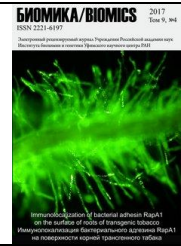




БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



КЛУБЕНЬКОВЫЕ БАКТЕРИИ В ИСКУССТВЕННЫХ СИМБИОЗАХ

Вершинина З.Р.¹, Сербаева Э.Р.², Садыкова Л.Р.¹, Хакимова Л.Р.¹, Лавина А.М.¹, Баймиев Ал.Х.¹

¹Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук

450054, г. Уфа, пр. Октября, 71. E-mail: zilyaver@mail.ru

²Башкирский государственный университет, 450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32.

Резюме

Урожайность сельскохозяйственных культур зависит от многих факторов, но одним из важнейших является доступность соединений азота. Перенос азотфиксирующего бобово-ризобияльного симбиоза на небобовые растения всегда был приоритетной областью исследований для многих ученых, работающих в области биотехнологии растений. Однако простой перенос генов, участвующих в процессе фиксации азота, к сожалению, ни разу не привел к успешному созданию азотфиксирующей симбиотической системы.

В данном обзоре кратко описываются достижения, сделанные учеными всего мира в области создания искусственных симбиозов между растениями и клубеньковыми бактериями. Особое внимание уделяется лектинам бобовых растений, которые являются геагглютинирующими белками, функционирующими преимущественно на ранних этапах формирования бобово-ризобияльного симбиоза. Трансформация генами лектинов небобовых растений приводит к повышенной колонизации трансгенных растений ризобиями, узнающими данный лектин на поверхности корней. Если для колонизации использовать ризобии с фунгистатической и ростостимулирующей активностями, то это приведет к тому, что созданные *de novo* симбиотические системы окажутся более устойчивы к грибным фитопатогенам и растения будут отличаться большими ростовыми показателями, благодаря ростостимулирующей активности бактерий.

Немаловажным является обзор работ, посвященных повышению конкурентоспособности ризобий в симбиотических системах путем трансформации различными генами. Особый интерес представляет увеличение копий генов *pssA* и *rosR*, участвующих в синтезе экзополисахаридов, так как они являются одними из генов, критичных для образования биопленок ризобиями, что является немаловажной частью конкурентной борьбы и помогает ризобиям выживать в неблагоприятных условиях. Другая перспективная с точки зрения получения новых симбиотических систем группа генов - это гены белков адгезинов Rap, участвующих в прикреплении ризобий к корневым волоскам растений. Также в данной статье небольшое внимание уделено трансформации с целью повышения конкурентоспособности в рамках симбиотических систем других ростостимулирующих грамотрицательных бактерий, в частности *Pseudomonas putida* и *P. fluorescens*.

Ключевые слова: симбиоз, лектин, ризобия, агглютинин, адгезин, экзополисахарид, Nod фактор

NODULE BACTERIA IN ARTIFICIAL SYMBIOSES

Vershinina Z.R.¹, Serbaeva E.R.², Sadykova L.R.¹, Khakimova L.R.¹, Lavina A.M.¹, Baymiev Al.Kh.¹

¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Sci. Center of RAS, Ufa, Russia. E-mail: zilyaver@mail.ru

²Bashkir State University, Ufa, Russia

Resume

Crop yields depend on many factors, but one of the most important is the availability of nitrogen compounds. The transfer of nitrogen-fixing legume-rhizobia symbiosis to non-legume plants has always been a priority area of research for many scientists working in the field of plant biotechnology. Unfortunately, the simple transfer of genes, involved in the process of nitrogen fixation, has never led to the successful creation of a nitrogen-fixing symbiotic system.

This review briefly describes the achievements made by scientists around the world in the field of creating artificial symbiosis between plants and nodule bacteria. Particular attention is paid to the lectins of legume plants. Lectins are hemagglutinating proteins, which function mainly at the early stages of the formation of legume-rhizobia symbiosis. Transformation of non-legume plants with lectin gene leads to increasing of colonization by rhizobia on the root of transgenic plants. In other words, rhizobia recognize the lectin on the surface of the roots. If rhizobia with fungistatic and growth-stimulating activities is used for colonization, this will lead to the fact that de novo created symbiotic systems will be more resistant to fungal phytopathogens and the plants will be distinguished by large growth parameters, due to the growth-stimulating activity of the bacteria.

It is important to review the work devoted to increasing of the competitiveness of rhizobia in symbiotic systems by transforming different genes. Particularly interesting is the increase of copies of the *psaA* and *rosR* genes involved in the synthesis of exopolysaccharides. These genes are critical for the formation of biofilms by rhizobia. Biofilms are an important part of biological competition. They help rhizobia to survive in adverse conditions. Another group of genes that is promising from the point of view of obtaining new symbiotic systems are the genes of the Rap proteins. These genes help in attaching rhizobia to the root hairs of plants. Also in this article, little attention is paid to the transformation in order to increase the competitiveness in symbiotic systems of other growth-stimulating gram-negative bacteria, in particular *Pseudomonas putida* and *P. fluorescens*.

Keywords: symbiosis, lectin, rhizobia, agglutinin, adhesin, exopolysaccharide, Nod factor

Модификация растений для создания искусственных симбиотических систем

Работы по получению трансгенных небобовых растений, способных вступать в симбиоз с ризобиями, как правило, связаны с переносом генов, продукты которых принимают то или иное участие в прикреплении бактерий к корням и образовании клубеньков. Существует патент по созданию трансгенных растений с геном кальций и кальмодулин-зависимой протеинкиназы ССаМК. Данный фермент принимает участие в ранних этапах образования бобово-ризобияльного симбиоза и его экспрессия в небобовых растениях может привести к образованию азотфиксирующих клубеньков [Tirichine, 2012].

Проводятся работы по получению растений, вырабатывающих изофлавоноиды. Ключевым ферментом в превращении естественных флавоноидов небобовых растений в изофлавоноиды является изофлавоносинтаза [Jung et al., 2000]. Были получены растения риса и рапса, продуцирующие данный фермент и впоследствии накапливающие изофлавоноиднарингенин [Sreevidya et al., 2006; Li et al., 2011].

Интересна работа по переносу нескольких симбиотических генов, а именно *MtNFP*, *MtLYK3*, *MtDMI1*, *MtDM2*, *MtDMI3*, *MtNSP1* и *MtNSP2* из генома *Medicago truncatula* в клубнику, табак,

томат, тополь и арабидопсис. Продукты данных генов принимают участие во взаимодействии с Nod-фактором бактерий. Однако, различимых изменений в морфологии корневых волосков и делении клеток кортекса корня после инокуляции растений *Sinorhizobium sp.* NGR234 не произошло. Возможно, это связано с тем, что уровень экспрессии данных генов в трансгенных растениях сильно отличался от того, что был в *M. truncatula* [Untergasser et al., 2012].

Эксперименты на трансгенных бобовых растениях с чужеродными генами лектинов подтверждают значимость этих гемагглютинирующих белков для формирования бобово-ризобияльного симбиоза. Растения клевера белого, вступающего в симбиоз исключительно с *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, после введения в их геном гена лектина гороха посевного стали способны к неспецифическому клубенькообразованию в присутствии симбионта гороха *R. leguminosarum* bv. *viciae* [Diaz et al., 1989]. Тот же результат был получен на трансгенных по гену лектина гороха растениях люцерны [van Rhijn et al., 2001]. При этом замена аминокислоты в углеводсвязывающем участке гена лектина подавляла или заметно уменьшала число растений клевера, инфицированных *R. leguminosarum* bv. *viciae* [van Eijsden et al., 1995].

Инокуляция растений *Lotus corniculatus*, содержащих ген лектина сои, бактериями *Bradyrhizobium japonicum* (симбионтами сои) вызывала образование клубенькоподобных структур [Hirsh et al., 1995]. Инокуляция растений *L. corniculatus*, трансформированных геном лектина сои *Le1*, бактериями *B. japonicum* в присутствии флавоноида генистеина, индуктора *nod*-генов, увеличивала количество псевдоклубеньков на корнях. Однако дальнейшие исследования показали, что для расширения хозяйской специфичности растений *L. corniculatus* критичными являются экзополисахариды на поверхности *B. japonicum*, а не синтез Nod факторов [van Rhijn et al., 1998]. Лектин гороха, интродуцированный в красный клевер, вызывал формирование псевдоклубеньков на корнях растений при инокуляции не только ризобиями гороха, но и люцерны и чечевицы [Diaz et al., 2000].

Именно углеводсвязывающий участок лектина определяет его специфичность в отношении того или иного штамма ризобий. В работе Баймиева с соавторами. [2009] изучалось влияние гибридных лектинов, представляющих собой полноразмерный лектин гороха *Pisum sativum* (PSL) с углеводсвязывающим участком, замещенным на таковые лектинов донника белого *Melilotus albus* (PSL/MAL) и астрагала солодколистного *Astragalus glycyphyllos* (PSL/AGL) на симбиоз бобовых растений с ризобиями. Обработка лектином гороха PSL ризобий *R. leguminosarum* *bv. viciae* в ризосфере люцерны *M. sativa* привела к формированию на корнях данного растения неинфицированных псевдоклубеньков, в то время как обработка гибридным лектином PSL/AGL вызвала у бактерий из клубеньков *A. cicer* способность образовывать на люцерне инфицированные клубеньки.

Показана возможность колонизации бактериями *R. leguminosarum* поверхности трансгенных по гену *psl* корней риса, а также их способность проникать в межклеточное пространство эпидермиса [Sreevidya et al., 2005].

Ранее в нашей лаборатории уже были получены растения табака, томата и рапса, с трансгенной по гену лектина *psl* корневой системой. Трансгенные корни были обработаны бактериями гороха посевного, и численность адгезированных бактерий на трансформированных геном лектина корнях оказалась выше, по сравнению с контролем, что доказывало взаимодействие *R. leguminosarum* с лектином гороха на поверхности трансформированных корней [Вершинина и др., 2011; Verшинina et al.,

2012]. Аналогичные результаты были получены для трансгенных по гену лектина растениях пшеницы [Verшинina et al., 2013]. Более того, было обнаружено, что колонизация трансгенных по гену лектина корней композитных растений томата, перца и рапса бактериями *R. leguminosarum* с фунгистатической активностью может способствовать защите растений от фитопатогенных грибов [Вершинина и др., 2013; Оркодашвили и др., 2013; Благова и др., 2015]. Аналогичные результаты были получены для полностью трансгенных растений томата [Вершинина и др., 2015].

В ризобии люцерны (*S. meliloti*) был трансформирован ген *dctA*, контролирующей активацию транспорта дикарбоновых кислот, в результате возросла нитрогеназная активность бактерий и накопление азота в растениях, но при этом биомасса люцерны изменилась незначительно [Онищук и др., 2009].

Сверхэкспрессия в косматых корнях фасоли обыкновенной гена *RbohB* (ген NADPH оксидазы *Phaseolus vulgaris*) приводила к повышению числа клубеньков и усилению азотфиксирующей активности растения при обработке бактериями *R. irregularis* или *R. tropici* [Arthikala et al., 2014; Arthikala et al., 2015].

Растительные липид-транспортирующие белки (LTP) играют важную роль на начальных этапах симбиоза. Было доказано, что растения *M. truncatula* со сверхэкспрессией *MtN5* гена, который является липид-транспортирующим белком, реагирующим на Nod факторы ризобий, образуют больше клубеньков с *S. meliloti*. [Pii et al., 2009; Pii et al., 2010; Pii et al., 2012; Pii et al., 2013].

Трансгенные растения, синтезирующие N-acylhomoserinelactones, могут быть использованы для модуляции процессов, протекающих на начальных этапах симбиоза, в том числе с ризобиями [Fray et al., 1999; Scott et al., 2006].

Данная глава была бы неполной без упоминания о трансформации растений с целью колонизации другими ростостимулирующими бактериями. Так было показано, что трансгенные растения табака и *L. corniculatus* с введенными в них генами биосинтеза опинов приобретают способность избирательно поддерживать на своей поверхности рекомбинантные штаммы псевдомонад, содержащие гены катаболизма этих соединений [Wilson et al., 1995, Savkaand, Farrand, 1997; Oger et al., 2000]. Ранее подобные опыты с генами опинов были проведены для штаммов агробактерий на растениях *L. corniculatus* [Guyon et al., 1993]. Также ведутся исследования по использованию генов ризопинов в трансгенных

растениях для повышения конкурентоспособности ризобияльных микросимбионтов [Wilson et al., 1995; Murphy, Ryder, 1994; Rossbach et al., 1994a; Rossbach et al., 1994b].

Модификация микроорганизмов для повышения эффективности существующих и создания искусственных симбиотических систем

Зачастую в экспериментах по созданию искусственных симбиотических систем бобовых растений с ризобиями используются генетически модифицированные бактерии. В исследовании Nielsen с соавторами [1993] для инокуляции растений ячменя сорго, риса, эвкалипта, рапса, пшеницы применялись трансконъюгаты ризобий, полученные путем скрещивания в различных комбинациях *R. phaseoli*, *R. lupini*, *R. cowpealeucaena*, *R. meliloti*, *R. trifoli*, *R. leguminosarum* *R. meliloti*. На обработанных такими бактериями растениях было отмечено образование клубеньков, а так же увеличение сухой массы растений и содержания в них азота. В работе же Rolfe и Bender [1990] были получены трансгенные ризобии, содержащие ген *nodD*, реагирующий на вещества, продуцируемые корнями риса. При заражении данными бактериями происходила нодуляция растений.

Ранее было показано, что штаммы *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, вырабатывающие трифолотоксин, обладают повышенной конкурентоспособностью и образуют больше клубеньков, чем штаммы без данного бактериоцина [Triplett, 1990]. Были получены штаммы *R. etli*, содержащие гены для синтеза трифолотоксина, выделенные из *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, что значительно увеличивало конкурентоспособность первых по сравнению с дикими штаммами и повышало образование клубеньков на растениях фасоли [Robleto et al., 1998]. Также были успешно созданы штаммы *Sinorhizobium* sp., вырабатывающие трифолотоксин [Kent et al., 1998]. Еще один бактериоцин с похожими свойствами описан в работе [Oresnik et al., 1999].

Увеличение копий генов *nifA* и *dctABD* в штаммах *R. meliloti* приводило к повышению урожайности растений люцерны [Bosworth et al., 1994; Scupham et al., 1996]. Также перенос плазмид *Agrobacterium rhizogenes* 15834 в штаммы *R. meliloti* увеличивало конкурентоспособность данного микросимбионта и приводило к увеличению количества клубеньков на люцерне [Novikova, Pavlova, 1993].

Увеличение копий генов *pssA* и *rosR*, участвующих в синтезе экзополисахаридов, в

бактериях *R. leguminosarum* bv. *trifolii* приводило к увеличению клубенек образующей активности данных микросимбионтов и усиливало конкурентоспособность по сравнению с дикими штаммами [Janczarek et al., 2009]. Повышение экспрессии гена пролиндегидрогеназы *putA* в штаммах *S. meliloti* также приводило к увеличению клубенекобразующей активности данных бактерий в условиях засухи [Van Dillewijn et al., 2001].

Существует ряд данных, свидетельствующих о возможности использования бактериальных агглютининов для повышения эффективности ризобияльных штаммов [Ausmees et al., 2001; Mongiardini et al., 2008; Mongiardini et al., 2009]. Ранее в нашей лаборатории для экспериментов по повышению конкурентоспособности и эффективности ризобий был использован ген *rapA1* из *R. leguminosarum*, кодирующий бактериальный агглютинин RapA1. RapA1 - поверхностный Ca²⁺-связывающий белок, распознающий полисахарид на поверхности бактерий и способствующий бактериальной аутоагглютинации через клеточные полюса. Обеспечив конститутивную экспрессию белка RapA1 у хозяйственно полезных штаммов ризобий, потенциально возможно увеличить их адсорбцию к корням бобовых растений, что позволит повысить эффективность образования клубеньков и будет способствовать формированию биопленки на поверхности корней растений. Ранее нами было показано, что, усилив экспрессию гена адгезина *rapA1* в ризобиях *R. leguminosarum* PVu5, возможно повысить эффективность образования клубеньков на корнях фасоли при инокуляции модифицированным штаммом [Нигматуллина и др., 2015]. Кроме того белок RapA1 был использован для повышения эффективности формирования симбиотических систем при многокомпонентной инокуляции растений [Хакимова и др., 2017].

Интересно упомянуть о модификации других бактерий с целью повышения их конкурентоспособности. Например, показано, что экспрессия гена *ripA*, который является рецептором Fe³⁺-сидерофорного комплекса штамма *P. putida* WCS358, в штамме *P. putida* WCS374 повышает конкурентоспособность данного штамма по отношению *P. putida* WCS358 [Raaijmakers et al., 1995].

Увеличение числа копий гена сайт-специфичной рекомбиназы *sss*, выделенной из *P. fluorescens* WCS365, усиливает колонизацию штаммов F113 и WCS307 на корнях томата [Dekkers et al., 2000]. Этот ген, играющий важную роль в перестройках ДНК, возможно, позволяет

бактериям сохранять стабильность в неблагоприятных условиях.

Искусственный тройной мутант по генам *sadB*, *wsp R* and *kinB* *P. fluorescens* F113 лучше колонизирует корни растений и обладает лучшей фунгистатической активностью против *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* и *Phytophthora cactorum* по сравнению с диким штаммом *P. fluorescens* F113 [Barahona et al., 2011].

Заключение

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 со множеством различных микроорганизмов, обитающих в ризосфере. Поэтому, несомненно, 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 ризобиями и бобовыми растениями. Несомненно, данные вещества являются перспективными инструментами для модификации существующих и создания новых ассоциативных симбиотических систем. Что касается создания новых эндосимбиозов с формированием специализированных симбиотических структур (клубеньков), то этот вопрос требует дальнейшего изучения, так как в данном случае развитие симбиотической системы связано с согласованной работой множества генов.

Благодарности

Работа была выполнена в рамках госзадания (тема № АААА-А16-116020350028-4) при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-00902 а).

Литература

1. Благова Д.К., Вершинина З.Р., Нигматуллина Л.Р., Лавина А.М., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х. Искусственные ассоциативные симбиозы между томатом и ризобиями, обладающими фунгистатической активностью //

Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50. С. 107-114. [Blagova D.K., Verшинina Z.R., Nigmatullina L.R., Lavina A.M., Baymiev An.Kh., Baymiev Al.Kh. Artificial associative symbioses between tomato plants and fungistatic *Rhizobium* // Sel'skokhozyaystvennaya biologiya. 2015. V. 50. P. 107-114.] DOI: 10.15389/agrobiology.2015.1.107rus

2. Вершинина З.Р., Баймиев Ан.Х., Благова Д.К., Князев А.В., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Биоинженерия симбиотических систем: создание новых ассоциативных симбиозов с помощью лектинов на примере табака и рапса // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. С. 336-342. [Verшинina Z.R., Baymiev An.Kh., Blagova D.K., Knyazev A.V., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Bioengineering of symbiotic systems: Creation of new associative symbiosis with the use of lectins on the example of tobacco and oil seed rape // Applied Biochemistry and Microbiology. 2011. V. 47. P. 304-310.] DOI: 10.1134/S0003683811030173

3. Вершинина З.Р., Благова Д.К., Нигматуллина Л.Р., Лавина А.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Ассоциативный симбиоз трансгенных томатов с ризобиями повышает устойчивость растений к *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* // Биотехнология. 2015. № 3. С. 42-53. [Verшинina Z.R., Blagova D.K., Nigmatullina L.R., Lavina A.M., Baymiev A.Kh., Chemeris A.V. Associative symbiosis between rhizobia and transgenic tomatoes increases plant resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* // Biotechnology. 2015. N. 3. P. 42-53.]

4. Вершинина З.Р., Нигматуллина Л.Р., Благова Д.К., Оркодашвили А.М., Баймиев Ал.Х. Искусственная ассоциативная симбиотическая система рапса с ризобиями для защиты от фитопатогенов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т.15. С. 1579-1582. [Verшинina Z.R., Blagova D.K., Nigmatullina L.R., Orkadashvili A.M., Baymiev Al.Kh. Artificial associative symbiotic system of oilseed rape with rhizobia for protection against phytopathogens // Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk. 2013. V. 15. P. 1579-1582.]

5. 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. Т. 84. 2015. С. 705-711. [Nigmatullina L.R., Lavina A.M., Verшинina Z.R., Baymiev Al.Kh. Role of bacterial adhesin RAPA1 in formation of efficient symbiosis of *Rhizobium leguminosarum* with bean plants //

- Microbiology. 2015. V. 84. P. 804-810.] DOI: 10.7868/S0026365615060099
6. Онищук О.П., Воробьев Н.И., Проворов Н.А., Симаров Б.В. Симбиотическая активность ризобий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) с генетическими модификациями системы транспорта дикарбоновых кислот // Экологическая генетика. 2009. Т. 7. С. 3-10. [Onishchuk O.P., Vorobyov N.I., Provorov N.A., Simarov B.V. Symbiotic activity of the alfalfa rhizobia (*Sinorhizobium meliloti*) strains with the genetically modified transport of dicarboxylic acids // *Ekologicheskaya genetika*. 2009. V. 7. P. 3-10.]
 7. Оркодашвили А.М., Вершинина З.Р., Нигматуллина Л.Р., Лутфуллин А. З., Баймиев Ал.Х. Создание новых ассоциативных симбиозов между сладким перцем и ризобиями, обладающими фунгистатической активностью // Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием "Современные проблемы биохимии и биотехнологии". Уфа. 2013. С. 143-147. ISBN 978-5-7477-3307-7. [Orkodashvili A.M., Vershinina Z.R., Nigmatullina L.R., Lutfullin A.Z., Baymiev Al.Kh. Creation of new associative symbioses between sweet pepper and rhizobia, possessing fungistatic activity // *Materialy vserossiyskoy nauchnoy konferentsii «Sovremennyye problemy biokhimii i biotekhnologii»*. 2013. P. 143-147.]
 8. Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Вершинина З.Р., Баймиев А.Х. Использование штаммов-продуцентов адгезина RapA1 из *Rhizobium leguminosarum* для создания бинарных биоудобрений // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. С. 400-405. [Khakimova L.R., Lavina A.M., Vershinina Z.R., Baymiev A.Kh. Usage of strain-producers of adhesin RapA1 from *Rhizobium leguminosarum* for the creation of binary biofertilizers // *Applied biochemistry and microbiology*. 2017. V. 53. P. 453-457.] DOI: 10.7868/S0555109917040080
 9. Arthikala M.-K., Nava N., Quinto C. Effect of *Rhizobium* and arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on electrolyte leakage in *Phaseolus vulgaris* roots overexpressing *RbohB* // *Plant Signal Behav.* 2015. V. 10:e1011932 DOI: 10.1080/15592324.2015.1011932
 10. Arthikala M.K., Sanchez-Lopez R., Nava N., Santana O., Cardenas L., Quinto C., Rboh B. A *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene, enhances symbiosome number, bacteroid size, and nitrogen fixation in nodules and impairs mycorrhizal colonization // *New Phytologist*. 2014. V. 202. P. 886-900. DOI: 10.1111/nph.12714
 11. 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*. *Microbiology*. 2001. V. 147. P. 549-559. DOI: 10.1099/00221287-147-3-549
 12. Barahona E., Navazo A., Martínez-Granero F., Zea-Bonilla T., Pérez-Jiménez R.M., Martín M. and Rivilla R. *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability and improved biocontrol activity against fungal root pathogens // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 5412-5419. DOI: 10.1128/AEM.00320-11
 13. Bosworth A.H., Williams M.K., Albrecht K.A., Kwiatwoski R., Beynon J., Hankinson T.R., Ronson C.W., Cannon F., Wacek T.J., Triplett E.W. Alfalfa yield response to inoculation with recombinant strains of *Rhizobium meliloti* with an extra copy of *dctABD* and/or modified *nifA* expression // *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. V. 60. P. 3815-3832.
 14. Dekkers L.C., Mulders I.H., Phoelich C.C., Chin-A-Woeng T.F., Wijffjes A.H., Lugtenberg B.J. The sss colonization gene of the tomato-*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonization of other wild-type *Pseudomonas* spp. bacteria // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2000. V. 13. P. 1177-1183. DOI: 10.1094/MPMI.2000.13.11.1177
 15. Diaz C.L., Melchers L.S., Hooykaas P.J.J., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis // *Nature*. 1989. V. 338. P. 579-581. DOI: 10.1038/338579a0
 16. Diaz C.L., Spaink H.P., Kijne J.W. Heterologous rhizobial lipochitin oligosaccharides and chitin oligomers induce cortical cell divisions in red clover roots, transformed with the pea lectin gene // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2000. V. 13. P. 268-276. DOI: 10.1094/MPMI.2000.13.3.268
 17. Fray R.G., Throup J.P., Daykin M., Wallace A., Williams P., Stewart G.S., Grierson D. Plants genetically modified to produce N-acylhomoserine lactones communicate with bacteria // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. P. 1017-1020. DOI: 10.1038/13717
 18. Guyon P., Petit A., Tempé J., Dessaux Y. Transformed plants producing opines specifically promote growth of opine-degrading agrobacteria // *Mol. Plant Microbe Interact.* 1993. V. 6. P. 92-98. DOI: 10.1094/MPMI-6-092
 19. Hirsch A.M., Brill L.M., Lim P.O., Scambray J., van Rhijn P. Steps toward defining the role of lectins in nodule development in legumes // *Symbiosis*. 1995. V. 19. P. 155-173.
 20. Janczarek M., Jaroszuk-Ścisiel J., Skorupska A. Multiple copies of *rosR* and *psaA* genes enhance

- exopolysaccharide production, symbiotic competitiveness and clover nodulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* // Antonie Van Leeuwenhoek. 2009. V. 96. P. 471–486. DOI: 10.1007/s10482-009-9362-3
21. Jung W., Yu O., Lau C.S.M., O'Keefe D.P., Odell J., Fader G., McGonigle B. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes // Nat Biotechnol. 2000. V. 18. P. 208–212. DOI: 10.1038/72671
22. Kent A.D., Wojtasiak M.L., Robleto E.A., Triplett E.W. A transposable partitioning locus used to stabilize plasmid-borne hydrogen oxidation and trifolotoxin production genes in a *Sinorhizobium* strain // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 1657–1662.
23. Li X., Qin J.C., Wang Q.Y., Wu X., Lang C.Y., Pan H.Y., Gruber M.Y., Gao M.J. Metabolic engineering of isoflavonegenistein in *Brassica napus* with soybean isoflavone synthase // Plant Cell Rep. 2011. V. 30. P. 1435–1442. DOI: 10.1007/s00299-011-1052-8
24. 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.2009.06.014
25. 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
26. Murphy P.J., Ryder M.H. The use of rhizopines for artificial rhizosphere colonization. In: Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. Ed. by M.H. Ryder, P.M. Stephens and G.D. Bowen. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Glen Osmond, Australia. 1994. P. 251–253.
27. Nielsen S.E. and Sorensen G.M. Rhizobia transformants which symbiotically fix nitrogen in non-legumes, a material for treating seeds of a non-legume plant, non-legume seeds, a non legume plant and a method for producing. U.S. Patent N. 5,229,291. 20 Jul. 1993.
28. Novikova N.I. and Pavlova E.A. Enhanced competitiveness for nodulation of *Medicago sativa* by *Rhizobium meliloti* transconjugant harbouring the root-inducing plasmids of *Agrobacterium rhizogenes* strain 15834 // FEMS Microbiology Ecology. 1993. V. 12. P. 61–68. DOI: 10.1111/j.1574-6941.1993.tb00017.x
29. Oger P., Mansouri H., Dessaux Y. Effect of crop rotation and soil cover on alteration of the soil microflora generated by the culture of transgenic plants producing opines // Mol. Ecol. 2000. V. 9. P. 881–890. DOI: 10.1046/j.1365-294x.2000.00940.x
30. Oresnik I.J., Twelker S., Hynes M.F. Cloning and characterization of a *Rhizobium leguminosarum* gene encoding a bacteriocin with similarities to RTX toxins // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 2833–2840.
31. Pii Y., Astegno A., Peroni E., Pandolfini T., Crimi M. The *Medicago truncatula* N5 gene encoding a root-specific lipid transfer protein is required for the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti* // Mol. Plant Microbe. Interact. 2009. V. 22. P. 1577–1587. DOI: 10.1094/MPMI-22-12-1577
32. Pii Y., Molesini B., Masiero S., Pandolfini T. The nonspecific lipid transfer protein N5 of *Medicago truncatula* is implicated in epidermal stages of rhizobium-host interaction // BMC Plant Biology. 2012. V. 12. P. 233. DOI: 10.1186/1471-2229-12-233
33. Pii Y., Molesini B., Pandolfini T. The involvement of *Medicago truncatula* non-specific lipid transfer protein N5 in the control of rhizobial infection // Plant Signal Behav. 2013. V. 8. DOI: 10.4161/psb.24836
34. Pii Y., Pandolfini T., Crimi M. Signaling LTPs: a new plant LTPs sub-family? // Plant Signal Behav. 2010. V. 5. P.594–597. DOI: 10.4161/psb.11499
35. Raaijmakers J.M., van der Sluis I., Koster M., Bakker P.A.H.M., Weisbeek P.J., Schippers B. Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. // Can. J. Microbiol. 1995. N. 41. P. 126–135. DOI: 10.1139/m95-017
36. Robleto E.A., Kmiecik K., Oplinger E.S., Nienhuis J., Triplett E.W. Trifolotoxin production increases nodulation competitiveness of *Rhizobium etli* CE3 under agricultural conditions // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 2630–2633.
37. Rolfe B.G., Bender G.L. Evolving a *Rhizobium* for non-legume nodulation. In: Nitrogen fixation: Achievements and objectives. Ed. by P.M. Gresshoff L.E. Rolh. G. Stacey and W.E. Newton. Chapman and Hall, New York. 1990. P. 329–339. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6432-0_65
38. Rossbach S., McSpadden B., Kulpa D., LeTinevez R., Rasul G., Schneider M. and de Bruijn F. J. Use of rhizopine synthesis and catabolism genes to create biased rhizospheres. In: Abstracts of the 7th International Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions. Edinburgh. 1994.
39. Rossbach S., McSpadden B., Kulpa D., Rasul G., Ganoff M., and de Bruijn F. J. Use of rhizopine

- synthesis and catabolism genes to monitor soil bacteria and to create biased rhizospheres // *Mol. Ecol.* 1994. V. 3. P. 610–611.
40. Savka M.A., Farrand S.K. Modification of rhizobacterial populations by engineering bacterium utilization of a novel plant-produced resource // *Nat. Biotechnol.* 1997. V. 15. P. 363–368. DOI: 10.1038/nbt0497-363
41. Scott R.A., Weil J., Le P.T., Williams P., Fray R.G., von Bodman S.B., Savka M.A. Long- and short-chain plant-produced bacterial N-acyl-homoserine lactones become components of phyllosphere, rhizosphere, and soil // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2006. V. 19. P. 227–239. DOI: 10.1094/MPMI-19-0227
42. Scupham A.J., Bosworth A.H., Ellis W.R., Wacek T.J., Albrecht K.A., Triplett E.W. Inoculation with *Sinorhizobium meliloti* RMBPC-2 increases alfalfa yield compared with inoculation with a non-engineered wild-type strain // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. P. 4260–4262.
43. Sreevidya V.S., Hernandez-Oane R.J., So R.B., Sullia S.B., Stacey G., Ladha J.K., Reddy P.M. Expression of the legume symbiotic lectin genes *psl* and *gs52* promotes rhizobial colonization of roots in rice // *Plant Sci.* 2005. V. 169. P. 726–736. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.05.024
44. Sreevidya V.S., Srinivasa Rao C., Sullia S.B., Ladha J.K., Reddy P.M. Metabolic engineering of rice with soybean isoflavone synthase for promoting nodulation gene expression in rhizobia // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. P. 1957–1969. DOI: 10.1093/jxb/erj143
45. Tirichine L., Jensen J.S., Sandal N., Madsen L.H. Spontaneous nodulation in plants. U.S. Patent N. 8,273,955. 25 Sep. 2012.
46. Triplett E.W. Construction of a symbiotically effective strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with increased nodulation competitiveness // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. V. 56. P. 98–103.
47. Untergasser A., Bijl G.J., Liu W., Bisseling T., Schaart J.G., Geurts R. One-step *Agrobacterium* mediated transformation of eight genes essential for *Rhizobium* symbiotic signaling using the novel binary vector system pHUGE // *PLoS One.* 2012. V. 7. e47885. DOI: 10.1371/journal.pone.0047885.
48. van Dillewijn P., Soto M.J., Villadas P.J., Toro N. Construction and environmental release of a *Sinorhizobium meliloti* strain genetically modified to be more competitive for alfalfa nodulation // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 3860–3865. DOI: 10.1128/AEM.67.9.3860–3865.2001
49. van Eijsden R.R., Díaz C.L., de Pater B.S., Kijne J.W. Sugar-binding activity of pea (*Pisum sativum*) lectin is essential for heterologous infection of transgenic white clover hairy roots by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // *Plant Mol. Biol.* 1995. V. 29. P. 431–439. DOI: 10.1007/BF00020975
50. van Rhijn P., Fujishige N.A., Lim P.O., Hirsch A.M. Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // *Plant Physiol.* 2001. V. 126. P. 133–144 DOI: 10.1104/pp.126.1.133
51. van Rhijn P., Goldberg R.B., Hirsch A.M. *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene // *Plant Cell.* 1998. V. 10. P. 1233–1250. DOI: 10.1105/tpc.10.8.1233
52. Vershinina Z.R., Baymiev An.K., Baymiev Al.K. and Chemeris A.V. A tool for creation artificial symbiotic associations of wheat // *WASET.* 2013. V. 75. P. 157–159.
53. Vershinina Z.R., Baymiev An.K., Blagova D.K., Chubukova O.V., Baymiev Al.K., Chemeris A.V. Artificial colonization of non-symbiotic plants roots with the use of lectins // *Symbiosis.* 2012. V. 56. P. 25–33. DOI: 10.1007/s13199-012-0156-4
54. Wilson M, Savka MA, Hwang I, Farrand SK, Lindow SE. Altered epiphytic colonization of mannitol opine-producing transgenic tobacco plants by a mannitol opine-catabolizing strain of *Pseudomonas syringae* // *Appl Environ Microbiol.* 1995. V. 61. P. 2151–2158.