



ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ГЕНОМ *RAP1* РАСТЕНИЙ ТОМАТОВ

*Хакимова Л.Р., Чубукова О.В., Вершинина З.Р.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, проспект Октября, 71, *Email: lili-nigmatullina@bk.ru

Резюме

Бактериальный агглютинин *RapA1* участвует в прикреплении ризобий к корням растений-макросимбионтов. Получение трансгенных сельскохозяйственных культур, вырабатывающих данный белок непосредственно на поверхности корней, актуально для изучения симбиоза этих растений с ризобиями. Томаты (*Lycopersicon lycopersicum* L.) сорта Грунтовый Грибовский 1180 были трансформированы геном *rapA1* с помощью штамма *Agrobacterium tumefaciens* AGL0, несущего вектор pCambia1301LPSLRapA1. Эффективность разработанного метода трансформации составила около 5%.

Ключевые слова: ризобактерии, *RapA1*, агглютинин, лидерный пептид, томат, агробактериальная трансформация

Цитирование: Хакимова Л.Р., Чубукова О.В., Вершинина З.Р. Получение трансформированных геном *rapA1* растений томатов // *Biomics*. 2021. Т.13(2). С. 153-158. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-11

© Авторы

CREATING OF THE TRANSFORMED TOMATO PLANTS BY *RAP1* GENE

*Khakimova L.R., Chubukova O.V., Vershinina Z.R.

Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 71 Prospekt Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia, *Email: lili-nigmatullina@bk.ru

Resume

Bacterial agglutinin *RapA1* is involved in the attachment of rhizobia to the roots of macrosymbiont plants. Creating of transgenic crops that produce this protein directly on the root surface is important for studying the symbiosis of these plants with rhizobia. Tomatoes (*Lycopersicon lycopersicum* L.) cultivar Gruntovy Gribovskiy 1180 were transformed with the gene *rapA1* using the *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 strain carrying the vector pCambia1301LPSLRapA1. The efficiency of the developed transformation method was about 5%.

Key words: rhizobacteria, *RapA1*, agglutinin, leader peptide, tomato, agrobacterial transformation

Citation: Khakimova L.R., Chubukova O.V., Vershinina Z.R. Creating of the transformed tomato plants by *rapA1* gene. *Biomics*. 2021. V.13(2). P. 153-158. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-11

© The Authors

Введение

Томат (*Lycopersicon esculentum* L.) является важнейшей и одной из самых популярных сельскохозяйственной культур. Его возделывают

почти во всех регионах России в открытом грунте, под плёночными укрытиями, в парниках, в теплицах, на лоджиях, балконах и даже в комнатах на подоконниках. Поэтому работы по увеличению

урожайности томатов являются актуальными для современного сельского хозяйства.

Одним из основ экологического земледелия является применение бактерий, способных ускорять рост растений – это так называемые ростостимулирующие ризобактерии PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Подобными свойствами обладают микроорганизмы, относящиеся к различным родам, в том числе и к *Rhizobium* [Somers et al., 2004]. Клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*, кроме азотфиксирующего эндосимбиоза с бобовыми растениями, могут выступать и в качестве PGPR-микроорганизмов, формируя симбиотические ассоциации с важнейшими сельскохозяйственными культурами, например, с рисом, пшеницей, ячменем и другими [Chabot et al., 1996; Mongiardini et al., 2008]. Неспецифическая адсорбция ризобий к различным поверхностям позволяет им колонизировать ризосферу небобовых растений, формируя на корнях биопленки [Ramey et al., 2004], и позволяет успешно конкурировать с другими видами микроорганизмов.

Для успешной колонизации корневой системы необходимы компоненты, способствующие лучшей адгезии ризобактерий. В роли такого компонента могут выступать бактериальные агглютинины, опосредующие прикрепление ризобактерий к корневым волоскам растений. Агглютинин RapA1 - внеклеточный Ca^{2+} -связывающий белок (кодируемый геном *rapA1*), размером 24 кДа, который распознает полисахарид на бактериальной поверхности и способствует ризобинальной аутоагглютинации через клеточные полюса [Ausmees et al., 2001; Mongiardini et al., 2008]. Было показано, что сверхэкспрессия RapA1 вызывает увеличение числа ризобий, адгезированных к корневым волоскам бобовых, и повышает количество сформированных клубеньков [Mongiardin et al., 2008; 2009]. Эти данные также были подтверждены в наших работах, где, после искусственного повышения уровня экспрессии гена *rapA1* в штамме ризобий *R. leguminosarum* PVu5, повысилась эффективность образования клубеньков на корнях фасоли при инокуляции модифицированным штаммом [Нигматуллина и др. (Nigmatullina et al.), 2015]. Кроме того, белок RapA1 был использован для повышения эффективности формирования симбиотических систем при многокомпонентной инокуляции растений [Хакимова и др. (Khakimova et al.), 2017].

Целью работы было получение трансгенных по гену *rapA1* растений томата методом агробактериальной трансформации.

Материалы и методы

Векторная конструкция pCambia 1301 с геном *rapA1* и лидерным пептидом PSL. В данном эксперименте по клонированию был использован модифицированный бинарный вектор

pCambia1301LPSLRapA1 [Вершинина и др. (Vershinina et al.), 2016]. Данный вектор был перенесен методом электропорации в агробактерии *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 и, таким образом, был получен штамм, несущий векторную конструкцию для получения трансгенных растений, выделяющих белок RapA1 на поверхность корней.

Стерилизация и проращивание семян томата. Для экспериментов семена томата (*S. lycopersicum*) сорта Грунтовый Грибовский 1180 поверхностно стерилизовали в течение 1 мин в 70% спирте и затем 20 минут в 1% растворе гипохлорита натрия с добавлением нескольких капель Tween-20. После пятикратной промывки стерильной водой семена проращивали на среде MS1 (половина дозы солей MS (Murasighe and Skoog), сахароза - 10%, геллит - 0.2%, Mes - 0.05%, pH 5.8) в течение 7-8 суток при температуре 25°C и 16-часовом световом дне в климатической камере KBW 400 (Binder).

Агробактериальная трансформация. В опытах по трансформации использовали свежую ночную культуру *A. tumefaciens*, выращенную при 28°C на шейкере (150 об/мин) в среде LB (бакто-триптон - 1%, дрожжевой экстракт - 0.5%, NaCl - 1%), с добавлением 100 мг/л рифампицина и 50 мг/л канамицина. Далее культуру агробактерий центрифугировали (3500 об/мин, 10 мин) и ресуспендировали в аналогичном объеме среды MinA ((NH₄)₂SO₄ - 0.04%, цитрат Na - 0.02%, K₂HPO₄ - 0.55%, KH₂PO₄ - 0.18%, сахароза - 0.2%, MgSO₄ - 0.012%) с добавлением ацетосирингона (200 мкМ). Затем агробактерии подращивали в течение часа при 28°C на шейкере (150 об/мин) и перед инокуляцией разбавляли средой MS2 (соли MS, витамины B5 [Gamborg et al., 1968], сахароза - 3%, инозитол - 0.01%, MES - 0.05%, pH 5.8) до 10⁸ КОЭ/мл, концентрация была измерена с помощью спектрофотометра СФ-46.

Агробактериальную трансформацию томата осуществляли согласно McCormick с соавторами [1986] [Халилуев и др. (Khaliluev et al.), 2010; Вершинина и др. (Vershinina et al.), 2014]. В качестве эксплантов для трансформации были использованы семядоли недельных проростков, прекультивирование которых осуществляли на среде MS3 (MS2 с добавлением геллита - 0.2 %) с добавлением 1.0 мг/л зеатина и 0.1 мг/л ИУК, при температуре 25°C в темноте в течение двух суток (35-40 эксплантов на чашку Петри), после чего скальпелем наносили на них 2-3 насечки. Далее экспланты переносили в колбу с суспензией *A. tumefaciens*, помещали на шейкер (40 об/мин) и в течение 30 мин осуществляли сокультивирование. Затем экспланты подсушивали на стерильной фильтровальной бумаге и переносили на чашки Петри со средой MS3 с добавлением 2.0 мг/л зеатина и 0.1 мг/л ИУК. Последующее сокультивирование

проводили в темноте при температуре 25°C в течение 2 суток до появления слабого бактериального ореола.

После сокультивирования с *A. tumefaciens* экспланты отмывали в среде MS2 на шейкере (40 об/мин) в течение 15 мин и помещали на среду MS3 с добавлением 2.0 мг/л зеатина, 0.1 мг/л ИУК и 300 мг/л аугментина с целью подавления роста и размножения агробактерий. Через 7 дней субкультивации экспланты переносили на среду MS3 с добавлением 15 мг/л селективного антибиотика гигромицина. Пересадка на свежую селективную среду проводилась каждые 10-14 дней. На четвертом пассаже количество зеатина в среде уменьшали до 1 мг/л. Регенеранты пересаживали в пробирки со средой MS3, содержащей 300 мг/л аугментина, 0.1 мг/л ИМК и 15 мг/л гигромицина для индукции корнеобразования. Укоренившиеся на селективной среде побеги высаживали в грунт и адаптировали к условиям светоплощадки.

Анализ β -глюкуронидазной (*gus*) активности. Гистохимический анализ *gus* проводили по методу, описанному Jefferson [1987] с небольшими модификациями из Kasugi с соавторами [1990]. Части отрезанных листочков предположительно трансгенных побегов инкубировали в X-gluc реактиве, содержащем 1 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-глюкоронид, 0.5% тритон X-100, 100 мМ Na₂ЭДТА, 20% метанола, 0.5 мМ K₃Fe(CN)₆, 0.5 мМ K₄Fe(CN)₆ и 50 мМ натриевый фосфатный буфер (pH 7.0). Ткани инкубировали при 37°C в течение ночи, отбеливали в 70% этиловом спирте, выдерживали в 50% растворе глицерина в воде и микроскопировали.

ПЦР-анализ ДНК и РНК из трансгенных растений. ДНК выделяли фенольно-детергентным методом. Выделение тотальной РНК проводили набором TRizol Reagents (“Invitrogen”, США), а проведение

ревертазной реакции осуществляли с использованием обратной транскриптазы MMLV (“Евроген”, Россия).

Наличие гена *garA1* в препаратах ДНК и кДНК проверяли с помощью ПЦР с использованием универсальных олигонуклеотидных праймеров, подобранных к кодирующей части гена: *garF* (5'-atggctgttcacgcaaccgacgat-3') и *garR* (5'-gcggcggcgctgtttttgattg-3') и стандартных наборов в амплификаторе Терцик MC2 (“ДНК-технология”, Россия).

Иммунолокализация. Для выявления локализации агглютинина RapA1 на поверхности корней были получены поликлональные кроличьи антитела к данному белку. Иммуногистохимический анализ проводился согласно Diaz et al. [1986]. Корни трансгенных и контрольных растений были проинкубированы с первичными антителами, после отмывки от которых (3 раза по 5 мин в TBS-T) корни инкубировали 1 ч в растворе вторичных антител, разведенных в 0.2%-ном молоке в TBS-T (разведение 1:6000). В качестве вторичных антител использовали Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate) фирмы Cell Signaling Technology (USA), что делало возможным детекцию локализации исследуемого белка с помощью флуоресцентной микроскопии. Для этой цели в работе был использован флуоресцентный микроскоп модели Axio Imager.M1 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты и обсуждение

Получение растений томата, экспрессирующих ген *garA1*. В период первого пассажа на всей поверхности трансформированных и контрольных семядолей наблюдалось появление множества центров образования глобулярного каллуса (рис. 1). Частота каллусообразования для всех эксплантов составила в среднем около 85%.

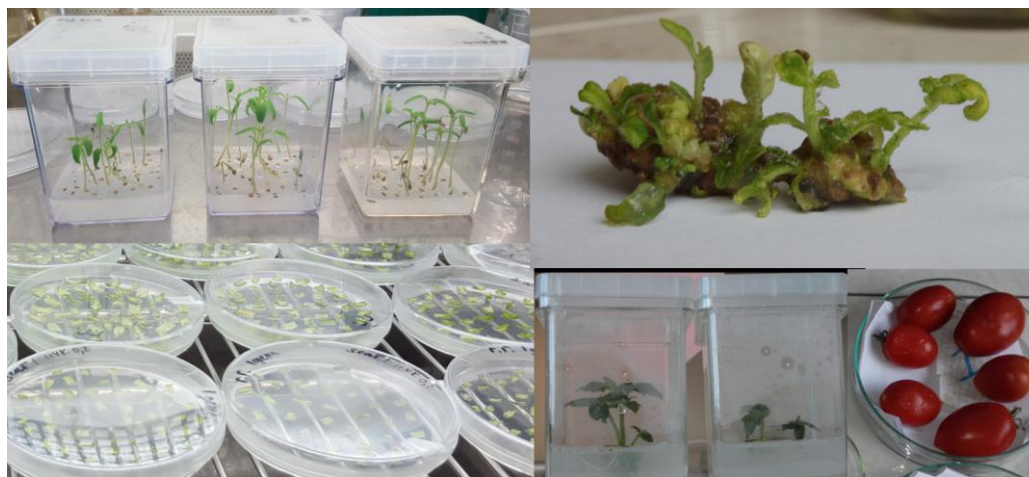


Рисунок 1. Разные этапы трансформации растений томата.
Figure 1. Different stages of transformation of tomato plants.

После помещения эксплантов на селективную среду, содержащую 15 мг/л гигромицина, у большинства контрольных и трансформированных семядольных эксплантов начинался некроз образовавшихся каллусных структур, при этом регенерировавшие за время двух первых пассажей побеги на всех эксплантах в дальнейшем проявляли симптомы хлороза, что свидетельствовало об отсутствии в них трансгена.

После 4 месяцев селекции семядольных эксплантов (200 шт.) на среде с гигромицином были получены 10 растущих каллусов. Из них в дальнейшем были получены по 5 зелёных регенерантов (вероятно клонов). Регенеранты, которые формировали хорошо развитые корни на среде для укоренения, содержащей 15 мг/л гигромицина подвергались *gus* и ПЦР анализам. Трансгенность растений-регенерантов была проверена анализом активности β -D-глюкоуридазы в тканях листа - у всех 10 линий наблюдалось устойчивое окрашивание в синий цвет (рис. 2). ПЦР и ОТ-ПЦР анализы на наличие и экспрессию гена *rapA1* во всех 10 линиях дали положительный результат.

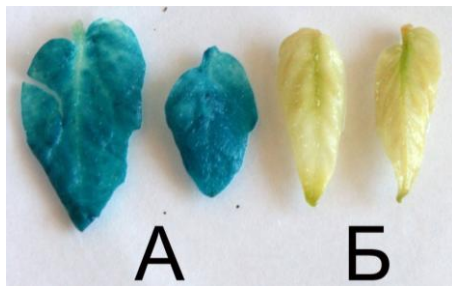


Рисунок 2. Гистохимический анализ на активность гена *GUS* в листьях томата. А – трансгенные растения томата; Б – контрольные растения томата.
Figure 2. Histochemical analysis of *GUS* gene activity in tomato leaves. A - transgenic tomato plants; B - control tomato plants.

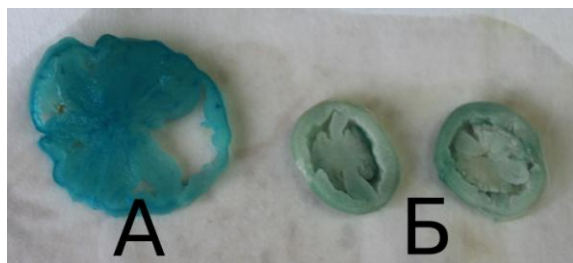


Рисунок 3. Гистохимический анализ на активность гена *GUS* в плодах трансгенных растений томата. А – трансгенные растения томата; Б – контрольные растения томата.
Figure 3. Histochemical analysis for *GUS* gene activity in fruits of transgenic tomato plants.
A - transgenic tomato plants; B - control tomato plants.

Все 50 полученных растений (10 линий) были пересажены в почву и впоследствии из них были отобраны семена для получения второго поколения. Эти семена были высеяны на селективную среду с гигромицином (20 мг/л), где три линии показали соотношение выживших и погибших, близкое к 3:1, что предполагало наличие единичной копии встроенного трансгена. Анализ активности β -D-глюкоуридазы в плодах у этих 3 линий показана на рис. 3.

В дальнейшем, в качестве трансгенных объектов при проведении иммунофлуоресцентного анализа на локализацию изучаемого белка были использованы T1 поколение линий растений с расщеплением 3:1.

Эффективность разработанного метода трансформации томата сорта Грунтовый Грибовский 1180 составила 5%, что выше эффективности, достигнутой, как показано в нашей статье [Вершинина и др. (Vershinina et al.), 2014], где получали растения томата, экспрессирующие ген лектина гороха посевного PSL. Возможно, это обусловлено применением аугментина вместо цефотаксима, что согласуется с данными статьи Varlamova et al. [2021], где показано высокая эффективность аугментина для увеличения регенерации эксплантов томатов при трансформации.

Иммунофлуоресцентный анализ локализации белка *RapA1* на корнях трансгенных и контрольных растений. Локализацию целевого белка *RapA1* на поверхности корней наблюдали с помощью иммунофлуоресцентного анализа с использованием первичных антител к белку *RapA1* и вторичных антител, меченных Alexa Fluor 488. В качестве контроля для исключения автофлуоресценции взяли фрагменты корней контрольных нетрансгенных растений (рис. 3).

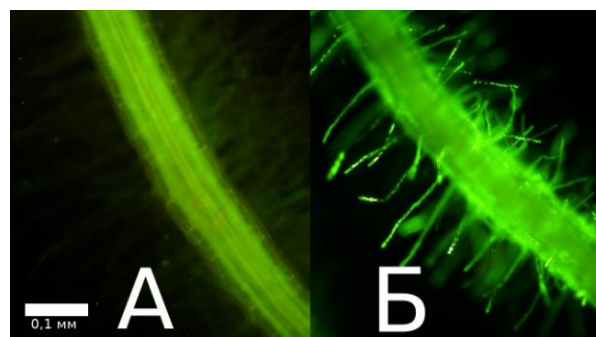


Рисунок 4. Иммунофлуоресцентный анализ локализации белка *RapA1* на корнях растений томата. А – корни контрольного растения; Б – корни трансгенного по гену *rapA1* томата.
Figure 4. Immunofluorescence analysis of the *RapA1* protein localization on the roots of tomato plants. A - roots of the control plant; B - roots of a tomato transgenic for the *rapA1* gene.

Полученные данные показали, что трансгенные растения действительно секретируют белок RapA1 на поверхность корней, что подтвердило правильное функционирование векторной конструкции pCambia1301LPSLRapA1 в трансгенных растениях томата.

Хотя роль белков RAP-семейства в бобово-ризобиальном симбиозе до сих пор до конца не выявлена, показано, что конститутивная экспрессия белка RapA1 у хозяйственно полезных штаммов ризобий позволяет увеличивать их адсорбцию к корням и способствует более эффективному формированию биопленок [Вершинина и др. (Verшинina et al.), 2021]. Теоретически возможна и обратная ситуация, когда трансформация растений генами бактериальных агглютининов может привести к созданию новых симбиотических систем. В связи с этим, в перспективе полученные в данной работе растения томата будут использованы для анализа разнообразных симбиотических реакций с различными почвенными бактериями.

Таким образом, для создания искусственных симбиотических систем наиболее перспективным является применение генов, продукты которых непосредственно участвуют в формировании растительно-микробных взаимодействий. Для успешной колонизации корневых волосков штаммы ризобий должны обладать высокой конкурентоспособностью, чтобы соперничать с множеством различных микроорганизмов, обитающих в ризосфере. Поэтому актуально изучение способов повышения конкурентоспособности ризобий, в том числе и с помощью модификации растений, чтобы последние поддерживали на поверхности своих корней лишь определенных микросимбионтов. Бактериальные поверхностные полисахариды и адгезины, растительные лектины и флавоноиды - все эти вещества являются молекулами-посредниками на ранних этапах становления симбиозов между микроорганизмами и растениями. Несомненно, бактериальный агглютинин RapA1 является перспективным инструментом для модификации существующих и создания новых ассоциативных симбиотических систем.

Литература

- Вершинина З.Р., Нигматуллина Л.Р., Лавина А.М., Баймиев Ал.Х. Искусственные симбиотические ассоциации томата, трансгенного по гену лектина PSL // Вестник Оренбургского государственного университета. 2014. № 13 (174). С. 13-15.
- Вершинина З.Р., Нигматуллина Л.Р., Лавина А.М., Баймиев Ал.Х. Получение растений табака, трансгенных по гену бактериального адгезина RapA1 // Статья в сборнике: Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность. 2016. С. 23-26.
- Вершинина З.Р., Чубукова О.В., Никоноров Ю.М., Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Каримова Л.Р., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ал.Х. Влияние сверхэкспрессии гена *rosR* на образование биопленок бактериями *Rhizobium leguminosarum* // Микробиология. 2021. Т. 90(2). С. 19-200. DOI: 10.31857/S0026365621020154
- Нигматуллина Л.Р., Лавина А.М., Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х. Вклад бактериального адгезина RapA1 в эффективность формирования симбиоза *Rhizobium leguminosarum* с растениями фасоли // Микробиология. 2015. №6 (84). С. 705–711. DOI: 10.7868/S0026365615060099
- Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х. Использование штаммов-продуцентов адгезина RapA1 из *Rhizobium leguminosarum* для создания бинарных биоудобрений // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. Т. 53(4). С. 400-405. DOI: 10.7868/S0555109917040080
- Халилуев М.Р., Харченко П.Н., Долгов С.В. Разработка системы регенерации и изучение трансформационного потенциала томата промышленного сорта // Докл. РАСХН. 2010. № 3. С. 22-26.
- Ausmees N., Jacobsson K., Lindberg M. A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin RapA belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* // Microbiol. 2001. V. 147. P. 549–559. doi: 10.1099/00221287-147-3-549
- Chabot R., Antoun H., Kloepper J.W., Beauchamp C.J. Root Colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 2767–2772. doi: 10.1128/aem.62.8.2767-2772.1996
- Diaz C.L., Van Spronsen P.C., Bakhuizen R., Logman G.J.J., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W. Correlation between infection by *Rhizobium leguminosarum* and lectin on the surface of *Pisum sativum* L. roots // Planta. 1986. V. 168. P. 350–358.
- Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: The *gus* gene fusion system // Plant Mol. Biol. Rep. 1987. V. 5. P.387–405.
- McCormick S., Niedermeyer J., Fry J., Barnason A., Horsch R., Fraley R. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Cell Rep. 1986. V. 15. N. 2. P. 81-84.
- Mongiardini E.J., Ausmees N., Perez-Gimenez J. The rhizobial adhesion protein RapA1 is involved in adsorption of rhizobia to plant roots but not in nodulation // FEMS Microbiol. Ecol. 2008. V.65. P. 279–288. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00467.x
- Mongiardini E. J., Perez-gimenez J., Althabegoiti M. J., Covelli J., Quelas J. I., Lopez-garcia S. L., Lodeiro A. Overproduction of the rhizobial adhesin RapA1 increases

- competitiveness for nodulation // *Soil Biol. Biochem.* 2009. V.41. P.2017-2020. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.07.016
14. Ramey B.E., Koutsoudis M., von Bodman S.B., Fuqua C. Biofilm formation in plant–microbe associations // *Curr. Opin. Microbiol.* 2004. V.7. P. 602–609. doi: 10.1016/j.mib.2004.10.014
15. Somers E., Vanderleyden J., Srinivasan M. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet // *Crit. Rev. Microbiol.* 2004. V.30. P. 205–240. doi: 10.1080/10408410490468786
16. Varlamova N. V., Dolgikh Y. I., Blinkov A. O., Baranova E. N., Khaliluev M. R. Effects of different β -lactam antibiotics on indirect tomato (*Solanum lycopersicum* L.) shoot organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens* growth inhibition in vitro // *Antibiotics (Basel)* 2021. V.10(6): 660. doi: 10.3390/antibiotics10060660
- References**
1. Ausmees N., Jacobsson K., Lindberg M. A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin RapA belongs to a family of Rhizobium-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiol.* 2001. V. 147. P. 549–559. doi: 10.1099/00221287-147-3-549
 2. Chabot R., Antoun H., Kloepper J.W., Beauchamp C.J. Root Colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. P. 2767–2772. doi: 10.1128/aem.62.8.2767-2772.1996
 3. Diaz C.L., Van Spronsen P.C., Bakhuizen R., Logman G.J.J., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W. Correlation between infection by *Rhizobium leguminosarum* and lectin on the surface of *Pisum sativum* L. roots. *Planta.* 1986. V. 168. P. 350–358.
 4. Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: The gus gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1987. V. 5. P.387–405.
 5. Khakimova L.R., Lavina A.M., Vershinina Z.R., Baymiev A.K. Usage of strain-producers of adhesin rapal from *Rhizobium leguminosarum* for the creation of binary biofertilizers. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2017. V.53(4). P.453-457. doi: 10.1134/S0003683817040081
 6. Khaliluev M.R., Kharchenko P.N., Dolgov S.V. Development of regeneration system and study of transformative potential in tomato variety Rekordsmen. *Reports of the Russian Academy of Agricultural Sciences.* 2010. No.3. P. 22-26. (In Russian).
 7. McCormick S., Niedermeyer J., Fry J., Barnason A., Horsch R., Fraley R. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 1986. V. 15(2). P. 81-84.
 8. Mongiardini E.J., Ausmees N., Perez-Gimenez J. The rhizobial adhesion protein RapA1 is involved in adsorption of rhizobia to plant roots but not in nodulation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2008. V.65. P. 279–288. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00467.x
 9. Mongiardini E. J., Perez-gimenez J., Althabegoiti M. J., Covelli J., Quelas J. I., Lopez-garcia S. L., Lodeiro A. Overproduction of the rhizobial adhesin RapA1 increases competitiveness for nodulation. *Soil Biol. Biochem.* 2009. V.41. P. 2017-2020. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.07.016
 10. Nigmatullina L.R., Lavina A.M., Vershinina Z.R., Baymiev A.K. Role of bacterial adhesin RapA1 in formation of efficient symbiosis of *Rhizobium leguminosarum* with bean plants. *Microbiology.* 2015. V. 84(6). P. 804-810. DOI: 10.1134/S0026261715060089
 11. Ramey B.E., Koutsoudis M., von Bodman S.B., Fuqua C. Biofilm formation in plant–microbe associations. *Curr. Opin. Microbiol.* 2004. V.7. P. 602–609. doi: 10.1016/j.mib.2004.10.014
 12. Somers E., Vanderleyden J., Srinivasan M. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* 2004. V.30. P. 205–240. doi: 10.1080/10408410490468786
 13. Varlamova N. V., Dolgikh Y. I., Blinkov A. O., Baranova E. N., Khaliluev M. R. Effects of different β -lactam antibiotics on indirect tomato (*Solanum lycopersicum* L.) shoot organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens* growth inhibition in vitro. *Antibiotics (Basel)*. 2021. V.10(6): 660. doi: 10.3390/antibiotics10060660
 14. Vershinina Z.R., Nigmatullina L.R., Lavina A.M., Baymiev A.K. Artificial symbiotic association of transgenic tomato, carrying lectin gene psl. *Bulletin of the Orenburg State University.* 2014. № 13 (174). P. 13-15. (In Russian).
 15. Vershinina Z.R., Nigmatullina L.R., Lavina A.M., Baymiev A.K. Obtaining tobacco plants transgenic for the RapA1 bacterial adhesin gene. Article in the collection: Transgenic plants: creation technologies, biological properties, application, biosafety. 2016. P. 23-26. (In Russian).
 16. Vershinina Z.R., Chubukova O.V., Nikonorov Yu. M., Khakimova L.R., Lavina A.M., Karimova L.R., Baimiev An. K., Baimiev Al. K. Effect of the *rosR* gene overexpression on biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology.* 2021. V. 90(2). P. 198–209. DOI: 10.31857/S0026365621020154