

УДК 579.2:579.6

ФИТОСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ *Methylobacterium dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 И ЕГО НОКАУТ-МУТАНТА ПО ГЕНУ *groEL2*

© 2025 г. Н. В. Агафонова^{1,*}, Г. А. Екимова¹, Ю. Е. Фирсова¹, М. Л. Торгонская¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
ФИЦ “Пушинский научный центр биологических исследований РАН”,
Московская область, Пушкино, 142290 Россия

*e-mail: nadyagafonova@gmail.com

Поступила в редакцию 08.07.2024 г.

После доработки 08.08.2024 г.

Принята к публикации 05.09.2024 г.

Впервые проведен анализ генома деструктора дихлорметана *Methylobacterium dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 на наличие генетических детерминант, указывающих на его потенциал как стимулятора роста растений, а также определена способность данного штамма и его нокаут-мутанта по гену *groEL2* к улучшению роста растений. В геноме штамма DM4 обнаружены гены, отвечающие за биосинтез фитогормонов (индоллил-3-уксусной кислоты и цитокининов), сидерофоров, каротиноидов, поли-β-гидроксibuтирата, гидролитических ферментов, а также ферментов, участвующих в деградации D-цистеина, в защите от УФ-повреждений и сольюбилизации фосфатов. Инокуляция ростков салата штаммом DM4 положительно влияла на рост и развитие растений, повышала адаптивную защиту и устойчивость к кратковременному температурному стрессу в вегетационных опытах. Сравнительный анализ продукции ауксинов, сидерофоров, гидролитических ферментов, D-цистеиндесульфогидазной активности, способности к сольюбилизации нерастворимых фосфатов у штаммов DM4 и DM4 Δ*groEL2* показал, что нарушение структуры гена *groEL2* приводило к снижению синтеза индолпроизводных и фосфатсольюбилизирующей способности у мутантного штамма. Оценка влияния инокуляции указанными штаммами растений салата также продемонстрировала уменьшение фитостимулирующего потенциала DM4 Δ*groEL2* по сравнению с исходным штаммом. Полученные данные свидетельствуют об опосредованном влиянии шаперонина GroEL2 у *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 на его фитостимулирующую активность.

Ключевые слова: розовоокрашенные факультативные метилотрофные бактерии, стимуляция роста растений, фитостимулирующая активность, стресс, шаперонины, *Methylobacterium*

DOI: 10.31857/S0555109925010088 EDN: DAFXRF

Аэробные метилотрофные бактерии — группа прокариот, использующих метан и его окисленные и замещенные производные в качестве источников углерода и энергии. Уникальный метаболизм метилотрофов, дающий им возможность минерализовать такие токсиканты, как метанол, формальдегид, метилированные амины, метилсернистые соединения и галометаны, а также повсеместное распространение в природе этих микроорганизмов зачастую требуют от них способности выживать в неблагоприятных и даже экстремальных условиях

[1–4]. Известно, что метилотрофы эволюционно приспособились с высокой плотностью колонизировать филло- и ризосферу растений, поскольку образование растениями различных C₁-соединений (метанол, метиламин и др.) создает предпосылки прочной метаболической взаимосвязи между ними [5, 6]. Для наиболее полно изученных в этом плане представителей розовоокрашенных факультативных метилотрофных бактерий (РОФМ) из родов *Methylobacterium* и *Methylorubrum* показано, что они являются типичными обитателями филлосферы

и обладают рядом свойств, позволяющих стимулировать рост и развитие растений (фосфатсольюбилизация, синтез индолпроизводных, сидерофоров, гидролитических ферментов и др.) [7–9]. Однако, несмотря на то, что метилотрофные организмы используют токсичные субстраты и способны адаптироваться к неблагоприятным условиям на поверхности растений, в почвах и воде, они остаются практически не изученными с точки зрения функций основных клеточных шаперонов. Между тем, последние могут не только служить белками “домашнего хозяйства”, но и специализироваться на фолдинге уникальных ферментов, обеспечивая гибкость метаболизма своих хозяев.

Одной из наиболее важных групп таких шаперонинов являются белки теплового шока GroEL (Cpn60, Hsp60) и GroES (Cpn10, Hsp10). Они играют решающую роль в сворачивании полипептидов, склонных к агрегации и/или предназначенных для транспорта через мембрану, но также предотвращают летальную неспецифическую ассоциацию белков в стрессовых условиях [10–12]. Подобная работа белков стресс-ответа, очевидно, должна являться и фундаментальной частью симбиотического процесса, поскольку способствует адаптации бактерий, попадающих на поверхность растений, к неблагоприятным условиям на/в клетках или тканях растения-хозяина. Так, например, для ряда ризобий (*Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* и *Bradyrhizobium japonicum*) было показано, что отдельные паралоги их множественных 60-кДа шаперонинов GroEL важны для симбиоза этих бактерий с бобовыми растениями и специфических стрессовых реакций [10, 13, 14]. Проведенный ранее анализ геномных последовательностей всех известных видов РОФМ родов *Methylobacterium* и *Methylobacterium* также выявил наличие множественных паралогов генов *groEL* у половины из них и позволил выделить три типичных для этих метилотрофов группы сходства кодируемых шаперонинов GroEL (GroEL1, GroEL2 и GroEL3). В результате, было предположено, что группа GroEL1, объединяет необходимые для жизнедеятельности клеток белки “домашнего хозяйства”, тогда как две других состоят из добавочных шаперонинов, отличающихся механизмами регуляции их синтеза и, возможно, функциями [15].

Первым представителем РОФМ, использованным для проверки вышеуказанной гипотезы посредством сайт-направленного мутагенеза, стал *Methylobacterium dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* (базоним *M. dichloromethanicum*) DM4. Этот штамм, выделенный из осадка промышленных сточных вод, является деструктором токсичного растворителя дихлорметана (ДХМ) и способен использовать это соединение в качестве единственного источника углерода и энергии [16]. Из двух присутствующих в геноме штамма DM4 гомологичных генов *groEL*, лишь один (*groEL1*)

оказался жизненно важным для клеток метилотрофа, и его мутация была летальна. Напротив, нокаут-мутант DM4 *ΔgroEL2* был жизнеспособен, но отличался от штамма дикого типа повышенной чувствительностью к кислотному, солевому стрессу и высушиванию, а также существенно сниженной скоростью роста с токсикантом ДХМ [17]. Таким образом, синтез добавочного шаперонина группы GroEL2, присутствующего у деструктора *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4, по-видимому, способствовал более эффективному ответу его клеток на стрессы, связанные с дегалогенированием ДХМ. Тем не менее, способность к минерализации ДХМ, отличающая штамм DM4 от других близкородственных метилотрофов, несомненно, является лишь одним из его свойств, на которые может оказывать влияние шаперонин GroEL2. Поскольку филогенетически *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 кластеризуется совместно с представителями рода *Methylobacterium* и имеет высокий уровень сходства с широко распространенными фитосимбионтами *M. extorquens* [15, 18], было сделано предположение, что он также обладает механизмами адаптации к жизни с растениями и стимуляции их роста и развития. Цель настоящей работы — оценка генетического потенциала *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 для стимуляции роста растений, а также сравнительный анализ фитостимулирующей активности исходного штамма DM4 и его производного, лишённого гена *groEL2*.

МЕТОДИКА

Объекты исследования и условия культивирования. В работе использовали штамм *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 (VKM B-2191 = DSM 6343) [16] и ранее полученный на его основе нокаут-мутант DM4 *ΔgroEL2* [16]. Штаммы выращивали и поддерживали на минеральной среде ММ с метанолом (0.5%, об./об.), как описано ранее [19]. Для вегетационных опытов использовали суспензии клеток, выращенных до конца экспоненциальной фазы роста ($OP_{600} = 1.6–1.8$).

Анализ генома. Для анализа генома штамма *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 использовали последовательность, доступную в базе данных NCBI GenBank — GCA_000083545.1. Функциональную аннотацию и поиск генов проводили с помощью сервисов RAST (<https://rast.nmpdr.org/>) и KEGG (<https://www.kegg.jp/blastkoala/>) с последующей проверкой и коррекцией аннотации вручную в результате сравнения предсказанных генов с базами данных NCBI [20–22].

Анализ продукции индолпроизводных. Штаммы выращивали на модифицированной среде K1 (г/л): KH_2PO_4 — 2.0, KNO_3 — 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.025,

NaCl — 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.002, *L*-триптофан — 0.2, pH 7.2, при температуре 29°C, 180 об./мин в течение 3 сут. Образование индолпроизводных в культуральной жидкости анализировали, как описано ранее [23], с помощью реактива Сальковского [24]. Измерения проводили при длине волны 530 нм. Калибровочные кривые строили со стандартными растворами индолил-3-уксусной кислоты (“Sigma”, США).

Анализ продукции сидерофоров. Для количественного определения сидерофоров штаммы выращивали на модифицированной среде К без источника Fe^{3+} (г/л): KH_2PO_4 — 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2.0, NaCl — 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.1, pH 7.2, при температуре 29°C, 180 об./мин до ОП₆₀₀ 1.5. Содержание сидерофоров в культуральной жидкости определяли с помощью универсального метода с использованием CAS-реактива [25]. Бесклеточный супернатант смешивали в соотношении 1 : 1 (об./об.) с CAS-реактивом, инкубировали 20 мин, оптическую плотность измеряли при длине волны 630 нм (A_s). Контролем служила исходная минеральная среда, смешанная с реактивом CAS (A_K). Содержание сидерофоров (%) определяли по формуле $[(A_K - A_s)/A_K] \times 100$ [26].

Определение фосфатсольбилизирующей способности. Штаммы выращивали на модифицированной среде MM с метанолом (0.5%, об./об.), содержащей нерастворимый $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в качестве единственного источника фосфора (г/л): $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ — 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.1, pH 7.2, а также микроэлементы (мг/л): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ — 25, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.1, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0.1, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0.025, H_3BO_3 — 0.01, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0.025, ZnSO_4 — 0.03, $\text{Na}_3\text{VO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 0.03, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.02, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.009, при температуре 29°C, 180 об./мин в течение 5 сут. Концентрацию растворимых форм фосфора определяли в культуральной жидкости с помощью фосфорномолибденового реактива, согласно ранее описанному методу [7]. Измерения проводили при длине волны 614 нм. Калибровочную кривую строили со стандартными растворами KH_2PO_4 . Оптическую плотность культур, выращенных с трикальцийфосфатом (ТКФ), измеряли при длине волны 600 нм, предварительно разбавляя аликвоту образцов в соотношении 1 : 1 (об./об.) 1 н HCl и измеряя ее относительно холостой пробы, приготовленной аналогичным способом, как описано ранее [27, 28].

Определение активности гидролитических ферментов (целлюлазы, протеазы, амилазы). Для оценки целлюлазной, протеазной и амилазной, активностей штаммы выращивали в течение 5 сут при 29°C на агаризованной среде MM, как описано ранее [29].

Определение активности D-цистеиндесульфогидазы. Активность фермента [КФ 4.4.1.15]

определяли в бесклеточных экстрактах исследуемых штаммов спектрофотометрическим методом по включению продуцируемого сероводорода в метиленовый синий [30]. Реакцию проводили в 1 мл 50 мМ буфера Tris-HCl, pH 8.0, содержащего 50 мкл бесклеточного экстракта, начинали добавлением 20 мкл 50 мМ D-цистеина. После инкубации в течение 10 мин при 30°C, реакцию останавливали добавлением 100 мкл 30 мМ раствора FeCl_3 в 1.2 М HCl и 100 мкл 20 мМ раствора *N,N*-диметил-*p*-фенилендиаминдигидрохлорида в 7.2 М HCl. Образование метиленового синего регистрировали при 670 нм.

Инокуляция растений и изучение ростостимулирующей активности. Семена салата (*Lactuca sativa* L.) поверхностно стерилизовали в 5 %-ном растворе гипохлорита натрия, трижды отмывали стерильной дистиллированной водой, высевали в пластиковые лотки для рассады (объем 50 мл) на предварительно простерилизованный (112°C, 30 мин) питательный грунт. На 2 сут на ростки наносили суспензию клеток штаммов DM4 и DM4 *ΔagroEL2* (10^4 – 10^5 КОЕ/мл) из расчета 100 мкл на росток, в качестве контроля ростки обрабатывали стерильной средой MM. Растения выращивали при температуре 23–25°C и 16-часовом световом периоде в течение 3 недель. Массу ростков и корней определяли после высушивания растений при 90°C до постоянного веса. Фотосинтетические пигменты экстрагировали из листьев 96%-ным этиловым спиртом [31], оптическую плотность экстрактов измеряли при 665, 649 и 440.5 нм, концентрацию пигментов (мг/г сырой массы) — хлорофилла *a*, *b* и каротиноидов, рассчитывали, как описано ранее [32]. Для определения удельной плотности листа (УПЛ) из листьев вырезали высечки площадью 1 см² и высушивали их до постоянного веса при температуре 90°C. УПЛ определяли, как отношение единицы массы листа к единице площади (мг/мм²) [33].

Определение активности антиоксидантных ферментов и содержания малонового диальдегида (МДА). Для определения устойчивости к температурному стрессу 3-недельные растения подвергали тепловому шоку при температуре 40°C в течение 1 ч, контролем служили растения, не подвергавшиеся стрессу. Растительные экстракты для определения активности ферментов готовили, как описано ранее [32]. Активность каталазы [КФ 1.11.1.6] определяли по изменению концентрации H_2O_2 при длине волны 240 нм после добавления исследуемого образца, как описано ранее [34]. Активность пероксидазы [КФ 1.11.1.7] определяли по скорости развития окраски в индикаторной реакции разложения H_2O_2 при длине волны 460 нм, как описано ранее [34]. Удельную активность ферментов рассчитывали на мг белка, содержание которого в исследуемых образцах определяли по методу Брэдфорда [35]. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по образованию при нагревании окра-

шенного комплекса между МДА и тиобарбитуровой кислотой [36]. Концентрацию МДА определяли при длине волны 532 нм с использованием коэффициента молярной экстинкции $155 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, предварительно вычитая величину неспецифической экстинкции при 600 нм.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA). Все эксперименты проводили в трех биологических и, по меньшей мере, трех аналитических повторностях. В таблицах и графиках показаны средние значения и их стандартные отклонения. Разные буквы указывают на достоверные различия между вариантами ($p < 0.05$). Достоверность различий определяли посредством однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), используя метод Холма-Сидака для попарного множественного сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ генома и генетический потенциал штамма DM4 как стимулятора роста растений. Ранее проведенный анализ полной последовательности генома *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 [37] был посвящен поиску и описанию генов, определяющих его физиологическую адаптацию к метилотрофному образу жизни. В настоящей работе нами проведен поиск генетических детерминант для выявления потенциальной способности штамма DM4 к колонизации и стимуляции роста растений. С помощью сервиса KEGG BlastKOALA выявлено, что из аннотированных 6164 кодирующих белки последовательностей 2483 (40.3% от общего числа) связаны с известными бактериальными метаболическими путями (рис. 1а). Основные пути включали следующие метаболические функции: процессы, связанные с обработкой генетической информации (20.7%), сигналинг и клеточные процессы (10.47%), процессы, связанные с обработкой информации из окружающей среды (10.43%), метаболизм углеводов (9.34%), энергетический метаболизм (7.29%), метаболизм кофакторов, витаминов (5.84%) и аминокислот (4.99%). Согласно данным сервиса RAST, в геноме также выявлено 6164 кодирующих белки последовательностей, из которых 1835 (29.8% от общего числа) отнесены к 321 метаболической подсистеме — группам белков, обеспечивающих реализацию определенных биологических процессов в клетке. Так большинство генов были вовлечены в метаболизм аминокислот и их производных (247), метаболизм углеводов (215), белковый обмен (204), синтез кофакторов (включая витамины, пигменты, простетические группы) (161), дыхание (135), моторику и хемотаксис (89), синтез жирных кислот, липидов, изопреноидов (73), реакцию на стресс (68) и мембранный транспорт (58) (рис. 1б). Следовательно, штамм DM4, способен использовать

доступные в среде обитания ресурсы углеводов и аминокислот, большинство его белок-кодирующих генов участвуют в процессах взаимодействия с окружающей средой, включая обработку и передачу сигналов извне, а способность к адгезии, моторике и хемотаксису, наряду с устойчивостью к стрессовым факторам, свидетельствует о его высокой адаптивности к условиям окружающей среды.

Как известно, РОФМ, обнаруживаемые в филлосфере и ризосфере различных растений, способны улучшать их рост за счет синтеза различных биоактивных соединений [6]. В частности, многие метилотрофы синтезируют индолпроизводные (фитогормоны ауксины), которые активируют рост, корнеобразование и формирование проводящих тканей растений [6]. Обнаружено, что штамм DM4 обладает генами ключевых ферментов пути синтеза индолов через продукцию триптофана — антранилатсинтазы, антранилатфосфорибозилтрансферазы, индол-3-глицерофосфатсинтазы и триптофансинтазы (α и β -субъединиц) (табл. 1). Кроме того, у него присутствует ген, кодирующий индолилпируватдекарбоксилазу (*ipdC*) — ключевой фермент синтеза индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) посредством индолилпируватного пути. Наличие в геноме штамма DM4 гена *miaA*, кодирующего изопентенилтрансферазу, указывает на возможность функционирования в его клетках изопентениладенин-зависимого пути синтеза еще одного класса фитогормонов — цитокининов. В кооперации с ауксинами эти соединения участвуют в стимуляции роста и делении клеток растений, фотосинтетических процессах и реакции на стрессы [38]. В результате геномного анализа не обнаружены гены синтеза дезаминазы 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (*acdS*), снижающей концентрацию гормона старения растений этилена. Тем не менее, найден ген D-цистеиндесульфогидразы (*dcyD*), участвующей в формировании ассоциации бактерий с растениями посредством катализа образования сероводорода, обладающего фунгицидным действием и участвующего в стимуляции роста, развития растений и в их защите от различных видов стресса [39]. Помимо этого, в геноме штамма DM4 выявлены гены гидролитических ферментов, способствующие растворению компонентов клеточной стенки растений и, тем самым, облегчающих проникновение бактерий и колонизацию хозяина [40], — эндоглюканазы, β -глюкозидазы, амилазы, эндо- и аминопептидазы (табл. 1). Кроме того, исследуемый метилотроф, вероятно, способен к растворению неорганических фосфатов за счет продукции органической кислоты — формиата, образующегося в процессе окисления метанола и других C_1 -соединений [7, 37], и обладает генами ряда фосфатаз (табл. 1), участвующих в минерализации органических соединений фосфора. Также обнаружен кластер генов, вовлеченных в синтез сидерофоров — низ-

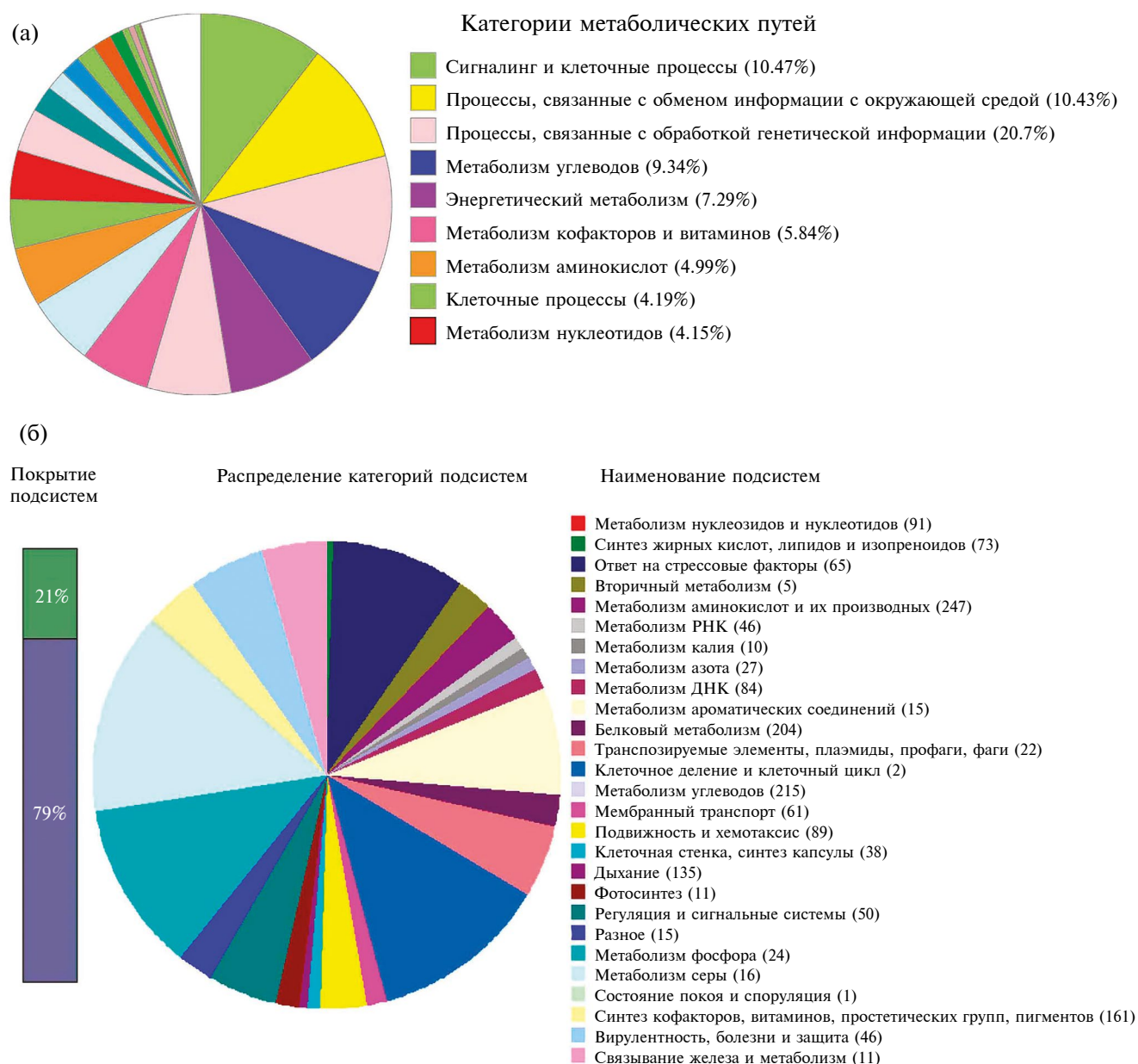


Рис. 1. Распределение категорий подсистем клеточного метаболизма *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 на основе результатов функциональной аннотации согласно базам данных KEGG BlastKOALA (a) и RAST (б).

комолекулярных метаболитов-хелаторов, специфически связывающих ионы Fe^{3+} . И те, и другие играют важную роль в повышении доступности связанных ионов и обеспечивают преимущество для выживания и развития микроорганизмов, в том числе при колонизации растений [41, 42]. Для защиты клеток от ультрафиолетового излучения у розовоокрашенного штамма DM4 присутствуют гены синтеза каротиноидов (*crtB*, *crtF*, *crtE/I* и *crtC*) и эндонуклеазы репарации повреждений, вызываемых УФ (табл. 1). Наконец, благодаря наличию генов биосинтеза полигидроксibuтирата (ПГБ) (*phaAB*, *phaR*, *phaC*), он может накапливать указанный биополимер в качестве внутриклеточного

запасного источника углерода и энергии, а затем расходовать его при неблагоприятных условиях.

Таким образом, результаты проведенного анализа генома показали, что исследуемый метилотроф *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 обладает целым комплексом генетических детерминант, определяющих потенциал штамма к стимуляции роста растений и противостоянию неблагоприятным факторам при их колонизации. Для дальнейшей проверки фенотипического выражения кодируемых свойств и оценки возможного влияния на него нарушения синтеза шаперонина GroEL2 была изучена способность клеток исходного и мутант-

Таблица 1. Гены, связанные со стимуляцией роста растений, в геноме *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4

Функция	Продукт гена	Ген	Номер локуса в GenBank
Биосинтез индолов	Анранилатсинтаза (I и II компонент) [КФ 4.1.3.27]	<i>trpE</i> , <i>trpG</i>	METD_I5718, METD_I5721
	Анранилатфосфорибозилтрансфераза [КФ 2.4.2.18]	<i>trpD</i>	METD_I5722
	Фосфорибозил-анранилат изомеразы [КФ 5.3.1.24]	<i>trpF</i>	METD_I0055
	Индол-3-глицерофосфатсинтаза [КФ 4.1.1.48]	<i>trpC</i>	METD_I5723
	Триптофансинтаза, α и β -субъединицы [КФ 4.2.1.20]	<i>trpA</i> , <i>trpB</i>	METD_I5482, METD_I0054
Ключевой фермент биосинтеза ИУК	Индолилпируватдекарбоксилаза [КФ 4.1.1.74]	<i>ipdC</i>	METD_I3257
Синтез цитокининов	tРНК-изопентинилтрансфераза [КФ 2.5.1.8]	<i>miaA</i>	METD_I3413
Дегградация D-цистеина	D-цистеиндесульфогидраза [КФ 4.4.1.15]	<i>dcyD</i>	METD_I3140
Продукция гидролитических ферментов	Эндоглюканаза (целлюлазная активность) [КФ 3.2.1.4]	<i>celC</i>	METD_I2019
	β -глюкозидаза (целлюлазная активность) [КФ 3.2.1.21]	<i>bglX</i>	METD_I3242
	Амилаза [КФ 2.4.1.21]	<i>glgA</i>	METD_I2792
	Эндопептидаза [КФ 3.4.21]		METD_I0058
	Аминопептидаза [КФ 3.4.11.9]		METD_I5518
	Аминопептидаза [КФ 3.4.11.24]		METD_I4275
Защита от УФ	Эндонуклеаза репарации повреждений от УФ-излучения		METD_I2201
Биосинтез каротиноидов	Гены синтеза каротиноидов	<i>crtB</i>	METD_I3784, METD_I5228
		<i>crtF</i>	METD_I3494
		<i>crtE/I</i>	METD_I3492, METD_I3783, METD_I4240, METD_I4245
		<i>crtC</i>	METD_I3491
Биосинтез ПГБ	Ацетоацетил-КоА трансфераза [КФ 2.3.1.9]	<i>phaA</i>	METD_I4272
	Ацетоацетил-КоА редуктаза [КФ 1.1.1.36]	<i>phaB</i>	METD_I4273
	Поли-3-гидроксипальмитатсинтаза [КФ 2.3.1.304]	<i>phaC</i>	METD_I3869
	Регуляторный белок синтеза ПГБ PhaR	<i>phaR</i>	METD_I4271
Биосинтез сидерофоров	Генный кластер биосинтеза сидерофоров		METD_I4717–METD_I4727
Солюбилизация фосфатов	Кислая фосфатаза [КФ 3.1.3.2]		METD_I2235
	Экзополифосфатаза [КФ 3.6.1.11]		METD_I2834
	Щелочная фосфатаза [КФ 3.1.3.1]		METD_I2865
	Неограническая дифосфатаза [КФ 3.6.1.1]		METD_I2842

ного штаммов к синтезу ауксинов, сидерофоров, D-цистеиндесульфогидазы и гидролитических ферментов, а также их фосфатсольбилизирующая активность.

Способность к синтезу ауксинов. Сравнительный анализ продукции индолпроизводных штаммами DM4 и DM4 *ΔgroEL2* при добавлении в среду предшественника L-триптофана продемонстрировал, что у мутанта по гену *groEL2* синтез ауксинов снижался более чем в 2 раза по сравнению со штаммом дикого типа: до 4.17 ± 0.60 мкг/мл культуральной жидкости против 10.46 ± 1.62 мкг/мл (при ОП₆₀₀ культур 1.0) соответственно. При этом уровень продукции ИУК у исходного штамма DM4 находился в пределах значений, характерных для большинства РОФМ ($8\text{--}29$ мкг/мл) [9].

Способность к синтезу сидерофоров. При культивировании на минеральной среде без источников железа оба исследуемых штамма синтезировали сидерофоры, причем их продукция у нокаут-мутанта DM4 *ΔgroEL2* достоверно не отличалась от таковой у штамма дикого типа (91.98 ± 0.98 % у мутанта против 93.26 ± 0.36 % у исходного штамма).

Фосфатсольбилизирующая активность. Показано, что оба исследуемых штамма растворяют ТКФ, однако накопление фосфатов в культуральной жидкости штамма дикого типа достигало максимального значения (111.32 ± 3.23 мкг/мл) уже в первые сутки роста, в то время как мутант DM4 *ΔgroEL2* демонстрировал существенное отставание по этому параметру (97.77 ± 3.10 мкг/мл) (рис. 2а). На 3 сут роста концентрации фосфатов в культуральной жидкости обоих штаммов практически выравнивались, а на 5 сут достигали значений 105.66 ± 3.22 мкг/мл и 105.50 ± 2.87 мкг/мл для исходного и мутантного штаммов соответственно. При этом следует отметить, что накопление биомассы у мутанта DM4 *ΔgroEL2* на среде с ТКФ в качестве единственного источника фосфора также происходило заметно медленнее, нежели у штамма дикого типа. Так в течение первых 3 сут оптическая плотность клеток мутанта была в 1.4 раза ниже таковой исходного штамма, и достигала близких к ней значений лишь на 4–5 сут роста (рис. 2б). Учитывая, что ранее на обычной среде ММ с растворимым источником фосфора (KH_2PO_4) динамика роста штамма DM4 *ΔgroEL2* на метаноле не отличалась от таковой штамма дикого типа [17], такой эффект, по-видимому, свидетельствует о лимитировании роста мутанта недостатком фосфора вследствие его сниженной фосфатсольбилизирующей активности.

Активность гидролитических ферментов. Показано, что штамм DM4 и его нокаут-мутант DM4 *ΔgroEL2* обладали одинаковой амилазной и протеазной активностью. Диаметр зон гало вокруг колоний исходного и мутантного штаммов на среде с крахмалом составлял 10.1 ± 0.08 мм и 10.2 ± 0.10 мм соответственно. Зоны лизиса для

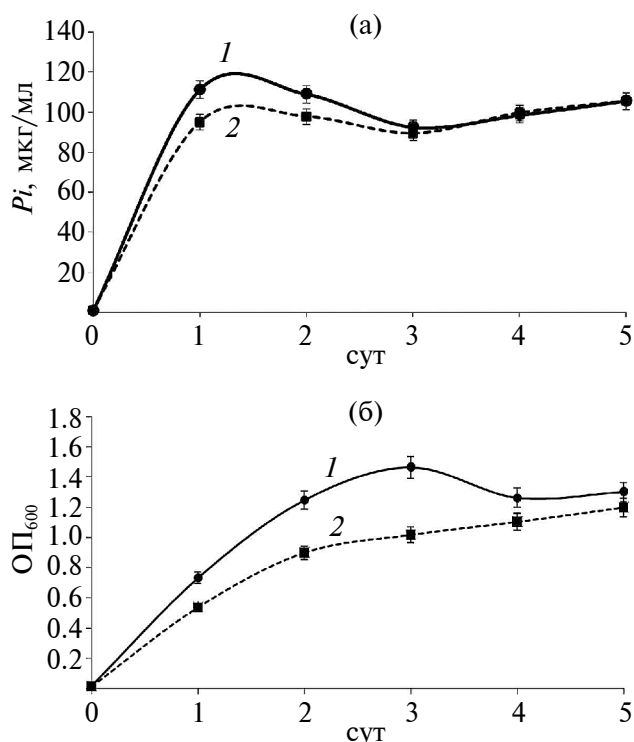


Рис. 2. Накопление фосфора в культуральной жидкости (а) и оптическая плотность клеток (б) при культивировании штаммов *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 (1) и DM4 *ΔgroEL2* (2) на минеральной среде с $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в качестве единственного источника фосфора.

штамма дикого типа и штамма, лишённого гена *groEL2*, при исследовании протеолитической активности достигали 12.1 ± 0.09 мм и 12.0 ± 0.10 мм соответственно. Несмотря на наличие в геноме генов синтеза целлюлазы (табл. 1), целлюлазную активность у указанных штаммов детектировать не удалось.

Активность D-цистеиндесульфогидазы. Обнаружено, что оба исследуемых штамма экспрессируют D-цистеиндесульфогидазу, причем синтезируемый ими фермент обладает строгой стереоспецифичностью к токсичному для бактерий D-цистеину и неактивен с L-цистеином. Показано также, что активность D-цистеиндесульфогидазы у нокаут-мутанта DM4 *ΔgroEL2* практически не отличалась от таковой штамма дикого типа (2.23 ± 0.16 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка против 2.40 ± 0.18 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка соответственно).

В целом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что метилотроф *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 обладал целым рядом функциональных механизмов, способных участвовать в формировании симбиотических отношений с растениями. Вместе с тем, обнаружено, что среди исследованных параметров нарушение структуры гена *groEL2* у штам-

ма DM4 оказывало негативное влияние только на продукцию индолпроизводных и способность к сольюбилизации нерастворимых фосфатов. Здесь следует отметить, что основной ауксин — ИУК — является не только фитогормоном, но и важной сигнальной молекулой для самих бактерий, согласующей их поведение и регулирующей экспрессию ряда генов, связанных с центральным метаболизмом [43–46], а также с выживанием в неблагоприятных условиях (высушивание, окислительный, температурный и осмотический стресс) [47–49]. Снижение синтеза ауксинов, выявленное у мутанта DM4 *ΔgroEL2* могло быть связано с общим нарушением стресс-ответа. Что же касается отмеченного уменьшения его фосфатсольюбилизирующей способности, оно, вероятно, отражает изменения в регуляции метаболизма и затрагивает продукцию и накопление интермедиатов окисления метанола [7]. Для оценки различий ростостимулирующих свойств исходного и мутантного штаммов были проанализированы эффекты инокуляции ими растений салата.

Влияние инокуляции на рост и морфогенез растений салата в вегетационных опытах. Показано, что растения, инокулированные штаммом дикого типа, превосходили контрольные по длине (на 25.3%) и массе (на 21.8%) корневой системы (табл. 2), тогда как у растений, обработанных клетками мутанта DM4 *ΔgroEL2*, аналогичные показатели были ниже и близки к таковым в контрольном варианте (табл. 2). Помимо этого, выявлено достоверное увеличение высоты и массы надземной части растений, инокулированных штаммами DM4 (на 17.6 и 37.0% соответственно) и DM4 *ΔgroEL2* (на 10.7% и 19.3%, соответственно) по сравнению с контрольными. Отмечено также, что первые настоящие листья у инокулированных растений появлялись раньше и были крупнее, чем у контрольных. Оценка удельной плотности листа, являющейся одним

из основных функциональных параметров из-за тесной связи с активностью фотосинтеза и скоростью роста растений [50], показала, что у растений, инокулированных исходным и мутантным штаммами, значения УПЛ были незначительно, но все же выше, чем у контрольных (табл. 2). Кроме того, у обработанных метилотрофами растений отмечалась тенденция к увеличению количества листьев в одной розетке по сравнению с контрольными (табл. 2).

Одной из важнейших характеристик фотосинтетического аппарата является содержание основных фотосинтетических пигментов (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов). Количество пигментов в растительных организмах варьирует в широких пределах, отражает их реакцию и степень адаптации на любые изменения во внешней среде [51]. Обнаружено, что инокуляция исследуемыми метилотрофами растений салата приводила к увеличению содержания в их листьях фотосинтетических пигментов (табл. 2). Суммарное содержание хлорофиллов (ХЛ, *a+b*) и каротиноидов в листьях салата, инокулированного как исходным, так и мутантным штаммами, были почти в 1.6 и 1.3 раза соответственно выше, чем в контроле. Эти данные свидетельствуют о более интенсивной работе фотосинтетического аппарата и увеличении продуктивности растений, инокулированных исследуемыми штаммами. При этом содержание основных пигментов в листьях и продуктивность (масса ростков и корней) салата, инокулированного штаммом дикого типа, были выше, чем у инокулированного мутантным штаммом (табл. 2). Поскольку урожайность тесно связана с фотосинтетической активностью, вполне закономерно, что растения, обработанные исходным штаммом, обладали более высокими морфометрическими показателями по сравнению с обработанными штаммом DM4 *ΔgroEL2* (табл. 2). Таким образом, мутация по гену

Таблица 2. Морфометрические показатели, содержание и соотношение фотосинтетических пигментов у растений салата, неинокулированных (контроль, 1) и инокулированных штаммами *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 (2) и DM4 *ΔgroEL2* (3). Достоверные различия ($p < 0.05$) между вариантами отмечены разными буквами

Вариант	Длина корней, см	Масса корней, мг	Высота ростков, см	Масса ростков, мг	Количество листьев	УПЛ, мг/мм ²	ХЛ <i>a</i> , мг/г сырой массы	ХЛ <i>b</i> , мг/г сырой массы	ХЛ (<i>a+b</i>), мг/г сырой массы	Каротиноиды, мг/г сырой массы
1	6.8 ± 0.2 ^b	5.5 ± 0.6 ^a	10.2 ± 0.4 ^b	30.0 ± 1.5 ^c	4.9 ± 0.6 ^a	0.013 ± 0.001 ^a	0.38 ± 0.08 ^b	0.11 ± 0.03 ^a	0.49 ± 0.11 ^b	0.11 ± 0.02 ^b
2	8.5 ± 0.3 ^a	6.7 ± 0.4 ^a	12.0 ± 0.5 ^a	41.1 ± 1.2 ^a	5.5 ± 0.5 ^a	0.015 ± 0.001 ^a	0.62 ± 0.03 ^a	0.18 ± 0.01 ^a	0.81 ± 0.05 ^a	0.18 ± 0.01 ^a
3	7.4 ± 0.2 ^b	5.7 ± 0.4 ^a	11.3 ± 0.5 ^{ab}	35.8 ± 1.0 ^b	5.1 ± 0.4 ^a	0.014 ± 0.001 ^a	0.49 ± 0.06 ^{ab}	0.15 ± 0.02 ^a	0.64 ± 0.07 ^{ab}	0.14 ± 0.02 ^{ab}

groEL2 заметно снижала ростостимулирующую активность микроботрофа *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4.

Влияние инокуляции на активность антиоксидантных ферментов и уровень МДА в условиях температурного стресса. Как известно, защитная реакция растений на окислительный стресс обеспечивается многоступенчатой системой антиоксидантной защиты [52, 53]. Показано, что кратковременный температурный стресс приводил к усилению перекисного окисления липидов у растений салата и формированию ответных антиоксидантных реакций. Так активность каталазы максимально возрастала после теплового шока у контрольных растений (на 85%), тогда как у растений, инокулированных штаммами DM4 и DM4 *ΔgroEL2*, она повышалась на 40.5 и 20.5% соответственно (рис. 3а). При этом активность пероксидазы в тканях растений после стресса увеличивалась в 1.5–1.6 раза во всех вариантах без достоверных различий между ними (рис. 3б). Степень повреждения мембран

при стрессовом воздействии оценивали по уровню перекисного окисления липидов (ПОЛ). Маркером уровня окислительного стресса в растительной клетке служила интенсивность образования МДА, являющегося конечным продуктом ПОЛ [52]. В результате обнаружено, что по сравнению с показателями, полученными в нормальных условиях, при стрессе содержание МДА достоверно повышалось в тканях как контрольных растений салата, так и инокулированных штаммами DM4 и DM4 *ΔgroEL2* (на 41–63%) (рис. 3в). Отмечено также, что уровень МДА в контрольном варианте был выше, чем в растениях, обработанных штаммами DM4 и DM4 *ΔgroEL2*, как до (в 1.5–1.6 раза), так и после стресса (в 1.6 и 1.3 раза соответственно). Полученные результаты свидетельствуют о более высоком содержании активных форм кислорода (АФК) (гидроксильный и супероксид-радикалы, пероксид водорода и др.) в клетках контрольных растений и согласуются с существенным повышением у них активности каталазы, которая работает

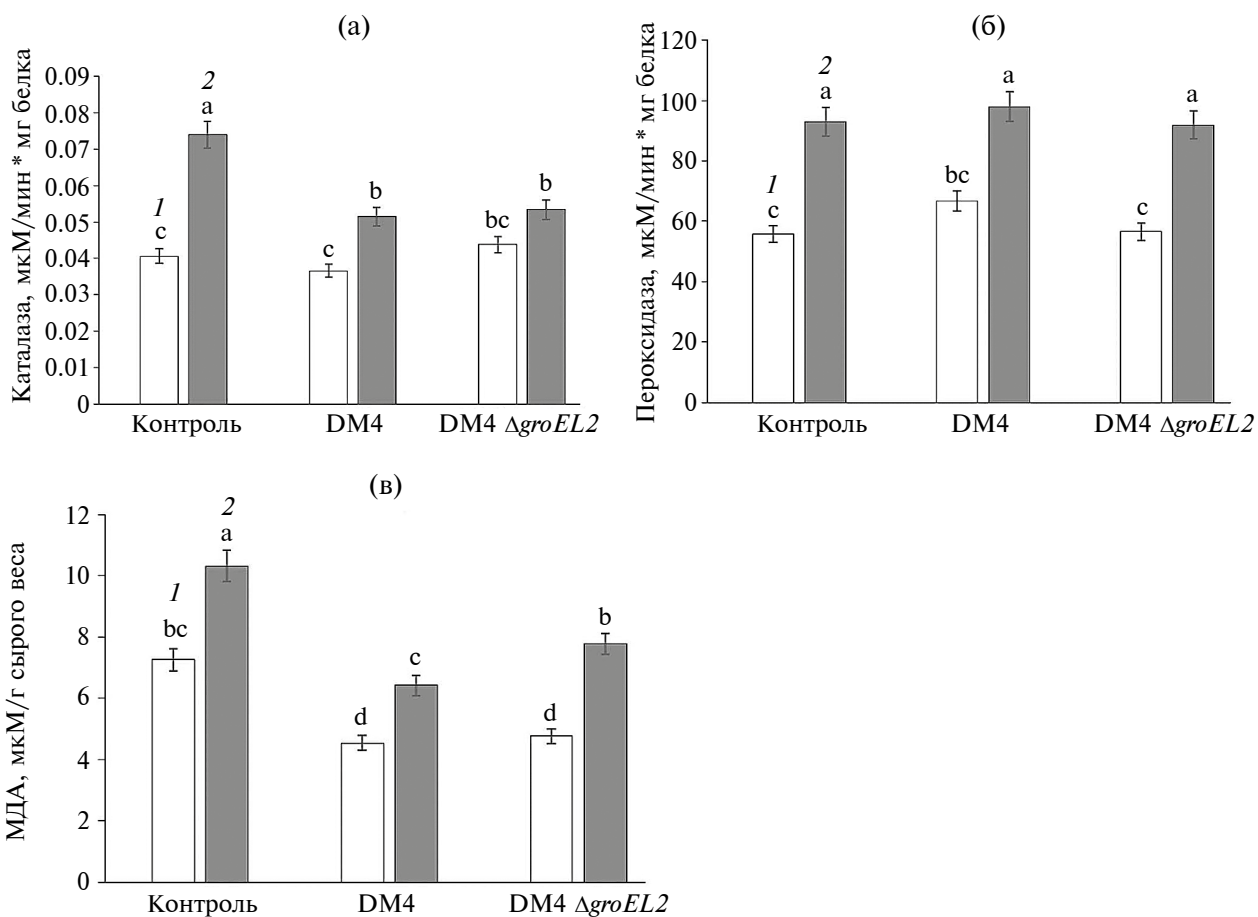


Рис. 3. Активности ферментов антиоксидантной защиты — каталазы (а) и пероксидазы (б), а также концентрация эндогенного МДА (в) у растений салата, инокулированных штаммами *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 и DM4 *ΔgroEL2* и неинокулированных (контроль), в нормальных условиях (1) и после воздействия температурного стресса (2). Достоверные различия ($p < 0.05$) между вариантами отмечены разными буквами.

при высоких концентрациях АФК, в отличие от пероксидазы, которая функционирует при относительно низком их содержании [54]. При этом более высокая устойчивость системы антиоксидантной защиты инокулированных растений, подвергнутых “шоковому” воздействию, позволяет предположить, что растение может лучше приспосабливаться к кратковременному стрессу и легче его переносить вместе с клетками мителотрофов. Тем не менее, нами было также обнаружено, что инокуляция растений салата штаммом DM4 дикого типа приводила к меньшему повреждению клеточных структур при тепловом стрессе (более чем на 20%), нежели обработка лишенным гена *groEL2* производным (рис. 2в). Этот эффект дополнительно подтвердил предположение о важной роли шаперонина GroEL2 в формировании стресс-ответа и согласуется с ранее описанной [17] повышенной чувствительностью нокаут-мутанта DM4 $\Delta groEL2$ к целому ряду неблагоприятных факторов.

В настоящей работе проведен анализ генома мителотрофа *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 на наличие генетических детерминант, указывающих на его потенциал как стимулятора роста растений. Для данного штамма и его нокаут-мутанта по гену *groEL2* выявлен ряд механизмов, способствующих улучшению роста растений. Так, инокуляция растений салата штаммом DM4 стимулировала рост и развитие побегов, формирование корневой системы, положительно влияла на работу фотосинтетического аппарата, а также повышала адаптивную защиту и устойчивость к кратковременному температурному стрессу в вегетационных опытах. Вместе с тем, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что нарушение структуры гена *groEL2* у штамма DM4 оказывало негативное влияние на потенциал этого организма как стимулятора роста и развития растений, снижая у него продукцию ауксинов и способность к солюбилизации нерастворимых фосфатов. Однако, поскольку основной ауксин, ИУК, является важной сигнальной молекулой самих бактерий, вовлеченной в регуляцию экспрессии генов, связанных с выживанием в неблагоприятных условиях, снижение его синтеза, вероятнее всего, указывало на общее нарушение у мутанта DM4 $\Delta groEL2$ стресс-ответа. Несмотря на заметно меньший стимулирующий эффект, оказываемый на растения штаммом, лишенным гена *groEL2*, по сравнению с исходным, участие шаперонина GroEL2 в фитостимулирующих процессах у *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4, по-видимому, является опосредованным и обусловлено, главным образом, его ролью в стресс-ответе. Дальнейшие исследования функций белков GroEL различных групп сходства у штаммов РОФМ, выделенных из техногенных и природных местообитаний, могут прояснить их значение для мителотрофных стимуляторов роста растений и деструкторов

C_1 -соединений и выявить новые мишени для их генетической инженерии с целью использования в агробиотехнологии и биоремедиации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-24-00377, <https://rscf.ru/project/23-24-00377/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Trotsenko Y.A., Khmelenina V.N. // Microbiology (Moscow). 2002. V. 71. P. 123–132. <https://doi.org/10.1023/A:1015183832622>
2. Vuilleumier S. // Biotechnology for the Environment: Strategy and Fundamentals. / Eds. S. N. Agathos, W. Reineke.: Springer Dordrecht, 2002. P. 105–130. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0357-5_7
3. Torgonskaya M.L., Doronina N.V., Hourcade E., Trotsenko Y.A., Vuilleumier S. // J. Basic Microbiol. 2011. V. 51. P. 296–303. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000280>
4. Vorholt J.A. // Nat. Rev. Microbiol. 2012. V. 10. P. 828–840. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2910>
5. Fall R., Benson A.A. // Trends Plant Sci. 1996. V. 1. № 9. P. 296–301. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)88175-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)88175-0)
6. Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. // Микробиология. 2011. Т. 80. № 4. С. 435–446.
7. Агафонова Н.В., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. // Микробиология. 2014. Т. 83. № 1. С. 28–32. <https://doi.org/10.7868/S0026365614010029>
8. Kwak M.J., Jeong H., Madhaiyan M., Lee Y., Sa T.M., Oh T.K., Kim J.F. // PLoS ONE. 2014. V. 9. P. e106704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106704>
9. Alessa O., Ogura Y., Fujitani Y., Takami H., Hayashi T., Sahin N., Tani A. // Front Microbiol. 2021. V. 12. P. 740610. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.740610>
10. Kumar C.M., Mande S.C., Mahajan G. // Cell Stress Chaperones. 2015. V. 20. № 4. P. 555–574. <https://doi.org/10.1007/s12192-015-0598-8>
11. Hayer-Hartl M., Bracher A., Hartl F.U. // Trends Biochem. Sci. 2016. V. 41. P. 62–76. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.07.009>

12. Mizobata T., Kawata Y. // Biophys. Rev. 2018. V. 10. P. 631–640.
<https://doi.org/10.1007/s12551-017-0332-0>
13. Fischer H.M., Schneider K., Babst M., Hennecke H. // Arch. Microbiol. 1999. V. 171. P. 279–289.
<https://doi.org/10.1007/s002030050711>
14. Bittner A.N., Foltz A., Oke V. // J. Bacteriol. 2007. V. 189. P. 1884–1889.
<https://doi.org/10.1128/jb.01542-06>
15. Torgonskaya M. L., Firsova Y.E., Ekimova G.A., Grouzdev D.S., Agafova N.V. // Microbiology (Moscow). 2024. V. 93. P. 14–27.
<https://doi.org/10.1134/S0026261723601768>
16. Doronina N.V., Trotsenko Y.A., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Leisinger T. // Syst. Appl. Microbiol. 2000. V. 23. P. 210–218.
[https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(00\)80007-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80007-7)
17. Firsova Y.E., Torgonskaya M.L. // Antonie van Leeuwenhoek. 2020. V. 113. P. 101–116.
<https://doi.org/10.1007/s10482-019-01320-5>
18. Green P.N., Ardley J.K. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 2727–2748.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002856>
19. Firsova Y.E., Torgonskaya M.L., Trotsenko Y.A. // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 796–803.
<https://doi.org/10.1134/S002626171506003X>
20. Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., De Jongh M., Disz T., Edwards R.A. et al. // BMC genomics. 2008. V. 9. P. 1–15.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
21. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. 6614–6624.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>
22. Kanehisa M., Sato Y., Kawashima M., Furumichi M., Tanabe M. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. D457–D462.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1070>
23. Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Мустахимов И.И., Агафонова Н.В., Троценко Ю.А. // Микробиология. 2017. Т. 86. № 1. С. 107–113.
<https://doi.org/10.7868/S0026365617010086>
24. Gordon S.A., Weber R.P. // Plant Physiol. 1951. V. 26. № 1. P. 192–195.
<https://doi.org/10.1104/pp.26.1.192>
25. Schwyn B., Neilands J.B. // Anal. Biochem. 1987. V. 160. № 1. P. 47–56.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
26. Wang S., Wang J., Zhou Y., Huang Y., Tang X. // Curr. Microbiol. 2022. V. 79. № 2. P. 66.
<https://doi.org/10.1007/s00284-021-02755-8>
27. Rodríguez H., Gonzalez T., Selman G. // J. Biotechnol. 2000. V. 84 (2). P. 155–161.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00347-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00347-3)
28. Son H.J., Park G.T., Cha M.S., Heo M.S. // Bioresour. Technol. 2006. V. 97. № 2. P. 204–210.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.021>
29. Jiang L., Seo J., Peng Y., Jeon D., Park S.J., Kim C.Y. et al. // AMB Express. 2023. V. 13. P. 9.
<https://doi.org/10.1186/s13568-023-01514-1>
30. Siegel M. // Anal. Biochem. 1965. V. 11. P. 126–132.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90051-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90051-5)
31. Winternans J.F.G.M., De Mots A. // Biochim. Biophys. Acta. 1965. V. 109. P. 448–453.
32. Агафонова Н.В., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 2. С. 210–216.
<https://doi.org/10.7868/S0555109916020021>
33. Чернядьев И.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. С. 466–471.
34. Pine L., Hoffman P.S., Malcolm G.B., Benson R.F., Keen M.G. // J. Clin. Microbiol. 1984. V. 20. P. 421–429.
<https://doi.org/10.1128/jcm.20.3.421-429.1984>
35. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
36. Costa H., Gallego S.M., Tomaro M.L. // Plant Sci. 2002. V. 162. P. 939–945.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00051-1)
37. Vuilleumier S., Chistoserdova L., Lee M.C., Bringel F., Lajus A. et al. // PLoS ONE. 2009. V. 4. P. e5584.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005584>
38. Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. P. 2431–2452.
<https://doi.org/10.1093/jxb/err004>
39. Arif Y., Hayat S., Yusuf M., Bajguz A. // Plant Physiol. Biochem. 2021. V. 158. P. 372–384.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.045>
40. Jha P., Panwar J., Jha P.N. // J. Environ. Sustain. 2018. V. 1. P. 25–38.
<https://doi.org/10.1007/s42398-018-0011-5>
41. Verma V.C., Singh S.K., Prakash S. // J. Basic Microbiol. 2011. V. 51. P. 550–556.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201000155>
42. Ghavami N., Alikhani H.A., Pourbabaei A.A., Besharati H. // J. Plant Nutr. 2017. V. 40. № 5. P. 736–746.
<https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1262409>
43. Bianco C., Imperlini E., Defez R. // Plant Signal Behav. 2009. V. 4. P. 763–765.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erp140>
44. Spaepen S., Das F., Luyten E., Michiels J., Vanderleyden J. // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 291. P. 195–200.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01453.x>
45. Федоров Д.Н., Бут С.Ю., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. // Микробиология. 2009. Т. 78. № 6. С. 844–846.
46. Patten C.L., Blakney A.J.C., Coulson T.J.D. // Crit. Rev. Microbiol. 2013. V. 39. P. 395–415.
<https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.716819>

47. Lin H.R., Shu H.Y., Lin G.H. // Microbiol. Res. 2018. V. 216. P. 30–39.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.08.004>
48. Duca D.R., Glick B.R. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 8607–8619.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10869-5>
49. Kunkel B.N., Johnson J.M.B. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2021. V. 13. P. a040022.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040022>
50. Ivanova L.A., Zolotareva N.V., Ronzhina D.A., Podgaevskaya E.N., Migalina S.V., Ivanov L.A. // Flora. 2018. V. 239. P. 11–19.
<https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.11.005>
51. Esteban R., Barrutia O., Artetxe U., Fernández-Marín B., Hernández A., García-Plazaola J.I. // New Phytologist. 2015. V. 206. P. 268–280.
<https://doi.org/10.1111/nph.13186>
52. Mittler R. // Trends Plant Sci. 2002. V. 7. P. 405–410.
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
53. Нарайкина Н.В., Синькевич М.С., Дерябин А.Н., Трунова Т.И. // Физиология растений. 2018. Т. 65. № 5. С. 340–347.
<https://doi.org/10.1134/S0015330318050226>
54. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур. М.: Дрофа, 2010. 638 с.

Phytostimulation Activity of *Methylobacterium dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 and Its *groEL2* Gene Knockout Mutant

N. V. Agafonova^{a,*}, G. A. Ekimova^a, Y. E. Firsova^a, and M. L. Torgonskaya^a

^aSkryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Federal Research Center Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: nadyagafonova@gmail.com

For the first time, the genome of the dichloromethane destructor *Methylobacterium dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 was analyzed for the presence of genetic determinants indicating its potential as a plant growth stimulator, and the ability of this strain and its *groEL2* gene mutant for the to improve plant growth was determined. The genome of strain DM4 contains genes involved in the biosynthesis of phytohormones (indolyl-3-acetic acid and cytokinins), siderophores, carotenoids, poly-β-hydroxybutyrate, hydrolytic enzymes, as well as enzymes involved in the degradation of D-cysteine, protection from UV-damage and phosphate solubilization. Inoculation of lettuce sprouts by strain DM4 had a positive effect on plant growth and development, and increased adaptive defense and resistance to short-term temperature stress in plant growth experiments. Comparative analysis of the production of auxins, siderophores, hydrolytic enzymes, D-cysteine desulfohydase activity, and the ability to solubilize insoluble phosphates in strains DM4 and DM4 $\Delta groEL2$ showed that disruption of the *groEL2* gene led to a decrease in the synthesis of indole derivatives and phosphate solubilizing ability in the mutant strain. Assessment of the impact of inoculation of lettuce plants by these strains also demonstrated a decrease in the phytostimulation potential of DM4 $\Delta groEL2$ compared to the original strain. The data obtained indicate that the chaperonin GroEL2 in *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 indirectly affects its phytostimulation activity.

Keywords: pink-pigmented facultative methylotrophs, plant growth stimulation, phytostimulation activity, stress, chaperonins, *Methylobacterium*