



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2021. Т. 21, вып. 3. С. 286–291

*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2021, vol. 21, iss. 3, pp. 286–291

<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2021-21-3-286-291>

Научная статья

УДК 579.64

## Получение флуоресцентно меченного эндофитного штамма бактерий *Herbaspirillum lusitanum* P6-12 для их детекции *in vivo* и *in vitro*



А. Р. Багавова<sup>1,2</sup> ✉, Н. С. Величко<sup>2</sup>, Т. Е. Пылаев<sup>2,3,4</sup>, Ю. П. Федоненко<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, 410049, г. Саратов, просп. Энтузиастов, д. 13

<sup>3</sup>Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112

<sup>4</sup>Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока, Россия, 410010, г. Саратов, ул. Тулайкова, д. 7

Багавова Арапат Рустамовна, магистрант кафедры биофизики и биохимии, 99bagavova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6606-7038>

Величко Наталья Сергеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник, [velichko\\_n@ibppm.ru](mailto:velichko_n@ibppm.ru), <https://orcid.org/0000-0001-9734-3947>

Пылаев Тимофей Евгеньевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник, <https://orcid.org/0000-0002-2701-3333>

Федоненко Юлия Петровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биофизики и биохимии, ведущий научный сотрудник, [fedonenko@yandex.ru](mailto:fedonenko@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0003-0255-8190>

**Аннотация.** Методом электропорации получен штамм *Herbaspirillum lusitanum* P6-12, содержащий векторную плазмиду pJN105TurboGFP, которая кодирует синтез зеленого флуоресцирующего белка GFP, и имеющий устойчивость к антибиотику гентамицину. Сконструированный штамм *H. lusitanum* P6-12 по своим культурально-морфологическим и биохимическим свойствам не отличался от исходного типового природного штамма *H. lusitanum* P6-12. На плотных питательных средах рекомбинантный штамм формировал колонии желто-зеленого цвета, флуоресцирующие при УФ-облучении. При инокуляции полученной культурой растительных объектов наблюдали зеленое свечение маркированных клеток *H. lusitanum* P6-12, активно колонизирующих внутреннюю ткань растения-хозяина. Созданный штамм можно использовать в качестве модельного для изучения закономерностей и особенностей поведения организмов в интегрированных системах, в том числе для отслеживания бактериальных клеток в ходе взаимодействия с растениями, оценки их выживаемости, конкурентоспособности и т.д.

**Ключевые слова:** *Herbaspirillum lusitanum* P6-12, эндофитные бактерии, GFP, *Phaseolus vulgaris*

**Для цитирования:** Багавова А. Р., Величко Н. С., Пылаев Т. Е., Федоненко Ю. П. Получение флуоресцентно меченного эндофитного штамма бактерий *Herbaspirillum lusitanum* P6-12 для их детекции *in vivo* и *in vitro* // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2021. Т. 21, вып. 3. С. 286–291. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2021-21-3-286-291>

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

Article

### Obtaining a fluorescently labeled endophytic strain of bacteria *Herbaspirillum lusitanum* P6-12 for their detection *in vivo* and *in vitro*

A. R. Bagavova<sup>1,2</sup> ✉, N. S. Velichko<sup>2</sup>, T. E. Pylayev<sup>2,3,4</sup>, Yu. P. Fedonenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13 Prospekt Entuziastov, Saratov 410049, Russia

<sup>3</sup>Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, 112 Bolshaya Kazachya St., Saratov 410012, Russia

<sup>4</sup>Federal Agricultural Scientific Center of the South-East, 7 Tulaykova St., Saratov 410010, Russia

Bagavova Arapat Rustamovna, 99bagavova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6606-7038>

Natal'ya S. Velichko, [velichko\\_n@ibppm.ru](mailto:velichko_n@ibppm.ru), <https://orcid.org/0000-0001-9734-3947>

Timofey E. Pylayev, <https://orcid.org/0000-0002-2701-3333>

Yuliya P Fedonenko, [fedonenko@yandex.ru](mailto:fedonenko@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0003-0255-8190>



**Abstract.** The *Herbaspirillum lusitanum* P6-12 strain containing the vector plasmid pJN105TurboGFP, which encodes the synthesis of the green fluorescent protein GFP, and which has resistance to the antibiotic gentamicin, was obtained by electroporation. The constructed strain of *H. lusitanum* P6-12 in cultural, morphological and biochemical properties did not differ from the original typical natural strain of *H. lusitanum* P6-12. On solid growth media, the recombinant strain formed yellow-green colonies, fluorescent under UV irradiation. Upon inoculation with the resulting culture of plant objects, a green glow of the marked *H. lusitanum* P6-12 cells, actively colonizing the internal tissues of the host plant, was observed. The created strain can be used as a model strain for studying the patterns and characteristics of the behaviour of organisms in integrated systems, including for tracking bacterial cells during interaction with plants, assessing their survival, competitiveness, etc.

**Keywords:** *Herbaspirillum lusitanum* P6-12, endophytic bacteria, GFP, *Phaseolus vulgaris*

**For citation:** Bagavova A. R., Velichko N. S., Pylayev T. E., Fedonenko Yu. P. Obtaining a fluorescently labeled endophytic strain of bacteria *Herbaspirillum lusitanum* P6-12 for their detection *in vivo* and *in vitro*. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2021, vol. 21, iss. 3, pp. 286–291. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2021-21-3-286-291>

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

## Введение

В условиях нарастающего антропогенного загрязнения экосистем и истощения энергетических ресурсов планеты особую актуальность приобретает поиск экологически безопасных и энергосберегающих подходов для развития устойчивого земледелия и обеспечения населения качественными продуктами питания. Особую значимость для решения этого комплекса проблем имеют исследования процессов становления специфичных симбиотических отношений. Интерес представляют как эпифитные и ризосферные, так и эндофитные микроорганизмы, населяющие внутренние ткани растений и определяющие их устойчивость к патогенам и абиотическим стрессам. В искусственных интегрированных системах, где большую роль играют прикрепление к биотическим поверхностям и их колонизация, необходима визуализация взаимодействия бактерий с корнями. В связи с этим возникает ряд методических проблем, решение которых открывает новые возможности для изучения фундаментальных основ взаимоотношений внутриклеточного симбионта с макропартнером. К числу подобных задач можно отнести необходимость флуоресцентного маркирования штаммов посредством клонирования соответствующих генов, обеспечивающих витальную экспрессию флуорофоров, что позволит исследовать *in vivo* и *in vitro* закономерности и особенности процессов системной колонизации.

Генетический потенциал универсальных бактерий рода *Herbaspirillum* позволяет использовать их не только в составе биопрепаратов, повышающих рост и урожайность, но и в качестве модельного объекта для изучения механизмов мутуалистических взаимоотношений высших организмов с эндосимбионтами. Интересным для исследования представляется выделенный из клубеньков фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) типовой штамм *Herbaspirillum lusitanum* P6-12 [1]. При исследовании его генома было

показано отсутствие азотфиксирующих (*nif*) и генов клубенькообразования (*nod*), необходимых для формирования ризобияльного симбиоза [2], однако показано присутствие систем секреции I и II типов, выводящих наружу белки, помогающие адаптироваться к окружающей среде патогенным микроорганизмам [3]. На основании этого было высказано предположение, что данный вид является условно-патогенной бактерией, способной колонизировать не только клубеньки, но и другие ткани растений.

Таким образом, для определения динамики распространения клеток *H. lusitanum* P6-12 в различных органах инфицированных растений и особенностей их локализации *in planta* необходима визуализация взаимодействия микроорганизма с корнями и побегами растений. Ввиду этого целью данной работы являлось получение флуоресцентно меченого штамма *H. lusitanum* P6-12, характеристика процесса колонизации фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) полученным производным.

## Материалы и методы

В работе использовали типовой штамм *Herbaspirillum lusitanum* P6-12 (IBPPM515), предоставленный Коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>), с целью оценки его влияния на рост фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) и прижизненного маркирования флуоресцентным белком GFP.

Культуру выращивали на жидкой синтетической питательной среде с витаминами [4] при 30 °С в течение 24 ч, что соответствовало окончанию экспоненциальной фазы роста. В качестве селективного антибиотика при трансформации использовали гентамицин (50 мг/мл).

В экспериментах по клонированию применяли плазмидный вектор для экспрессии флуоресцентных белков pJN105TurboGFP, регулируемый конститутивным промотором фага T5, любезно



предоставленный А. Х. Баймиевым, ФГБНУ «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН».

Клетки трансформировали векторной конструкцией с использованием электропорации на приборе MicroPulser («BioRad»), предустановленной программы и протокола для трансформации агробактерий (12,5 кВ/см, 25 мкФ и 200 Ом) в 0,1 см электропорационной кювете.

Перед проведением процедуры электропорации готовили электрокомпетентные клетки. Отбирали 100 мкл ночной культуры, переносили в колбу, содержащую 100 мл среды, и инкубировали при 30 °С при постоянном перемешивании до  $A_{600} \sim 0,1$ . Полученную культуру клеток разделяли на две части по 50 мл и центрифугировали при 7000 g в течение 7 мин при 4 °С. Осадок дважды промывали холодной milli-Q водой и ресуспендировали в 50 мл 10%-ного водного раствора глицерина. Суспензию клеток 100 мкл помещали в эппендорфы (1,5 мл) и хранили при –80 °С.

Меченые бактерии наблюдали на инвертированном флуоресцентном микроскопе Leica DMI3000B, оборудованном камерой Leica 420D CCD (Leica Microsystems, Германия). Для детекции GFP использовали набор светофильтров № 10 (полоса возбуждения BP 450-490, испускания BP 515-565). Препараты корней для флуоресцентной микроскопии готовили следующим образом: стерильными ножницами срезали главный корень фасоли, помещали его между двумя пенопластовыми планшетами и с помощью лезвия делали продольные срезы. Предварительно так же стерильными ножницами срезали боковые корни. Образцы помещали на предметные стекла, добавляли раствор 50 %-ного глицерина в фосфатном буфере (ФБ; 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 130 mM NaCl, pH 7,2) и накрывали покровным стеклом.

Фасоль сорта «Ballada 29», любезно предоставленную ФГБНУ «Федеральный научный центр риса» (Краснодар), промывали водой с детергентом и подвергали поверхностной стерилизации. Семена выдерживали 30 мин в 70 %-ном этиловом спирте, промывали стерильной дистиллированной водой, после этого помещали на 5 мин в 2 %-ный гипохлорит натрия, а затем семикратно промывали стерильной дистиллированной водой. Контроль стерильности осуществляли, выдерживая зерна на плотной агаризованной среде 48 ч при 25 °С [5].

Проросшие семена фасоли, в зависимости от целей эксперимента, инокулировали трансформированной и не трансформированной культурой

*H. lusitanum* P6-12. Фасоль инкубировали в бактериальной суспензии, доведенной до  $A_{600} \sim 0,1$ , в течение 30 мин и для дальнейшего роста помещали в высокие биологические пробирки, заполненные стеклянными шариками и 10 мл жидкой среды для растений. Для меченного флуоресцентным белком GFP штамма *H. lusitanum* P6-12 в среду для растений был добавлен гентамицин (50 мг/мл). Пробирочные растения фасоли выращивали при следующем режиме: фотопериод 16 ч, температура воздуха 24 °С / 19 °С (день / ночь).

Определения динамики титра клеток *H. lusitanum* P6-12 в инфицированных растениях фасоли обыкновенной проводили через 1, 3, 4, 5, 6 и 7 суток после инокуляции. Корни и стебли анализируемых растений подвергали поверхностной стерилизации 2 %-ным раствором гипохлорита натрия (2 мин), 70 %-ным раствором этанола (2 мин) с последующей пятикратной промывкой стерильной дистиллированной водой. Материал асептически растирали в ступке. Разведения гомогенатов в 1 мл PBS высевали на твердую селективную среду для бактерий. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) учитывали через 2 сут с применением чашечного метода Коха [6].

Для оценки влияния культуры *H. lusitanum* P6-12 на рост *P. vulgaris* осуществляли инокуляцию трехсуточных проростков фасоли как описано выше и помещали их в торфяные горшочки с вермикулитом. Для контрольных образцов бактериальный раствор был проавтоклавирован. Растения выращивали при следующем режиме: фотопериод 16 ч, температура воздуха 24 °С / 19 °С (день / ночь) и полив трижды в неделю модифицированным раствором Хогланда (2M  $\text{KNO}_3$ , 2M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Fe(III)-ЭДТА, 2M  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6). Спустя 40 дней после инокуляции растения осторожно извлекали из горшочков, промывали корни водопроводной водой для удаления частиц вермикулита и определяли сырую биомассу растений.

### Результаты и их обсуждение

С помощью трансформации был получен штамм *H. lusitanum* P6-12 + pJN105TurboGFP, меченный флуоресцентным белком GFP. Флуоресцентное свечение штамма *H. lusitanum* P6-12 было проанализировано флуоресцентной микроскопией клеточных суспензий, приготовленных из бактериальных культур, выращенных на чашках Петри с твердой питательной средой (рис. 1).

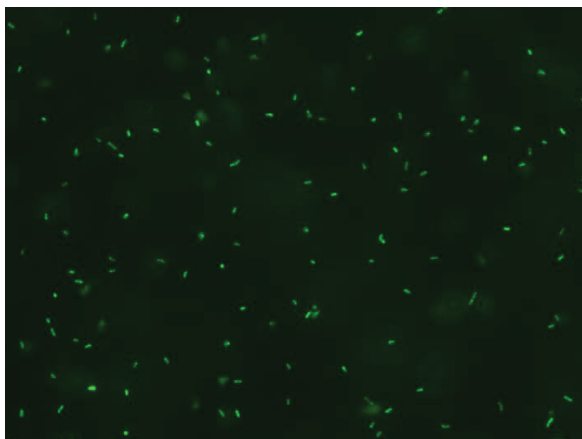


Рис. 1. Изображение GFP-маркированных клеток *H. lusitanum* P6-12+pJN105TurboGFP

Fig. 1. Image of GFP-labeled cells of *H. lusitanum* P6-12+pJN105TurboGFP

GFP-маркированные производные *H. lusitanum* P6-12 были использованы для визуализации взаимодействия исследуемого штамма с корнями растений фасоли обыкновенной.

Флуоресцентная микроскопия корней фасоли, инокулированной GFP-меченым штаммом, позволила подтвердить эндофитную природу бактерий *H. lusitanum* P6-12. В случае длительных экспериментов (40 суток после инокуляции) было зафиксировано наличие бактерий во внутренних тканях корня.

Эндофитная природа *H. lusitanum* P6-12 была показана посредством высева бактерий с поверхностно стерилизованных частей *P. vulgaris* [1]. Однако это не является убедительным доказательством способности микроорганизма проникать

внутри тканей макропартнера. Механизмы эндофитной колонизации практически не изучены. Для других видов гербаспирилл показано, что первоначально происходит прикрепление бактерий к поверхности корня и затем, через механические повреждения ризодермы, микроорганизмы проникают во внутренние ткани растения [7]. Нами впервые проведено флуоресцентное маркирование штамма для визуальной идентификации взаимодействия растения из семейства *Fabaceae* с бактериями *Herbaspirillum* spp. В перспективе комбинированное использование трансформации штаммов (методом электропорации) и флуоресцентной микроскопии может стать инструментом для детального изучения механизма эндофитной колонизации тканей растений.

При определении динамики титра клеток *H. lusitanum* P6-12 в корнях и стеблях фасоли обыкновенной было показано, что исследуемый бактериальный штамм достаточно агрессивно заселяет корни *P. vulgaris*. Концентрация клеток достигает максимального значения к 7-м суткам исследования и после этого содержание бактерий во внутренних органах растения не меняется. Количество бактерий, полученных из поверхностно стерилизованных корней, увеличилось с 4,75 lg КОЕ/г сырой биомассы в 1-е сут. после инокуляции до 6,99 lg КОЕ/г сырой биомассы на 7-е сут. после инокуляции. Отмечена способность бактерий *H. lusitanum* P6-12 быстро колонизировать стебель *P. vulgaris*. Количество бактериальных клеток увеличилось с 3,92 lg КОЕ/г сырой биомассы с начала его развития до 6,23 lg КОЕ/г сырой биомассы на 7-е сут. исследования (рис. 2).

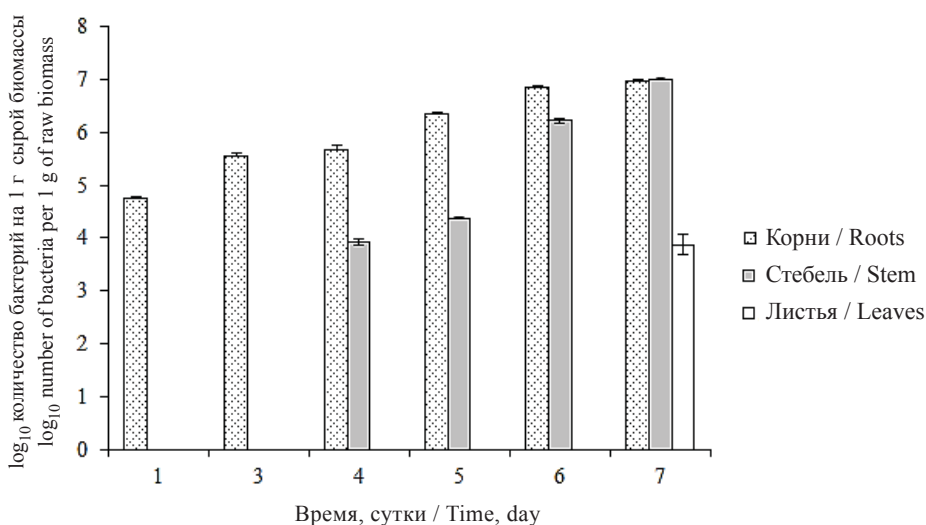


Рис. 2. Эндофитная колонизация *Phaseolus vulgaris* штаммом *H. lusitanum* P6-12

Fig. 2. Endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* by *H. lusitanum* P6-12





Отмечено положительное влияние штамма *H. lusitanum* P6-12 на рост фасоли обыкновенной: сырая биомасса инокулированных растений значительно превышает биомассу контрольных образцов (рис. 3).

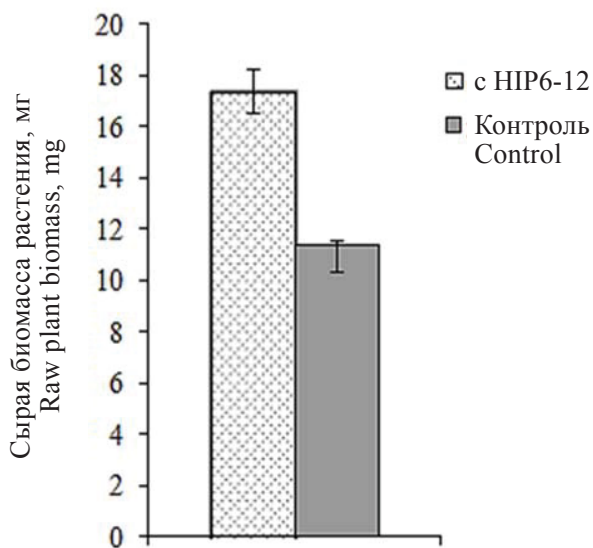


Рис. 3. Сухая биомасса фасоли обыкновенной (*P. vulgaris*), инокулированной *H. lusitanum* P6-12, в сравнении с контролем. Растения инокулировали  $10^9$  клеток на проросток в течение 30 минут и инкубировали в течение 40 дней при 24 °С в течение 16 часов днем и при 19 °С в течение 8 часов в ночное время. Общее время роста растений составило 40 дней

Fig. 3. Dry biomass of common bean (*P. vulgaris*) inoculated with *H. lusitanum* P6-12 in comparison with control. Plants were inoculated  $10^9$  cells per seedling for 30 minutes and incubated for 40 days at 24 °C for 16 hours during the day and at 19 °C for 8 hours at night. The total plant growth time was 40 days

Таким образом, с применением генно-инженерной конструкции с зеленым флуоресцентным белком GFP, методом электропорации был получен штамм *H. lusitanum* P6-12 + pJN105TurboGFP. Показана возможность применения указанного штамма для визуализации взаимодействия бактерий с макропартнером при помощи флуоресцентной микроскопии.

#### Список литературы

1. Valverde A., Velazquez E., Gutierrez C., Cervantes E., Ventosa A., Igual J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris* // Intern. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. Vol. 53, № 6. P. 1979–1983. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02677-0>

2. Weiss V. A., Faoro H., Tadra-Sfeir M. Z., Raittz R. T., Souza E. M. de, Monteiro R. A., Cardoso R. L., Wassem R., Chubatsu L. S., Huergo L. F., Muller-Santos M., Steffens M. B., Rigo L. U., Pedrosa F. de O., Cruz L. M. Draft genome sequence of *Herbaspirillum lusitanum* P6-12, an endophyte isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* // J. Bacteriol. 2012. Vol. 194, № 15. P. 4136–4137. <https://doi.org/10.1128/JB.00657-12>
3. Green E. R., Mecsas J. Bacterial secretion systems: an overview // Microbiology Spectrum. 2016. Vol. 4, № 1. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015>
4. Смолькина О. Н., Шишонкова Н. С., Юрасов Н. А., Игнатов В. В. Капсульные и экстраклеточные полисахариды diaзотрофных ризобактерий *Herbaspirillum seropedicae* Z78 // Микробиология. 2012. Т. 80, № 3. С. 345–352.
5. Schmidt M. A., Souza E. M., Baura V., Wassem R., Yates M. G., Pedrosa F. O., Monteiro R. A. Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae* // Braz. J. Med. Biol. Res. 2011. Vol. 44, № 3. P. 182–185. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2011007500004>
6. Лавренчук Л. С., Ермошин А. А. Микробиология: практикум. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2019. 107 с.
7. Monteiro R. A., Balsanelli E., Wassem R., Marin A., Brusamarello-Santos L. C. C., Schmidt A., Tadra-Sfeir M. Z., Pankiewicz V., Cruz L. M., Chubatsu L. S., Pedrosa F. O., Souza E. M. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects // Plant Soil. 2012. Vol. 356. P. 175–196. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1125-7>

#### References

1. Valverde A., Velazquez E., Gutierrez C., Cervantes E., Ventosa A., Igual J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2003, vol. 53, no. 6, pp. 1979–1983. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02677-0>
2. Weiss V. A., Faoro H., Tadra-Sfeir M. Z., Raittz R. T., Souza E. M. de, Monteiro R. A., Cardoso R. L., Wassem R., Chubatsu L. S., Huergo L. F., Muller-Santos M., Steffens M. B., Rigo L. U., Pedrosa F. de O., Cruz L. M. Draft genome sequence of *Herbaspirillum lusitanum* P6-12, an endophyte isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *J. Bacteriol.*, 2012, vol. 194, no. 15, pp. 4136–4137. <https://doi.org/10.1128/JB.00657-12>
3. Green E. R., Mecsas J. Bacterial secretion systems: an overview. *Microbiology Spectrum*, 2016, vol. 4, no. 1. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015>
4. Smol'kina O. N., Shishonkova N. S., Yurasov N. A., Ignatov V. V. Capsular and extracellular polysaccharides of diazotrophic rhizobacteria *Herbaspirillum seropedicae* Z78. *Microbiology*, 2012, vol. 81, no. 3, pp. 345–352 (in Russian).



5. Schmidt M. A., Souza E. M., Baura V., Wassem R., Yates M. G., Pedrosa F. O., Monteiro R. A. Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2011, vol. 44, no. 3, pp. 182–185. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2011007500004>
6. Lavrenchuk L. S., Ermoshin A. A. *Mikrobiologiya: praktikum* [Microbiology: Practical Work]. Ekaterinburg, Izd-vo Ural. un-ta, 2019. 107 p. (in Russian).
7. Monteiro R. A., Balsanelli E., Wassem R., Marin A., Brusamarello-Santos L. C. C., Schmidt A., Tadra-Sfeir M. Z., Pankievicz V., Cruz L. M., Chubatsu L. S., Pedrosa F. O., Souza E. M. *Herbaspirillum*-Plant Interactions: Microscopical, Histological and Molecular Aspects. *Plant Soil.*, 2012, vol. 356, pp. 175–196. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1125-7>

Поступила в редакцию 05.05.21, после рецензирования 10.05.21, принята к публикации 11.05.21  
Received 05.05.21, revised 10.05.21, accepted 11.05.21