



© В. Е. Цыганов<sup>1</sup>,  
А. В. Цыганова<sup>1</sup>,  
В. А. Ворошилова<sup>1,3</sup>,  
А. Ю. Борисов<sup>1</sup>,  
И. А. Тихонович<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии;

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и селекции;

<sup>3</sup> ООО «Пи Эс Ай»

✿ С использованием одиночных мутантных линий гороха SGEFix<sup>-</sup>-2 (*sym33*) и RisFixV (*sym42*), характеризующихся различными аномалиями в развитии симбиотического клубенька, в том числе утолщенными стенками инфекционных нитей, была создана двойная мутантная линия RBT4, несущая пару симбиотических генов *sym33* и *sym42*.

Выявлен эпистаз мутантной аллели *sym33* над мутантной аллелью *sym42* в отношении гистологической и ультраструктурной организации клубеньков. Таким образом, показано функционирование гена *Sym33* на более раннем этапе развития симбиотического клубенька, по сравнению с геном *Sym42*.

✿ **Ключевые слова:** растительно-микробные взаимодействия; развитие симбиотического клубенька; взаимодействие генов; эпистаз; инфекционная нить.

## АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ ГОРОХА (*Pisum sativum* L.) *Sym33* И *Sym42*, МУТАЦИИ В КОТОРЫХ ПРИВОДЯТ К АНОМАЛИЯМ В РАЗВИТИИ ИНФЕКЦИОННЫХ НИТЕЙ

Симбиотический клубень, формируемый на корнях бобовых растений, является новым органом, обеспечивающим создание оптимальных условий для процесса фиксации атмосферного азота дифференцированными формами клубеньковых бактерий (ризобий) — бактериоидами (Цыганова и др., 2011). Для того чтобы ризобии могли достичь ткани клубенька, растение формирует специальную тубулярную структуру — инфекционную нить, которая ограничивает свободное распространение бактерий по клеткам корня бобового растения (Brewin, 2004). Инфекционная нить окружена стенкой, которая по своему составу схожа с первичной клеточной стенкой и включает в себя: целлюлозу, ксилоглюкан, метил-этерифицированные и неэтерифицированные пектины (Rae et al., 1992). Внутреннее пространство заполнено бактериями, погруженными в матрикс инфекционной нити, одним из основных компонентов которого являются арабиногалактанпротеин-экстензины (Rathbun et al., 2002; Brewin, 2004; Цыганова и др., 2009). При этом по мере продвижения бактерий по инфекционной нити и последующего их высвобождения в цитоплазму растительной клетки наблюдается смена состава поверхностных полисахаридов бактерий (Цыганова, Цыганов, 2012).

У гороха ранее были описаны мутанты с аномально утолщенными стенками инфекционных нитей: по гену *sym33* (SGEFix<sup>-</sup>-2, SGEFix<sup>-</sup>-5, RisFixU (Tsyganov et al., 1998; Voroshilova et al., 2001; Цыганов и др., 2012)) и по гену *sym42* (RisFixV (Engvild, 1987; Novák et al., 1995; Morzhina et al., 2000)). Недавно было показано, что ген *Sym33* кодирует ядерный биспиральный белок, который взаимодействует с кальций/кальмодулин-зависимой киназой (Ovchinnikova et al., 2011). Для гена *Sym42* к настоящему времени его последовательность не выявлена.

Создание двойных мутантных линий и анализ их фенотипических проявлений является удобным инструментом для исследования типа взаимодействия генов. Более того анализ двойных мутантов позволяет установить последовательность функционирования исследуемых генов, даже если неизвестна их нуклеотидная последовательность. Ранее такой подход был успешно использован нами для анализа типов взаимодействия и последовательности функционирования симбиотических генов *Sym13*, *Sym31*, *Sym33* и *Sym40* (Borisov et al., 1997; Tsyganov et al., 2003; Цыганов и др., 2010).

Целью данной работы являлось создание двойной мутантной линии, несущей мутации по генам *sym33* и *sym42* и исследование типов взаимодействия и последовательности функционирования этих генов.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### *Растительный материал*

В исследовании были использованы два Fix<sup>-</sup> мутанта SGEFix<sup>-</sup>-2 (*sym33*) (Tsyganov et al., 1998) и RisFixV (*sym42*) (Engvild, 1987), а также соответ-

Поступила в редакцию 04.07.2012  
Принята к публикации 02.11.2012

твующая исходная линия SGE (Kosterin, Rozov, 1993) и сорт дикого типа Finale (Engvild, 1987) из коллекции ГНУ ВНИИСХМ.

#### *Штаммы бактерий*

При проведении генетических экспериментов растения были инокулированы коммерческим штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* CIAM 1026 (Safonova, Novikova, 1996) из коллекции ГНУ ВНИИСХМ. В исследованиях по ультраструктурному анализу клубеньков был использован штамм 3841 (Wang et al., 1982) из коллекции Центра Джона Иннеса (Великобритания). В исследованиях гистологической организации клубеньков был использован штамм VF39 *gusA* (*const.*). Данный штамм, любезно предоставленный У.Б. Прифер (Аахенский технический университет, Германия), характеризовался конститутивной экспрессией репортерного гена *gusA* (Voroshilova et al., 2001).

#### *Конструирование двойной мутантной линии*

После скрещивания мутантных линий SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33*) и RisFixV (*sym42*) было получено поколение F<sub>2</sub> путем самоопыления растений F<sub>1</sub>. Двойное рецессивное гомозиготное растение было отобрано и размножено после анализа поколений F<sub>2</sub> и F<sub>3</sub> на основе фенотипических различий в морфологии клубеньков одиночных мутантных линий. Генотип отобранного двойного мутанта был подтвержден контрольными возвратными скрещиваниями растений поколения F<sub>5</sub> с родительскими одиночными мутантными линиями. Двойная мутантная линия RBT4 была создана после отбора в ряду 10 поколений. Данная селекция была необходима для отбора форм, проявляющих отсутствие расщепления по морфологическим признакам, т.к. в скрещивания были вовлечены мутанты, полученные на разном генетическом фоне: SGE и Finale.

#### *Условия выращивания и сбор материала для анализа*

Для проведения генетических экспериментов и размножения растения выращивались в условиях, описанных ранее (Borisov et al., 1992). Для сравнительного анализа одиночных и двойной мутантных линий растения были выращены в климатических камерах VB1514 (Vöthch, Германия) в режиме день/ночь 16/8 ч, 21/19 °С, относительной влажности 75 %, при освещенности 38 тыс. люкс. Безазотный питательный раствор и методика инокуляции семян были описаны ранее (Borisov et al., 1997).

Для электронной и световой микроскопии растения были выращены в стерильном вермикулите.

Для электронной микроскопии клубеньки (10 растений на вариант) собирали на 14-й день после инокуляции, а для световой микроскопии (5 растений на вариант) на 28-й день после инокуляции.

Для визуализации бактерий с использованием репортерного гена (во время инфекционного процесса и во время развития поздних стадий клубенька), клубеньки окрашивали по ранее описанной методике

(Voroshilova et al., 2001). При изучении стадий клубенькообразования срезы клубеньков толщиной 70 мкм получали посредством микротомы с вибрирующим лезвием VT 1000 S («Leica Microsystems Wetzlar GmbH», Германия).

#### *Анализ методами световой микроскопии*

Все образцы были изучены с использованием микроскопа Opton Axiovert35 («Opton Feinttechnik GmbH», Германия).

#### *Электронномикроскопический анализ*

Клубеньки после сбора были перенесены непосредственно в 2,5%-й водный раствор глутаральдегида (Sigma-Aldrich, Германия) на 0,05 М какодилатном буфере (рН 7,2). После 16 ч фиксации при комнатной температуре клубеньки были проведены по серии спиртов возрастающей концентрации при -35 °С, далее пропитаны и залиты в акриловую смолу London Resin White (Sigma-Aldrich, Германия) с использованием бензоинметилэфира в качестве катализатора для УФ-полимеризации при -20 °С.

Для просвечивающей электронной микроскопии ультратонкие срезы (90–100 нм) были собраны на золотые сеточки, покрытые 4%-м раствором пироксилина и углеродом. Срезы были контрастированы 2%-м водным раствором уранилацетата в течение 1 ч и цитратом свинца в течение 1 мин. Ткани клубеньков были исследованы и сфотографированы на просвечивающем электронном микроскопе JEOL JEM-1200 EM (JEOL Corp., Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

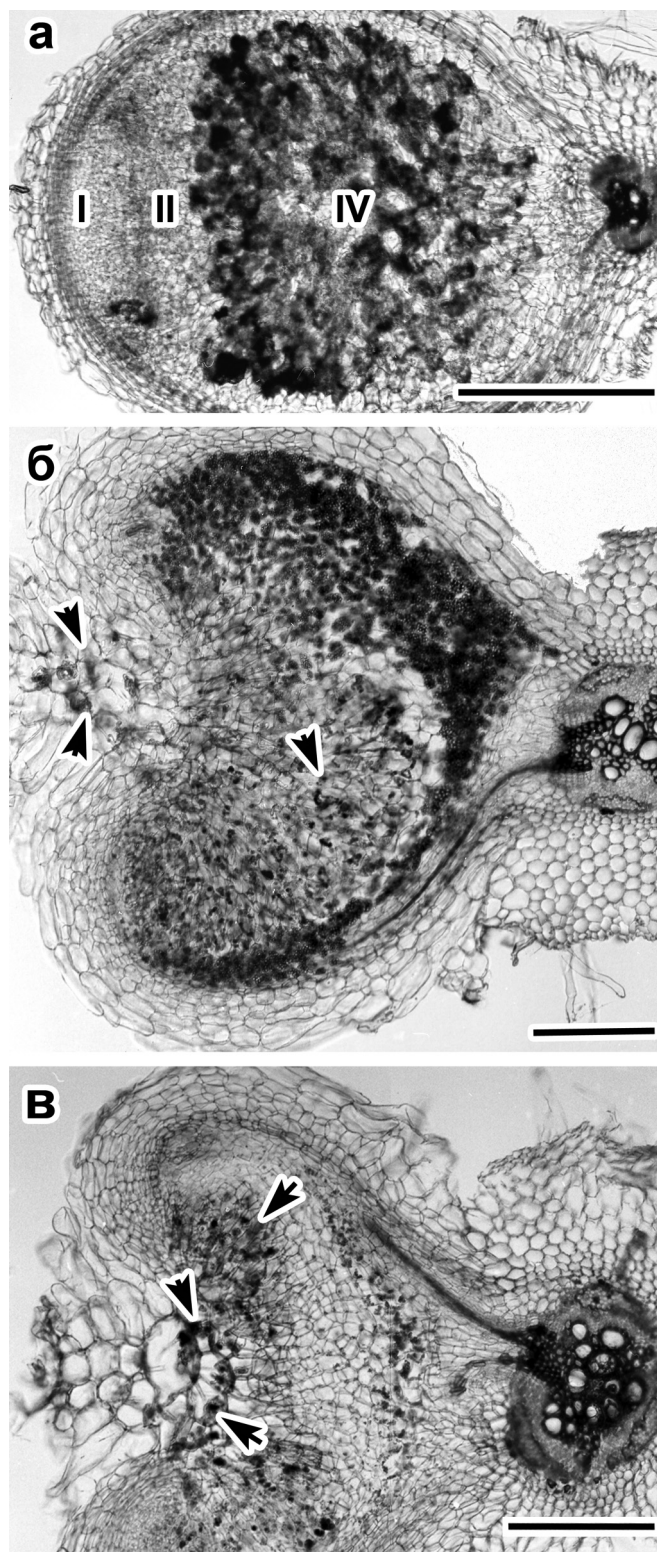
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### *Создание двойной мутантной линии RBT4*

Двойное гомозиготное растение, несущее пару генов: *sym33*, *sym42* было отобрано при анализе поколений F<sub>2</sub> и F<sub>3</sub> от скрещиваний мутантной линии SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33*) с мутантной линией RisFixV (*sym42*). Основными критериями отбора были фенотипические различия в морфологии клубеньков одиночных мутантов. У двойного мутанта, несущего аллели *sym33*, *sym42*, растение проявляло мутантный фенотип клубеньков, сходный с фенотипом клубеньков SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33*). После размножения до поколения F<sub>5</sub> растения были возвратно скрещены с каждым родительским мутантом. Анализ потомства от этих возвратных скрещиваний подтвердил, что отобранная комбинация была рецессивной дигомозиготой по генам *sym33*, *sym42*. Двойная мутантная линия была названа RBT4 (*sym33*, *sym42*).

#### *Параметры клубенькообразования*

Растения двойной мутантной линии RBT4 (*sym33*, *sym42*) формировали небольшие белые клубеньки с темной ямкой на дистальной части клубенька, подобные одному из типов клубеньков мутантной линии SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33*). В использованных условиях появ-



**Рис. 1.** Гистологическая структура клубеньков: а — RisFixV (*sym42*); б — SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33*); в — RBT4 (*sym33*, *sym42*). I, II, IV: гистологические зоны клубенька: меристема, зона инфекции, зона старения соответственно, зона III (зона азотфиксации) — отсутствует (отмечены там, где идентифицируются); стрелки — инфекционные нити; масштабная линейка — 0,4 мм

ления второго типа клубеньков — розоватого цвета — не наблюдалось ни у SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33*), ни у RBT4 (*sym33*, *sym42*).

#### Гистологическая организация клубеньков

Линия RBT4 (*sym33*, *sym42*) характеризовалась отсутствием типичной зональности клубенька (рис. 1 б). Значительную часть клубенька занимала сильно разветвленная инфекционная нить (рис. 1 б). Сходная организация была характерна для клубеньков одиночной мутантной линии SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33*) (рис. 1 в), но сильно отличалась от клубеньков другой одиночной мутантной линии RisFixV (*sym42*), для которой были характерны редукция зоны азотфиксации и гипертрофия зоны старения (рис. 1 а), так же как и от клубеньков генотипов дикого типа SGE и Finale (данные не представлены).

#### Ультраструктурная организация клубеньков

В клубеньках двойной мутантной линии RBT4 (*sym33*, *sym42*) не были выявлены инфицированные клетки, сильно разветвленная инфекционная нить была окружена утолщенной клеточной стенкой (рис. 2 а). Сходный фенотип наблюдался для клубеньков одиночной мутантной линии SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33*) (рис. 2 б), но значительно отличался от другой одиночной мутантной линии RisFixV (*sym42*) (рис. 2 в, г) и от клубеньков генотипов дикого типа SGE и Finale (данные не представлены). Отличительной особенностью мутантной линии RisFixV (*sym42*) был процесс «созревания» и старения инфекционной нити: наблюдалось значительное утолщение стенки инфекционной нити с инфильтрацией электронно-светлым материалом, бактерии внутри инфекционной нити показали признаки деградации (рис. 2 г).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Фенотипические проявления мутаций по генам *sym33* и *sym42* активно изучались на протяжении длительного времени. Для гена *sym33* было описано 3 независимо полученных мутанта: SGEFix<sup>-2</sup> (Tsyganov et al., 1998), SGEFix<sup>-5</sup> (Цыганов и др., 2012) с использованием лабораторной линии SGE и RisFixU с использованием сорта Finale (Engvild, 1987). Характерной чертой всех трех мутантов является формирование инфекционных нитей, окруженных утолщенными стенками, из которых не наблюдается эндоцитоз бактерий в цитоплазму растительной клетки (Tsyganov et al., 1998; Voroshilova et al., 2001; Ovchinnikova et al., 2011), хотя для мутанта SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33*) был описан выход бактерий в отдельных клетках (Voroshilova et al., 2001), а также формирование розоватых клубеньков в которых происходит эндоцитоз бактерий (Tsyganov et al., 1998). Для мутанта RisFixV (*sym42*) характерно формирование инфекционных нитей, которые с возрастом окружаются чрезвычайно утолщенной стенкой (Novak et al., 1995; Morzhina et al., 2000). Данные утолщения стенок инфекционных нитей являются проявлениями

сильных защитных реакций со стороны растения, которые индуцируются при формировании неэффективного симбиоза. Однако следует отметить, что сих пор не проведен детальный анализ состава утолщенных стенок инфекционных нитей, формируемых мутантами по генам *sym33* и *sym42*.

В данной работе была создана линия RBT4 — дигомозигота по генам *sym33* и *sym42*. Данная линия характеризовалась формированием клубеньков, которые по внешнему виду, гистологической и ультраструктурной организации сходны с клубеньками одной из родительских мутантных линий — SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33*). Таким образом, было показано эпистатирование мутантой аллели гена *sym33* над мутантной аллелью гена *sym42*. В свою очередь, это свидетельствует о вовле-

чении гена *Sym33* в процесс формирования симбиотического клубенька гороха на более ранней стадии, по сравнению с геном *Sym42*.

С использованием анализа геномной синтении между горохом и модельным бобовым растением *Medicago truncatula* недавно была выявлена молекулярная природа гена *Sym33*, который оказался ядерным биспиральным белком, взаимодействующим с ключевым белком бобово-ризобияльного и арбускулярно-микоризного симбиоза — кальций/кальмодулин-зависимой киназой, кодируемой у гороха геном *Sym9*, которая воспринимает генерируемые в ходе развития симбиозов внутриклеточные осцилляции кальция (Levy et al., 2004; Ovchinnikova et al., 2011). При этом в зависимости от частоты и амплитуды этих осцилляций, различающих-

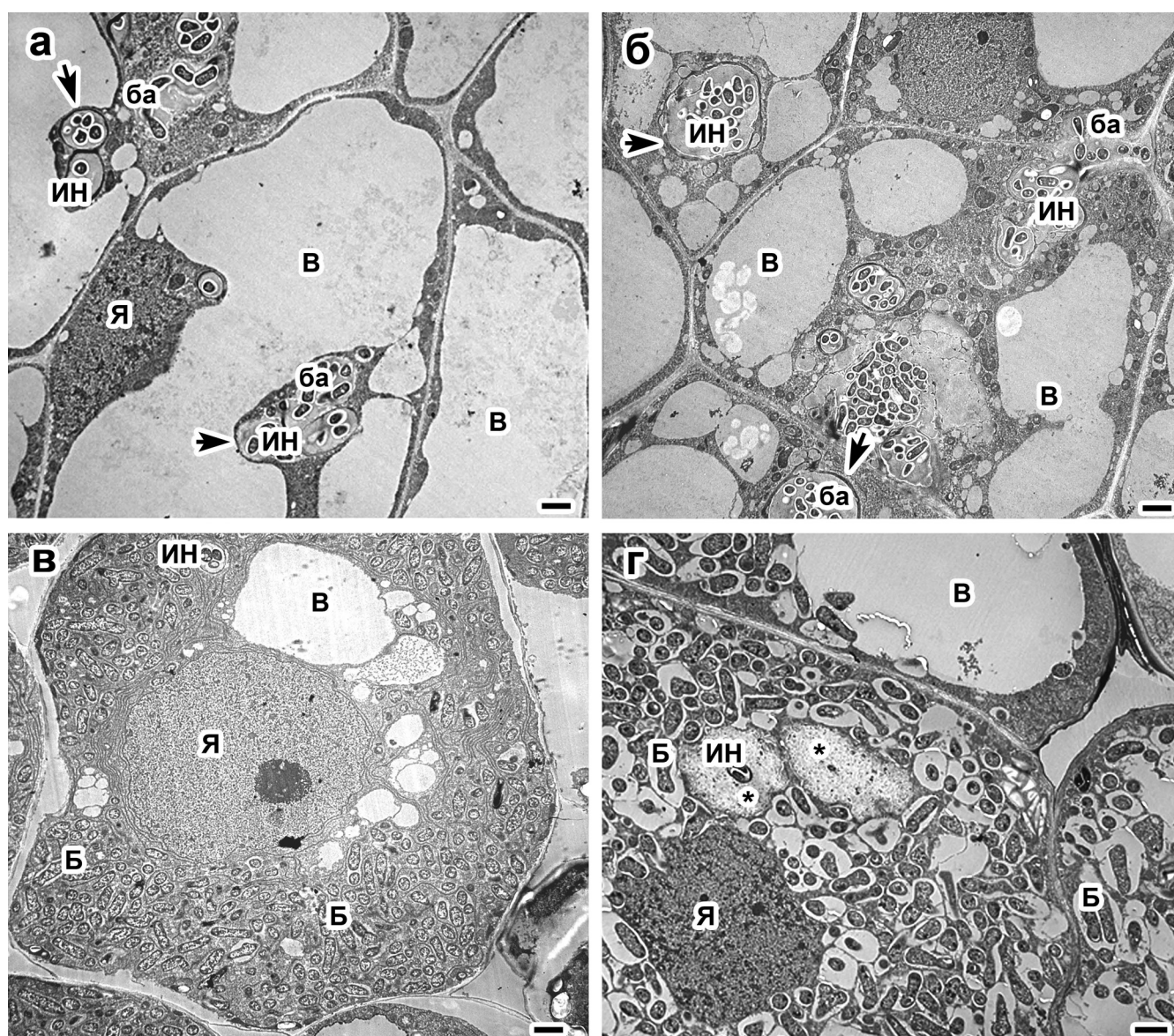


Рис. 2. Ультраструктурная организация клубеньков: а — RBT4 (*sym33*, *sym42*); б — SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33*); в, г — RisFixV (*sym42*). Стрелки указывают на стенки инфекционной нити, ИН — инфекционная нить, ба — бактерия, Б — бактероид; Я — ядро, В — вакуоль, \* — утолщенная стенка инфекционной нити у мутанта RisFixV, масштабная линейка — 2 мкм

ся при взаимодействии растения с микоризными грибами и ризобиями, в дальнейшем активируется экспрессия определенных генов, приводящая к развитию либо эндомикоризного, либо бобово-ризобиального симбиозов (Oldroyd, Downie, 2008). Для гена *Sym42* к настоящему времени его последовательность не выявлена. Тем не менее, как для гена *Sym33*, так и для гена *Sym42* можно предположить важную роль в подавлении защитных реакций растения при формировании эффективных клубеньков.

В заключении нам представляется, что двойная мутантная линия RBT4 является удобной моделью для исследования различных аспектов формирования стенок инфекционной нити в ходе развития симбиотического клубенька гороха.

### Благодарности

Данная работа была финансово поддержана ОНТП Россельхозакадемии, Министерством образования и науки (государственный контракт № 16.552.11.7047, соглашение 8109) и грантом Президента России (НШ–337.2012.4).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Цыганов В.Е., Ворошилова В.А., Розов С.М. и др., 2012. Новая серия симбиотических мутантов гороха, индуцированных на линии SGE // Экол. генетика. Т. X. № 1. С. 19–26.
2. Цыганов В.Е., Селиверстова Е.В., Ворошилова В.А. и др., 2010. Анализ двойных мутантных линий для определения последовательности функционирования генов гороха (*Pisum sativum* L.) *Sym13*, *Sym33* и *Sym40* во время развития симбиотического клубенька // Экол. генетика. Т. VIII. № 2. С. 3–8.
3. Цыганова А.В., Китаева А.Б., Бревин Н.Дж., Цыганов В.Е., 2011. Клеточные механизмы развития симбиотических клубеньков у бобовых растений // Сельскохозяйственная биология. № 3. С. 34–40.
4. Цыганова А.В., Цыганов В.Е., Финдли К.К. и др., 2009. Распределение арабиногалактанпротеино-вэкстензинов в клубеньках мутантов гороха (*Pisum sativum* L.) с нарушениями в развитии инфекционной нити // Цитология. Т. 51. № 1. С. 53–62.
5. Цыганова В.Е., Цыганов В.Е., 2012. Роль поверхностных компонентов ризобий в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями // Усп. соврем. биологии. Т. 132. № 2. С. 211–222.
6. Borisov A. Y., Morzhina E. V., Kulikova O. A. et al., 1992. New symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) affecting either nodule initiation or symbiosome development // Symbiosis. Vol. 14. P. 297–313.
7. Borisov A. Y., Rozov S. M., Tsyganov V. E. et al., 1997. Sequential functioning of *Sym13* and *Sym31*, two genes affecting symbiosome development in root nodules of pea (*Pisum sativum* L.) // Mol. Gen. Genet. Vol. 254. P. 592–598.
8. Brewin N. J., 2004. Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium legume* symbiosis // Critic. Rev. Plant Sci. Vol. 23. P. 293–316.
9. Engvold K. J., 1987. Nodulation and nitrogen fixation mutants of pea (*Pisum sativum*) // Theor. Appl. Genet. Vol. 74. P. 711–713.
10. Kosterin O. E., Rozov S. M., 1993. Mapping of the new mutation *blb* and the problem of integrity of linkage group I // Pisum Genet. Vol. 25. P. 27–31.
11. Lévy J., Bres C., Geurts R. et al., 2004. A putative Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses // Science. Vol. 303. P. 1361–1364.
12. Morzhina E. V., Tsyganov V. E., Borisov A. Y. et al., 2000. Four developmental stages identified by genetic dissection of pea (*Pisum sativum* L.) root nodule morphogenesis // Plant Sci. Vol. 155. P. 75–83.
13. Novák K., Pesina K., Nebesarova J. et al., 1995. Symbiotic tissue degradation pattern in the ineffective nodules of three nodulation mutants of pea (*Pisum sativum* L.) // Ann. Bot. Vol. 76. P. 303–313.
14. Oldroyd G. E., Downie J. A., 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes // Annu. Rev. Plant Biol. Vol. 59. P. 519–546.
15. Ovchinnikova E., Journet E. P., Chabaud M. et al., 2011. IPD3 controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in pea and *Medicago* spp. // Mol. Plant–Microbe Interact. Vol. 24. P. 1333–1344.
16. Rae A. L., Bonfante-Fasolo P., Brewin N. J., 1992. Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum* // Plant J. Vol. 2. P. 385–395.
17. Rathbun E. A., Naldrett M. J., Brewin N. J., 2002. Identification of a family of extensin-like glycoproteins in the lumen of *Rhizobium*-induced infection threads in pea root nodules // Mol. Plant/Microbe Interact. Vol. 15. P. 350–359.
18. Safronova V. I., Novikova N. I., 1996. Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation: lyophilization and liquid nitrogen freezing // J. Microbiol. Methods. Vol. 24. P. 231–237.
19. Tsyganov V. E., Morzhina E. V., Stefanov S. Y. et al., 1998. The pea (*Pisum sativum* L.) genes *sym33* and *sym40* control infection thread formation and root nodule functioning // Mol. Gen. Genet. Vol. 259. P. 491–503.
20. Tsyganov V. E., Voroshilova V. A., Herrera-Cervera J. A. et al., 2003. Developmental downregulation of rhizobial genes as a function of symbiosome differentiation in symbiotic root nodules of *Pisum sativum* L. // New Phytol. Vol. 159. P. 521–530.
21. Voroshilova V. A., Boesten B., Tsyganov V. E. et al., 2001. Effect of mutations in *Pisum sativum* L. genes (*sym13*, *sym31*, *sym33*, *sym40*) blocking different stages of nodule development on the expression of late symbiotic genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // Mol. Plant-Microbe Interact. Vol. 14. P. 471–476.

22. Wang T.L., Wood E.A., Brewin N.J., 1982. Growth regulators, *Rhizobium*, and nodulation of peas // *Planta*. Vol. 155. P. 345–349.

**ANALYSIS OF INTERACTION OF PEA (*Pisum sativum* L.)  
SYMBIOTIC GENES *Sym33* AND *Sym42* WHOSE  
MUTATIONS RESULT IN ABNORMALITIES DURING  
INFECTION THREAD DEVELOPMENT**

*Tsyganov V.E., Tsyganova A.V., Voroshilova V.A.,  
Borisov A.Y., Tikhonovich I.A.*

✿ **SUMMARY:** Using pea single mutant lines SGEFix<sup>-2</sup> (*sym33*) and RisFixV (*sym42*), which are characterized by different abnormalities during symbiotic nodule development, including thickening of infection threads' walls, a double mutant RBT4 line, carrying a pair of symbiotic genes *sym33* and *sym42* was constructed. The epistasis of the mutant allele *sym33* over the mutant allele *sym42* with respect to the histological and ultrastructural organisation of nodules was shown. Thus, it was demonstrated that *Sym33* gene functions earlier in symbiotic nodule development than *Sym42* gene.

✿ **KEY WORDS:** plant-microbe interactions; development of symbiotic nodule; gene interactions; epistasis; infection thread.

✿ Информация об авторах

**Цыганов Виктор Евгеньевич** — к.б.н., заведующий лабораторией. Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, лаборатория молекулярной и клеточной биологии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: tsyganov@arriam.spb.ru.

**Цыганова Анна Викторовна** — к.б.н., ведущий научный сотрудник. Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, лаборатория молекулярной и клеточной биологии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: anna\_khodorenko@arriam.spb.ru.

**Ворошилова Вера Александровна** — к.б.н., специалист по клиническим исследованиям. ООО "Пи Эс Ай". 191119, Санкт-Петербург, ул. Достоевского, д.19/21. E-mail: vera.voroshilova@psi-cro.com.

**Борисов Алексей Юрьевич** — д.б.н., заведующий лабораторией. Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, лаборатория генетики растительно-микробных взаимодействий. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: ayborisov@yandex.ru.

**Тихонович Игорь Анатольевич** — д.б.н., профессор, академик Россельхозакадемии, директор. Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: arriam@arriam.spb.ru, contact@arriam.spb.ru.

**Tsyganov Viktor Evgenyevich** — Head of the laboratory. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology RAAS, Laboratory of Molecular and Cellular Biology. Podbelskiy Ch., 3, Saint-Petersburg, Pushkin-8, 196608, Russia. E-mail: tsyganov@arriam.spb.ru.

**Tsyganova Anna Viktorovna** — Leading scientist. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology RAAS, Laboratory of Molecular and Cellular Biology. Podbelskiy Ch., 3, Saint-Petersburg, Pushkin-8, 196608, Russia. E-mail: anna\_khodorenko@arriam.spb.ru.

**Voroshilova Vera Aleksandrovna** — Expert in clinical trials. Contract Drug Development Company "PSI". Dostoyevskiy St., 19/21, Saint-Petersburg, 191119, Russia. E-mail: vera.voroshilova@psi-cro.com.

**Borisov Aleksey Yuryevich** — Head of the laboratory. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology RAAS, Laboratory of genetics of plant-microbe interactions. Podbelskiy Ch., 3, Saint-Petersburg, Pushkin-8, 196608, Russia. E-mail: ayborisov@yandex.ru.

**Tikhonovich Igor Anatolyevich** — Director, Professor, Full Member of RAAS. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology RAAS. Podbelskiy Ch., 3, Saint-Petersburg, Pushkin-8, 196608, Russia. E-mail: arriam@arriam.spb.ru, contact@arriam.spb.ru.