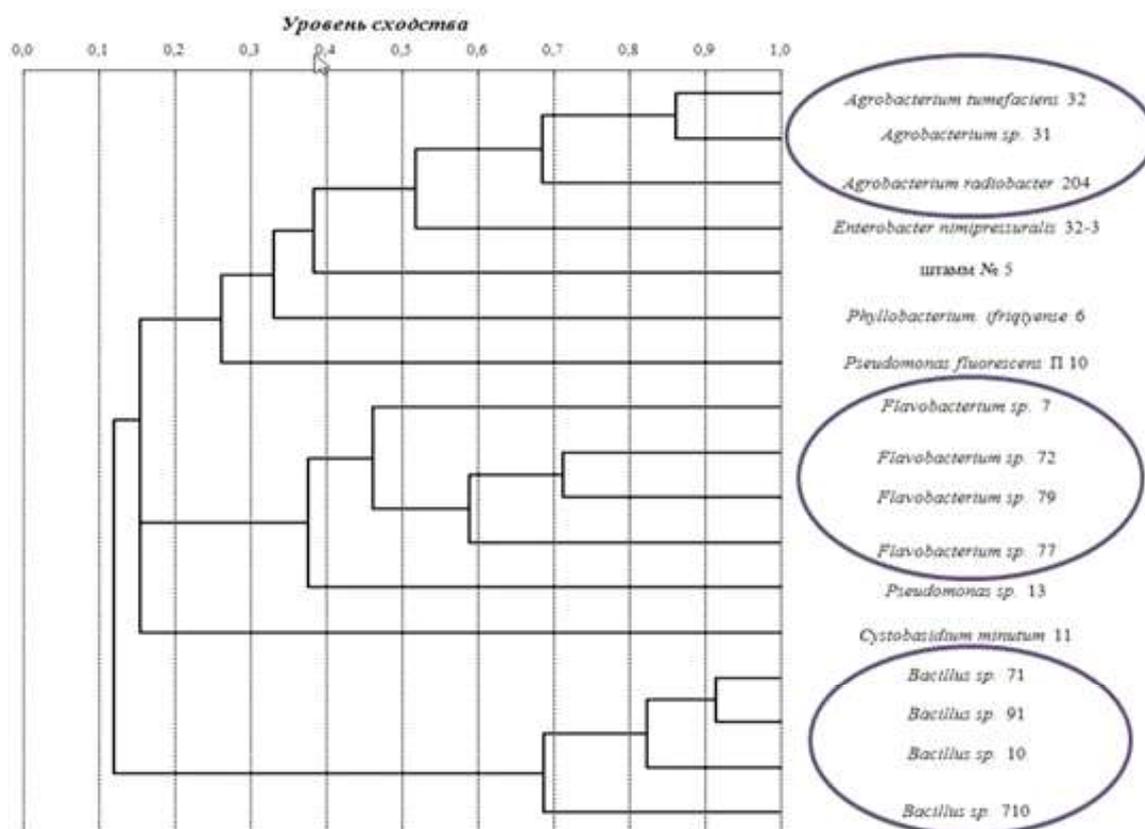


Рис. 1. Дендрограмма родства по фенотипическим и биохимическим признакам штаммов, выделенных из апикальной части корней растений риса (Clusters.xls.)

Штамм был депонирован в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) под инвентарным номером RCAM04326.

Как сказано выше, агробактерии обитают в ризосфере большинства семейств растений и являются патогенами двудольных растений. Это может ограничить интродукцию данного штамма из ряда агроценозов ценных сельскохозяйственных культур и дальнейшую разработку на его основе микробиологических препаратов.

Цель настоящей работы – изучение генетической структуры RCAM04326 и особенностей его взаимодействия с рядом компонентов агрофитоценозов для оценки масштаба последующего использования.

В серии лабораторных опытов установлено, что штамм повышал энергию прорастания семян исследуемых зерновых культур, однако избирательно влиял на накопление их фитомассы. Наиболее отзывчивыми на инокуляцию оказались рис и озимая пшеница. Всхожесть культур увеличилась на 53,3 и 40,0 %, а фитомасса – на 108,0 и 78,4 % соответственно относительно контролей (табл. 1).

Для дальнейшей оценки действия штамма были проведены вегетационные опыты в пленочной теплице, в сосудах объемом 0,5 л. Субстратом послужил чернозем южный.

В качестве тест-объектов были выбраны зерновые и зернобобовые культуры, распространенные в севооборотах агроценоза юга России: *Ervum lens* L. (чечевица), *Glycine max* L. (соя), *Pisum sativum* L. (горох), *Triticum aestivum* L. (пшеница), *Hordeum sativum* L. (ячмень), *Triticale frumentum* L. (тритикале) и *Secale cereale* L. (рожь). Повторность каждого варианта трехкратная. Всего использовали 60 семян на вариант.

Семена перед закладкой обрабатывали водной суспензией микроорганизмов в концентрации $7 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Культуру бактерий получали в условиях периодического культивирования на жидкой питательной среде, рекомендованной для производства биопрепаратов на лабораторной качалке при скорости вращения 220 об/мин. Рост культуры



Влияние инокуляции семян на развитие зерновых культур

Вариант	Всхожесть, %	Воздушно-сухая масса растений, мг
Рис (сорт Диамант)		
Контроль (вода)	46,7	30,0
<i>A. radiobacter</i> 204	80,0	55,0
<i>A. tumefaciens</i> 32	100,0	62,5
HCP _{0,05} / LSD _{0,05}	12,5	0,07
Озимая пшеница (сорт Селянка)		
Контроль (вода)	46,7	38,8
<i>A. radiobacter</i> 204	66,7	64,0
<i>A. tumefaciens</i> 32	86,7	69,2
HCP _{0,05} / LSD _{0,05}	7,3	0,07
Озимая рожь (сорт Таловская 41)		
Контроль (вода)	60,0	77,8
<i>A. radiobacter</i> 204	60,0	50,0
<i>A. tumefaciens</i> 32	56,7	71,4
HCP _{0,05} / LSD _{0,05}	0,8	0,07
Озимый ячмень (сорт Огоньковский)		
Контроль (вода)	20,0	110,0
<i>A. radiobacter</i> 204	33,3	60,0
<i>A. tumefaciens</i> 32	46,7	162,9
HCP _{0,05} / LSD _{0,05}	4,0	0,07

(титр) оценивали методом последовательных разведений, по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) на гороховой агаризованной среде, в чашках Петри. Чашки инкубировали в течение трех суток в термостате при температуре 27 °С [2]. В контроле семена обрабатывали стерильной водой. Референт-штаммом выступал *Agrobacterium radiobacter* 204 – основа микробного препарата Диазофит (Ризоагрин), широко применяемого в посевах зерновых культур. Стимулирующий (фитотоксический) эффект ризобактерий определяли по ростовым эффектам, согласно методу «биопробы на семенах растений» [10]. Полученную фитомассу взвешивали на аналитических весах ОНАУС РА 214С.

Из суточных культур бактерий с использованием набора Gene JET Genomic Purification Kit (Thermo fisher Scientific, Карлсбад, Калифорния, США) выделяли геномную ДНК в соответствии с протоколом для грамотрицательных бактерий. Количество выделенной ДНК оценивали спектрофотометрически с помощью набора Qubit®dsDNA BR Assay Kits (Life technology, США) на приборе Qubit 2.0 Fluorometer (Life technology, США) по протоколу производителя. Концентрация ДНК составила 11,00 µg/ml. Контролем в молекулярно-генетических экспериментах послужили штаммы *A. tumefaciens* C58, A6, *A. rhizogenes* A4, а также изолят *A. vitis*., предоставленные лабораторией Ю. Нестерова (Вашингтонский университет, г. Сиэтл).



Количественное измерение ДНК проводили методом Real-time ПЦР с праймерами 515f и 806r [10], по протоколу к ним.

Для поиска генов вирулентности использовали ПЦР с праймерами к генам *virB2* и *virD2* (табл. 2).

Таблица 2

Праймеры, используемые в работе

Название	Последовательность	Размер ампликона, п.н.	Специфичность
VirB2L	ctctcgaaygcgrtgatgcgc	166	<i>A. tumefaciens</i> , <i>A. rhizogenes</i>
VirB2R	aacggaccragrataaacgtgca		
VirD2L	atcatycgcattgtrccggagg	322	<i>A. tumefaciens</i> , <i>A. rhizogenes</i> , <i>A.vitis</i>
VirD2R	cctgacccaacatctcggcwg		

В состав ПЦР смеси объемом 20 мкл входило по 10 мкл *DreamTaqGreen PCR MasterMix (2X)* (Thermo Fisher Scientific) по 10 пикомолей каждого праймера, 1 мкл ДНК. Условия реакции и электрофоретического разделения фрагментов соответствовали условиям, описанным нами ранее.

В конце эксперимента также исследовали ацетиленредуктазную активность штамма *A. tumefaciens* 32 на газовом хроматографе GC-2014 (Shimadzu, Japan) с использованием насадочных колонок, заполненных сорбентом АСМ, и пламенно-ионизационного детектора нового поколения, обеспечивающего надежный и высокоточный анализ следовых количеств веществ. В качестве инертного газа-носителя использовался азот [12]. Для определения гормональной активности бактерии питательную среду подкисляли 0,4 н. соляной кислотой до значения рН равного 3,0; затем экстрагировали равными объемами этилацетата. Полученные экстракты анализировали с использованием системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) – UPLC Waters ACQUITY H-Class (Waters, Milford, MA, USA) с флуоресцентным детектором ($\lambda_{ex} = 280$ нм, $\lambda_{em} = 350$ нм) на колонке Symmetry Shield RP18, 1.7 μ m, 2.1-50 mm. Условия градиентного разбавления для проведения анализа описаны в работе [9]. В качестве стандартов использовали индол-3-молочную кислоту поставляемую Sigma-Aldrich (USA).

Для визуализации данных и результатов их статистического описания использовали программу PAST (версия 4.04).

Результаты исследований. В чистой культуре нитрогеназная активность штамма *A. tumefaciens* 32 составила 549,7 нмоль C_2H_4 /мл/ч. Наибольшее содержание одного из предшественников биосинтеза гормона – индолилуксусной кислоты (ИУК) – индолилмолочной кислоты (ИМК) отмечалось на уровне 229,6 нг/мл.

Способность *A. tumefaciens* 32 стимулировать развитие проростков исследовали на двудольных (чечевица, соя, горох) и однодольных (пшеница, ячмень, тритикале, рожь) растениях (рис. 2).

Бактеризация семян *A. tumefaciens* 32 способствовала увеличению длины корней озимой пшеницы на 22 %, тритикале – на 20 %, ржи – на 23 %, озимого ячменя – на 8 % в сравнении с контрольными вариантами (без инокуляции). Штамм стимулировал рост корней чечевицы красной на 31 %, сои – на 18 %, гороха – на 15 % относительно контроля.

Выделенную ДНК из исследуемой бактерии оценивали на пригодность к ПЦР в реальном времени с праймерами к гену 16S РНК (рис. 3).

Значения пороговых циклов колебались в диапазоне 10–11, что свидетельствует о высокой концентрации и чистоте ДНК. В ходе ПЦР с праймерами к генам *vir* в образцах *A. tumefaciens* 32 целевых фрагментов не обнаружено. Отсутствие целевых фрагментов при амплификации консервативных участков генов вирулентности *virD2* и *virB2* свидетельствует в пользу авирулентности исследуемого штамма.



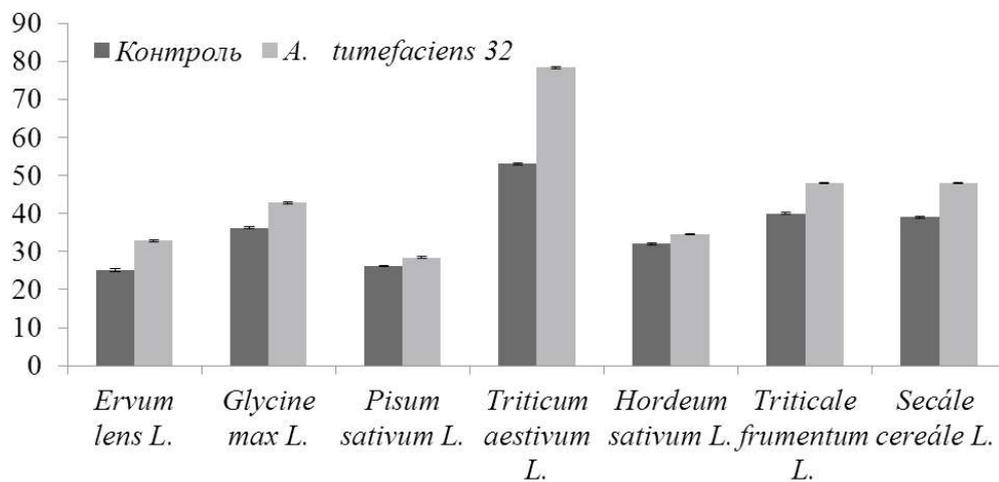


Рис. 2. Влияние бактеризации семян штаммом *A. tumefaciens 32* на длину корней сельскохозяйственных культур, мм. Бары указывают ошибки средних значений длины корней

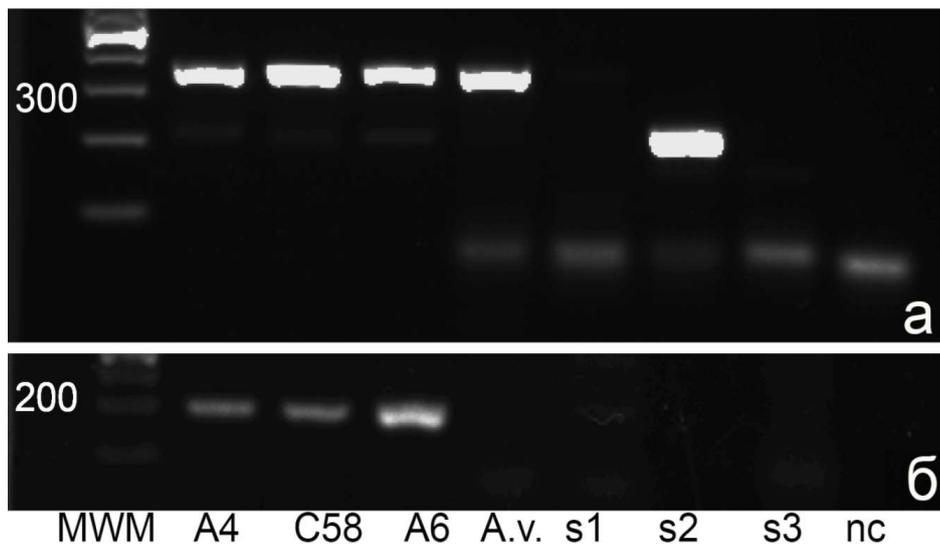


Рис. 3. Результаты ПЦР с праймерами к *virD2* (а) и *virB2* (б). Длина ампликонов (200 п.н.). Названия контрольных штаммов: *A.v.* – изолят *A. vitis*, *s1-s3* – препараты ДНК исследуемых штаммов (*A. tumefaciens R1*, *A. tumefaciens 32*, *A. tumefaciens P3*), *nc* – отрицательный контроль (без ДНК)

Значения пороговых циклов колебались в диапазоне 10–11, что свидетельствует о высокой концентрации и чистоте ДНК. В ходе ПЦР с праймерами к генам *vir* в образцах *A. tumefaciens 32* целевых фрагментов не обнаружено. Отсутствие целевых фрагментов при амплификации консервативных участков генов вирулентности *virD2* и *virB2* свидетельствует в пользу авирулентности исследуемого штамма.

Заключение. Изучены особенности филогении нового штамма diaзотрофных бактерий *A. tumefaciens 32*, ассоциативного с растениями риса. Бактеризация семян стимулирует развитие бобовых и зерновых культур, а также повышает всхожесть и способствует накоплению фитомассы последних (злаковых).

Полученные данные свидетельствуют о перспективе использования штамма *Agrobacterium tumefaciens 32* для агробиотехнологий широкого спектра сельскохозяйственных культур.

В будущем есть необходимость сравнить потенциально полезные свойства данного штамма с таковыми у других бактерий, применяемых в сельском хозяйстве разных стран и не относящихся к фитопатогенным видам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биннс А. Н., Константино П. Онкогены агробактерий // Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями. СПб.: Бионт, 2002. С. 275–290.
2. Виноградова А. В., Козлова Г. А. Культивирование микроорганизмов. Пермь, 2012. 97 с.





3. Лебедев В. Н., Ураев Г. А. Перспективность инокуляции семян горчицы белой и сарептской ассоциативными азотфиксирующими штаммами ризобактерий // Пермский аграрный вестник. 2015. № 3. С. 21–24.
4. Соболева О. М. Роль ризосферных бактерий в повышении экологизации агроценозов // Достижения науки и техники АПК. 2018. Т. 32(5). С. 19–22.
5. Якубовська А. І. Епіфітна мікрофлора рису (*Oriza sativa* L.) як джерело штамів з агрономічно-корисними для рослин властивостями // Сільськогосподарська мікробіологія. 2013. № 18. С. 100–108.
6. Employment of rhizobacteria for the inoculation of barley plants cultivated in soil contaminated with lead and cadmium / A. A. Belimov et al. // *Microbiology*. 2004. Vol. 73(1). P. 99–106. DOI: 10.1023/B:MICI.0000016377.62060.d3.
7. Djordjevic M. A., Mond-Radzman N. A., Imin N. Small-peptide signals that control root nodule number, development, and symbiosis // *Journal of Experimental Botany*. 2015. Vol. 66(17). P. 5171–5181. DOI: 10.1093/jxb/erv357.
8. Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment / S. Fahad et al. // *Environmental Science and Pollution Research*. 2015. Vol. 22(7). P. 4907–4921. DOI: 10.1007/s11356-014-3754.
9. Multiple impacts of the plant growth-promoting rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2 on nutrient and ABA relations of *Pisum sativum* / F. Jiang et al. // *Journal of experimental botany*. 2012. Vol. 63(18). P. 6421–6430. DOI: 10.1093/jxb/ers30.
10. Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in nature / T. V. Matveeva et al. // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2012. Vol. 25(12). P. 1542–1551. DOI: 10.1094/MPMI-07-12-0169-R.
11. Comparative investigation of the reaction mechanisms of the organophosphate-degrading phosphotriesterases from *Agrobacterium radiobacter* (OpdA) and *Pseudomonas diminuta* (OPH) / M. M. Pedroso et al. // *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2014. Vol. 19(8). P. 1263–1275. DOI: 10.1007/s00775-014-1183-9.
12. Turner G. L., Gibson A. H. Measurement of Nitrogen Fixation by Indirect Means. In *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Toronto: Wiley, 1980. P. 111–138.
13. Tzfira T., Li J., Lacroix B., Citovsky V. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models // *Trends in Genetics*. 2004. Vol. 20. P. 375–383. DOI: 10.1016/j.tig.2004.06.004.
14. Zupan J., Muth T. R., Draper O., Zambryski P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights // *The Plant Journal*. 2000. Vol. 23(1). P. 11–28. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2000.00808.

REFERENCES

1. Binns A. N., Constantino P. *Agrobacterium* oncogenes. Rhizobiaceae. *Molecular biology of bacteria interacting with plants*. St. Petersburg: Biont; 2002. P. 275–290. (In Russ.).
2. Vinogradova A. V., Kozlova G. A. Cultivation of microorganisms. Perm; 2012. 97 p. (In Russ.).
3. Lebedev V. N., Uraev G. A. Prospects for inoculation of white and Sarepta mustard seeds with associative nitrogen-fixing strains of rhizobacteria. *Perm agrarian herald*. 2015;(3):21–24. (In Russ.).
4. Soboleva O. M. The role of rhizospheric bacteria in increasing the ecologization of agroecosystems. *Achievements of science and technology of the APK*. 2018;32(5):19–22. (In Russ.).
5. Yakubovskaya A. I. Epiphytic microflora of rice (*Oriza sativa* L.) as a source of strains with agronomically useful properties for plants. *Agricultural Microbiology*. 2013;(18):100–108.
6. Employment of rhizobacteria for the inoculation of barley plants cultivated in soil contaminated with lead and cadmium / A. A. Belimov et al. *Microbiology*. 2004;73(1):99–106. DOI: 10.1023/B:MICI.0000016377.62060.d3.
7. Djordjevic M. A., Mond-Radzman N. A., Imin N. Small-peptide signals that control root nodule number, development, and symbiosis. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66(17):5171–5181. DOI: 10.1093/jxb/erv357.
8. Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment / S. Fahad et al. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015;22(7):4907–4921. DOI: 10.1007/s11356-014-3754.
9. Multiple impacts of the plant growth-promoting rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2 on nutrient and ABA relations of *Pisum sativum* / F. Jiang et al. *Journal of experimental botany*. 2012;63(18):6421–6430. DOI: 10.1093/jxb/ers30.
10. Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in nature / T. V. Matveeva et al. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2012;25(12):1542–1551. DOI: 10.1094/MPMI-07-12-0169-R.
11. Comparative investigation of the reaction mechanisms of the organophosphate-degrading phosphotriesterases from *Agrobacterium radiobacter* (OpdA) and *Pseudomonas diminuta* (OPH) / M. M. Pedroso et al. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2014;19(8):1263–1275. DOI: 10.1007/s00775-014-1183-9.
12. Turner G. L., Gibson A. H. Measurement of Nitrogen Fixation by Indirect Means. In *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Toronto: Wiley; 1980. P. 111–138.
13. Tzfira T., Li J., Lacroix B., Citovsky V. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends in Genetics*. 2004;20:375–383. DOI: 10.1016/j.tig.2004.06.004.
14. Zupan J., Muth T. R., Draper O., Zambryski P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*. 2000;23(1):11–28. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2000.00808.

Статья поступила в редакцию 29.04.2022; одобрена после рецензирования 18.05.2022; принята к публикации 27.05.2022.
The article was submitted 29.04.2022; approved after 18.05.2022; accepted for publication 27.05.2022.