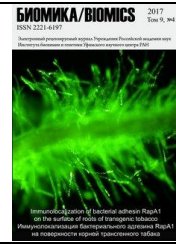




БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



РОЛЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АДГЕЗИНОВ И ДРУГИХ КОМПОНЕНТОВ КЛЕТОК НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

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

¹Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, Россия

²Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

E-mail: lili-nigmatullina@bk.ru

Резюме

В данном обзоре рассматриваются компоненты клеток бактерий, участвующие на ранних этапах формирования растительно-микробных взаимодействий. Для успешного прикрепления бактериальных клеток необходим синтез бактериальных поверхностных полисахаридов (экзополисахаридов (ЭПС), липополисахаридов (ЛПС), капсулярных полисахаридов (КПС, К-антигены)), лектинов растений и бактериальных адгезинов, в том числе и белка RapA1. Адгезин RapA1 имеет сходство с рикадгезином, так как он также может связывать Ca^{2+} и участвовать в адсорбции бактерий к поверхности корневых волосков растений, но отличается некоторыми биохимическими свойствами и имеет размер 24 кДа вместо 14 кДа. Кроме того, RapA1 является производным только небольшой группы ризобий. Все эти компоненты являются молекулами-посредниками в растительно-микробных взаимодействиях и критичны для формирования эффективных симбиозов.

Нами была поставлена цель – исследовать возможность использования бактериального адгезина RapA1 *R. leguminosarum* в качестве инструмента для создания искусственных ассоциаций культурных растений с PGPR микроорганизмами. Для ее выполнения были получены рекомбинантные штаммы ризобий *R. leguminosarum* с повышенной продукцией белка RapA1, а также штаммы *R. galegae* и *E. coli*, в которых данный белок синтезируется *de novo*. Исследования показали усиление способности модифицированных штаммов к аутоагглютинации, что свидетельствует о повышении адгезивных свойств.

Бактериальный адгезин RapA1 *R. leguminosarum* можно использовать в качестве инструмента для улучшения эффективности формирования существующих эндосимбиозов, а также для создания ассоциативных симбиотических систем *de novo*. При этом спектр штаммов не ограничивается ризобиями, так как данный адгезин не обладает строгой специфичностью по отношению к данным микросимбионтам. Кроме свойств адгезина белок RapA1 имеет также агглютинирующую способность, что является необходимым в процессах формирования биопленок на поверхности корней растений, что также повышает конкурентоспособность интродуцированных штаммов ризобий в условиях агроценоза.

Ключевые слова: PGPR-микроорганизмы, ризобии, адгезин RapA1, бактериальная аутоагглютинация, биопленка, ЭПС, ЛПС, КПС

THE ROLE OF BACTERIAL ADHESINS AND OTHER COMPONENTS OF CELLS AT THE INITIAL STAGES OF PLANT-MICROBIAL INTERACTIONS

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

¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Sci. Center of RAS, Ufa, Russia

²Bashkir State University, Ufa, Russia

E-mail: lili-nigmatullina@bk.ru

Resume

In this review we consider the components of bacterial cells involved in the early stages of the formation of plant-microbial interactions. For the successful attachment of bacterial cells, the synthesis of bacterial surface polysaccharides (exopolysaccharides (EPS), lipopolysaccharides (LPS), capsular polysaccharides (KPS, K-antigens)), plant lectins and bacterial adhesins, including the RapA1 protein, is necessary. All these components are molecules mediators in plant-microbial interactions and are critical for the formation of effective symbiosis.

Our goal was to investigate the possibility of using the bacterial adhesin RapA1 *R. leguminosarum* as a tool for creating artificial associations of cultivated plants with PGPR microorganisms.

To achieve this goal, recombinant *R. leguminosarum* rhizobium strains with increased production of RapA1 protein, as well as *R. galegae* and *E. coli* strains, in which the protein was synthesized de novo, were obtained. Studies have shown an increase in the ability of modified strains to autoagglutination, which indicates an increase in adhesive properties.

The bacterial adhesin RapA1 of *R. leguminosarum* can be used as a tool for improving the efficiency of the formation of existing endosymbiosis, as well as for creating associative symbiotic systems de novo. Moreover, the spectrum of strains is not limited to rhizobia, since this adhesive does not have strict specificity with respect to these microsymbionts. In addition to the properties of the adhesive, the RapA1 protein also has an agglutinating capacity, which is necessary in the processes of biofilm formation on the surface of plant roots, which also increases the competitiveness of the introduced rhizobium strains in agroecosystems.

Key words: PGPR microorganisms, rhizobia, RapA1 adhesin, bacterial autoagglutination, biofilm, EPS, LPS, KPS

Введение

Корневая зона растений заселена множеством микроорганизмов, которые составляют 60–90% почвенной биоты [Благодатская и др., 2004; Патика и др., 2007]. Бактерии распространены в почве неравномерно: основная масса сконцентрирована в ризосфере растений, в которой накапливаются выделяемые корнями растительные экссудаты, кроме того, корни определенного растения «заселяются» только определенными видами микроорганизмов, специфических именно к данному растению [Ryan, Delhaize, 2001]. Ризосфера – слой почвы, прилегающая к корням растений (от греч. rhiza – корень и sphaira – шар, область), где обитают уникальные популяции микроорганизмов [Hartmann, 2008]. Именно в ризосфере осуществляются тесные взаимоотношения между растением и микроорганизмами. Такое взаимовлияние может быть как положительным (мутуалистическим), так и отрицательным (антагонистическим) [Spaink, 2002]. Мутуалистический эффект проявляется в улучшении снабжения микроорганизмов питательными веществами, а растения в свою очередь получают защиту от фитопатогенов, индукцию резистентности к заболеваниям, а также улучшение минерального питания. Антагонистической стороной взаимодействия растений и микроорганизмов является ингибирование роста друг друга, а также различные бактериозы и другие заболевания [Наплекова, Чудинова, 2009].

Наиболее важными и изучаемыми мутуалистическими отношениями считаются микоризные, актиноризные, бобово-ризобиальные и ассоциативные симбиозы.

Ростостимулирующие ризобактерии и возможности их применения

Ассоциативный симбиоз образуют бактерии, колонизирующие ризосферу и ускоряющие рост растений с помощью различных механизмов, которые называются ростостимулирующими ризобактериями (от Plant Growth-Promoting Rhizobacteria или PGPR – ризобактерии, способствующие росту растений) [Dey et al., 2004; Herman et al., 2008]. PGPR – это обширная группа бактерий, влияющих на всхожесть семян, увеличивающих массу растений и повышающих урожайность [Клоерперг et al., 2003]. Применение PGPR в сельском хозяйстве позволяет снизить уровень использования химических удобрений, пестицидов [Моргун и др., 2009], а также увеличить рост важных сельскохозяйственных культур [Lucy et al., 2004] и подавлять рост патогенов растений [Probanza et al., 2001; Reser et al., 2009], в том числе патогенных грибов [Благова и др., Оркодашвили, 2013; Вершинина и др., 2013, 2015]. Кроме того, обработка растений PGPR вызывает у них развитие защитных механизмов, например, приводит к состоянию индуцированной системной устойчивости [Клоерперг et al., 1999].

К PGPR-бактериям принадлежат микроорганизмы, относящиеся к следующим родам: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*,

Azotobacter, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Beijerinckia*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Vario-vovax*, *Xanthomonas* и *Phyllobacterium* [Kloepper, 1999; DeFreitas, 1990; Young, 1995; Quadt-Hallmann, 1997; DeSilva, 2000; Bullied, 2002; Nicholson, 2002;]. Наиболее широко из них изучены *Azospirillum* [Bashan et al., 2004], *Pseudomonas* [Kloepper et al., 1999; Cattelan et al., 1999; Adesemoye, 2009], *Bacillus* [Probanza et al., 2001; Recep et al., 2009], *Burkholderia* [Joo et al., 2009].

PGPR-бактерии характеризуются положительными (прямыми и косвенными) действиями на растения [Liu, Zhang, 2015]. К прямым относится синтез бактериями некоторых метаболитов (ауксинов, цитокининов и гиббереллинов), индукция 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (АЦК) деаминазы, продуцирование сидерофоров, синтез антибиотиков и цианида водорода (HCN), летучих и гормоноподобных соединений. Косвенные механизмы включают в себя растворение минералов (например, неорганического фосфора), а также облегчение усвоения растениями различных питательных веществ из окружающей среды, например, растворение фосфатов и фиксация атмосферного азота [Glick, 1995; Kao et al., 2005; Цавкелова и др., 2005; Kang et al., 2006; Цавкелова и др., 2006; Ashraf, 2013].

Ризобии как PGPR

Существует много работ, посвященных исследованию образования ассоциативных симбиотических систем на корнях бобовых растений различными штаммами ризобий. Например, было обнаружено, что клубеньковые бактерии способны существовать в почве даже в отсутствие бобового растения-хозяина и колонизировать корни бобовых растений [Perez-Montano, 2014]. Так была показана возможность колонизации бактериями *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* корней кукурузы и салата [Chabot et al., 1996]. Эндофитная колонизация ризобиями бобовых растений была обнаружена на таких растениях как рис [Yanni et al., 2001], кукуруза [Gutiérrez-Zamora and Martínez-Romero, 2001], табак [Ji et al., 2010]. Показана колонизация корней томата и перца штаммами *R. leguminosarum* и стимуляция роста этих растений [García-Fraile et al., 2012].

Таким образом, бактерии рода *Rhizobium* (клубеньковые бактерии или ризобии) являются одной из наиболее важных и перспективных групп PGPR, поскольку инокуляция ими бобовых и бобовых растений может широко применяться в сельском хозяйстве для повышения урожайности [Тихонович, Круглов, 2006; Pena, Reyes, 2007].

По многим литературным данным ризобии обладают ростостимулирующим эффектом, который

обеспечивается путем синтеза веществ фитогормональной природы (ауксины, гиббереллины, цитокинины и другие), витаминов, веществ антибиотической и противогрибковой природы, фиксации молекулярного азота, ингибирования синтеза этилена растений и т.д. [Цавкелова и др., 2005, 2006; Kao et al., 2005; Kang et al., 2006].

Тем не менее, некоторые исследования показали, что инокуляция растений ризобиями также может оказывать и негативное влияние на рост и урожайность небобовых. Например, *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, выделенный из клубеньков клевера, ингибирует развитие риса [Perrine et al., 2001]. Аналогичным образом, Antoun и Prevost [2006] показали, что штаммы *Rhizobium* проявляют двойственный эффект воздействия на рост небобовых культур как положительный, так и негативный. Исходя из этого, они пришли к выводу, что только конкретные штаммы *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* могут обладать потенциалом для использования их в качестве PGPR небобовых растений [Antoun, Prevost, 2006].

PGPR-микроорганизмы могут выступать в качестве эффективного стимулятора роста и урожайности растений путем улучшения ризобияльной фиксации атмосферного азота. Одна из наиболее значимых черт ризобактерий – несимбиотическая фиксация азота, и некоторые исследователи полагают, что ризобии способны фиксировать азот и в ассоциативном симбиозе с небобовыми растениями. Например, Sabry [1997] выявил высокий уровень нитрогеназной активности, и, как следствие, увеличение роста и содержания азота в пшенице, инокулированной *Azorhizobium caulinodans* [Sabry, 1997]. Так же была обнаружена редукция ацетилена в растениях риса, инокулированных *Bradirhizobium* [Chaintreuil et al., 2000] и *A. caulinodans* [Naidu et al., 2004]. Также влияние ризобий было изучено на репе: обработка семян штаммами ризобий значительно увеличивало их всхожесть (от 26% до 64% выше показателя контрольных растений). Кроме того, было показано положительное влияние ризобий на рост проростков репы. Такие результаты подтверждают положительное влияние PGPR-бактерий на всхожесть и рост бобовых растений [Лавина и др., 2015].

Таким образом, селекция различных штаммов ризобий в качестве альтернативы пестицидам и удобрениям, которая позволит создать современные технологии в сельском хозяйстве для увеличения урожая и улучшения его качества является актуальной проблемой на сегодняшний день [Соколова и др., 2009]. В связи с этим необходимо получать новые эффективные штаммы клубеньковых

бактерий. Одним из критериев выбора эффективного штамма может служить его адгезионная способность, ввиду того, что прикрепление бактериальной клетки к корневым волоскам растений является критичным этапом в формировании растительно-микробных взаимодействий.

Бактериальные и растительные компоненты клеток, участвующие на ранних этапах формирования растительно-микробных взаимодействий

На начальных этапах формирования бобово-ризобиального симбиоза корнями бобовых растений выделяются флавоноиды, которые индуцируют у клубеньковых бактерий экспрессию генов клубенькообразования (*nod*-гены). В результате ризобии синтезируют так называемые Nod-факторы. Nod-факторы (NF) – сигнальные вещества, липохитоолигосахаридной природы, состоящие из трех-пяти 1-4 β-связанных остатков ацетил-глюкозамина. Тем не менее, различные модификации этой основной структуры возможны, и каждый вид ризобий производит определенный набор NF [Cooper, 2007].

NF не являются единственными детерминантами специфичности симбиоза, кроме них необходимы и другие факторы для формирования активных клубеньков [Perret et al., 2000; Цыганова, Цыганов, 2012]. Для успешного симбиоза необходим также синтез экзополисахаридов (ЭПС), липополисахаридов (ЛПС), капсулярных полисахаридов (КПС, К-антигены) и поверхностных белков. Мутации по генам, кодирующим эти вещества, приводят к нарушениям инфекционного процесса [Цыганова, Цыганов, 2012].

Первоначальным этапом необходимым для инфекционного процесса и формирования клубеньков является прикрепление ризобий к корням растений-хозяина. Ранее исследователи предполагали, что специфичность бактерий к растению-хозяину проявляется уже на этапе адгезии, но сейчас считается, что ризобии на начальных этапах прикрепляются к корням неспецифично с помощью своих поверхностных компонентов [Rodriguez-Navarro et al., 2007; Cooper et al., 2007].

Первый этап адгезии является слабым и обратимым, в нем участвуют бактериальные поверхностные полисахариды, лектины растений и бактериальные адгезины, в том числе Ca²⁺-связывающие белки. В это же время начинается формирование микробной биопленки на корнях растений. Следующая фаза адсорбции ризобий к корням растений, опосредуемая бактериальными целлюлозными фибриллами, является более сильной и уже необратимой [Laus et al., 2005; Rodriguez-Navarro et al., 2007; Цыганова, Цыганов, 2012].

Таким образом, разные компоненты клеточной поверхности ризобий способствуют прикреплению и агрегации бактерий на поверхности корней растений, а также в той или иной степени влияют на образование клубеньков [Цыганова, Цыганов, 2012].

Бактериальная аутоагглютинация

Интересным свойством микроорганизмов является тенденция к агрегированию. Общее фенотипическое проявление такого поведения – аутоагглютинация, которая основана на адгезивных взаимодействиях между бактериями. Аутоагглютинация может быть определена путем визуализации скоплений (конгломератов/агрегатов) бактериальных клеток в статических условиях [Sorroche et al., 2010]. Было установлено, что при неблагоприятных условиях роста или низкой метаболической активности индуцируется формирование скопления бактерий, которые обычно растут без агрегирования. В таком случае можно говорить о том, что аутоагглютинация является стратегией выживания, которая срабатывает при неблагоприятных условиях среды [Bahat-Samet et al., 2004; Klebensberger et al., 2009].

Аутоагглютинация рассматривается как характеристика микроорганизмов, которая имеет важное значение для производства биопрепаратов на основе бактерий для сельского хозяйства. Биомасса агрегированных бактериальных клеток в биореакторах остается более постоянной, а выживаемость бактерий увеличивается по сравнению с неагрегированными клетками [Malik et al., 2003; Bahat-Samet et al., 2004].

Таким образом, некоторые бактерии выделяют молекулы, которые способствуют агглютинации. В основном, в качестве «молекулярного клея» у бактерий выступают агглютинины и ЭПС [González et al., 1996], синтез которых индуцируется при неблагоприятных условиях окружающей среды или низкой метаболической активности. Например, агрегатное состояние ризобактерий *A. brasilense* зависит от производства арабиноза-богатых внеклеточных полисахаридов [Klebensberger et al., 2009], а у ризобактерий *Sinorhizobium meliloti* агглютинация и образование биопленки зависят от комбинации бактериальных сигналов, поверхностных компонентов и ЭПС [Sorroche et al., 2010; Rinaudi, Giordano, 2010]. Следовательно, бактерии имеют уникальную способность образовывать сложные клеточные ассамблеи на биотических и абиотических поверхностях. В зависимости от количества бактериальных клеток и внеклеточных компонентов такие скопления варьируют от агрегированных бактерий, наблюдаемых на поверхности или в жидкой

суспензии, до сложных собраний клеток, заключенных в экзополимерную матрицу и прикрепленных к поверхности, то есть до биопленок [Stoodley et al., 2002].

Агглютинация бактерий на различных поверхностях, скорее всего, представляет собой переходное состояние, которое предшествует развитию структурированной биопленки. Переход от бактериальной агрегации к образованию биопленки имеет решающее значение для создания положительных или патогенных взаимоотношений между бактериями и растениями [Dulce et al., 2007].

Биопленки

Биопленки – это бактериальные сообщества, состоящие из клеток, которые прикреплены к поверхности или друг к другу и заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ (в первую очередь ЭПС) [Branda et al., 2005]. Также активную роль при формировании биопленок играют ЛПС и NF [Fujishige et al., 2008; Rinaudi, Giordano, 2010]. Биопленки помогают защищать бактерии от неблагоприятных условий среды и являются важным фактором в жизненном цикле бактериальных патогенов животных и растений [Davey et al., 2000]. Ризосфера формирует среду, отвечающую всем требованиям для формирования биопленок. Исследования изолятов показали весьма упорядоченную, трехмерную организацию внеклеточного матрикса, который имеет большое значение для физиологии микроорганизмов, образующих биопленки [Rudgrappa et al., 2008]. Формирование биопленок на растениях связано с появлением симбиотических и патогенных реакций. Однако не выяснено, как растения регулируют создание ассоциаций с бактериями. Биопленки функционируют как структуры устойчивые к стрессовым факторам, таким как засуха, УФ-излучения, хищничество и антибиоз, защищая таким образом, ризобии [Стрелкова и др., 2013]. Многие виды PGPR-бактерий, включая ризобии, образуют микроколонии или биопленки во время колонизации корней растений [Rinaudi, Giordano, 2010]. Развитие биопленки также способствует повышению вирулентности фитопатогенных бактерий, например, путем блокирования сосудов ксилемы, повышения устойчивости к растительным антимикробным соединениям и/или увеличения конкурентоспособности в конкретных местах обитания [Mansfield et al., 2012]. Процессы аутоагглютинации и развитие биопленок способствуют выживаемости бактерий и колонизации макросимбионта. Взаимовлияние этих процессов показано на рисунок 1.



Рисунок 1. Связь бактериальной аутоагглютинации и формирования биопленок с колонизацией корней растений [по Bogino et al., 2013].

Тем не менее, продолжается изучение роли биопленок в симбиозах, так как механизмы, участвующие в их формировании и закреплении на корнях растений, а также соотношение этих механизмов в выживании ризобий еще не выяснены и пересматриваются [Fujishige et al., 2008; Rinaudi, Giordano, 2010].

Полисахариды клеточной стенки ризобий

Клеточная стенка ризобий имеет типичное строение для грамотрицательных бактерий [Rodriguez-Navarro et al., 2007]. Секретируемые бактериями клеточные компоненты свободно находятся на поверхности ризобий и являются сигнальными молекулами в процессах адсорбции бактерий к поверхности растений [Цыганова, Цыганов, 2012].

Экзополисахариды (ЭПС) находятся на клеточной поверхности ризобий и являются штамм-специфическими кислыми гетерополисахаридами [Цыганова, Цыганов, 2012]. Функции и химический состав ЭПС различаются в зависимости от вида или штамма бактерий. Некоторые штаммы способны производить различные ЭПС в зависимости от условий окружающей среды, например, *P. aeruginosa* [Ryder et al., 2007] и *Streptococcus thermophilus* [Vaningelgem et al., 2004]. Углеводные компоненты, выявляемые в ЭПС ризобий, представляют собой в основном моносахариды, такие как D-глюкоза, D-галактоза, D-манноза, D-глюкуроновая кислота и D-галактуроновая кислота. Неуглеводные заместители обычно представлены О-ацетильными группами, а также кетосвязанными пируватными и сукцинильными полуэфирными группами, реже встречаются гидроксипутанол, пропионил и глицерол. В дополнение к уроновым кислотам в

состав ризобияльных ЭПС входят отрицательно заряженные радикалы, которые определяют их кислую реакцию. Также были описаны поликатионные ЭПС [Jefferson, 2009]. Наличие β -1,4 [или β -1,3] и α -1,2 [или α -1,6] взаимосвязей дают большую жесткость и гибкость структуре матрицы биопленок. Таким образом, стабильность структуры биопленки зависит от физико-химических и биологических свойств ЭПС и от их взаимодействия с ионами растворенных веществ, с низкой молекулярной массой и других макромолекул. ЭПС придают механическую стабильность и архитектуру биопленкам, а также играют важную роль в основных функциях матрикса, в том числе в удержании воды, защите от экологических стрессов, адсорбции соединений и наличии питательных веществ [Flemming, 2010].

ЭПС играют важную роль в процессах адаптации и прикрепления бактерий, защиты ризобияльных клеток от негативных влияний окружающей среды, а также в питании и проявлении антигенных свойств [Markova et al., 2007].

Липополисахариды (ЛПС) являются важными поверхностными компонентами грамотрицательных бактерий с молекулярной массой около 10 кДа. ЛПС – имеет три структурных домена, состоящих из липида А, корового олигосахарида и О-антигена, формируются амфифильными гликоконъюгатами, состав которых меняется внутри и между видами [Цыганова, Цыганов, 2012]. Ввиду расположения на поверхности клеток и физико-химических свойств, ЛПС играют ключевую роль на начальных этапах формирования биопленок (например, во время адгезии к поверхности корней) [Bogino et al., 2013]. Молекулы ЛПС расположены среди белков и фосфолипидов внешней мембраны бактерий и влияют на ее структурные свойства. Например, действуют в качестве барьера в отношении различных видов молекул при прохождении через мембрану. Структурная неоднородность О-антигена (самая внешняя часть молекулы ЛПС) придает гибкость и адаптивность бактериям, которые подвергаются различным воздействиям окружающей среды [Lerouge, Vanderlayden, 2002]. Изменения структуры ЛПС влияют на силу адгезии бактерий, возможно, за счет изменения гидрофобности клеточной мембраны. Модификации ЛПС у ризобий обычно изменяют фенотип аутоагглютинации [Bogino et al., 2013]. Также О-антиген во внешней части ЛПС фитопатогена *Xylella fastidiosa* участвует в межклеточной агрегации [Clifford et al., 2013]. Агрегирующая способность *X. fastidiosa* является важным механизмом вирулентности, так как бактериальные кластеры блокируют прохождение

воды и питательных веществ от корней в листья макросимбионта [Bogino et al., 2013].

Как было показано, структурные изменения ЛПС ризобактерий изменяют процесс образования биопленок, например, у *Pseudomonas fluorescens* [Spiers, Rainey, 2005]. У *B. japonicum* мутантный О-антиген показал повышенную адгезию также к пластмассовым опорам [Lee et al., 2010]. Липидный мутант *R. leguminosarum* продемонстрировал увеличение латерального взаимодействия с абиотической поверхностью, однако, этот эффект не оказывал влияния на способность бактерий образовывать биопленки [Vanderlinde et al., 2009].

Капсулярные полисахариды (КПС, К-антигены) тесно связаны с бактериальными клетками, образуя капсулу вокруг бактерий. В настоящее время известно два типа ризобияльных КПС [Townsend, Keating, 2008]. Первый тип состоит из нейтрального полисахарида, который был обнаружен у штаммов *R. leguminosarum*. Второй тип КПС представляет собой класс кислых полисахаридов варьирующей структуры. Общим для большинства из них является присутствие 3-дезоксид-манно-2-дезоксидоктоновой кислоты (Кдо) и ее вариантов. Считалось, что КПС не имеет липидной части, однако, был обнаружен фосфолипидный якорь ризобияльных КПС. Кроме того, у штамма *S. meliloti* Rm1021 был идентифицирован КПС низкой молекулярной массы, который состоит исключительно из β -(2→7)-связанных остатков Кдо [Frayse et al., 2005; Цыганова, Цыганов, 2012].

При изучении КПС ризобий было выявлено, что они являются штамм-специфичными антигенами. Продукция одного или более КПС может зависеть от условий роста культивируемых клеток, например, температуры, pH среды, и факторов растительного происхождения, в том числе флавоноидов [Becker et al., 2005; Цыганова, Цыганов, 2012].

Таким образом, ЭПС являются необходимыми элементами взаимодействия на ранних стадиях инфекционного процесса. Ризобияльные NF и ЭПС играют ключевую роль в инициации развития инфекционных нитей и их удлинении [Gage, 2004]. ЛПС проявляются на более поздней стадии образования клубеньков при проникновении инфекционных нитей в клетки кортекса. Полисахариды способствуют преодолению защитных реакций растений, что позволяет бактериям проникать в их корни [Frayse et al., 2003].

Бактериальные адгезины

Адгезины – поверхностные компоненты клеток, определяющие процесс адсорбции. Бактериальные адгезины могут быть различной природы: белковой (у определенных штаммов

E. coli), липидной или углеводной (у некоторых фитопатогенных бактерий). У ризобий адгезивными свойствами обладают поверхностные полисахариды клеток и поверхностные белки, такие как рикадгезин и другие. Адгезины (агглютинины) являются молекулами-посредниками для прикрепления клубеньковых бактерий к корням бобовых растений.

Большинство таких агглютининов имеют растительное или бактериальное происхождение. Последние специфически связываются с макросимбионтом или с бактериями, которые вырабатывают данный адгезин [Mongiardini et al., 2008]. В таблице 1 приведены примеры некоторых бактериальных адгезинов.

Таблица 1.

Поверхностные белки бактерий, обладающие адгезивными свойствами

Адгезин	Действие адгезина	Источник
рикадгезин	Белок семейства <i>Rhizobiaceae</i> , опосредующий прикрепление бактерий к корневым волоскам растений.	Smit et al., 1992.
RapA1	Поверхностный клеточно-ассоциированный агглютинин <i>R. leguminosarum</i> и <i>R. etli</i> , который распознает полисахариды на поверхности бактерий и способствует агглютинации ризобий через клеточные полюса.	Ausmees et al., 2001; Mongiardini et al., 2008, 2009.
LapA LapB LapC LapD LapF	Белки <i>P. putida</i> NBRC 14164, <i>P. fluorescens</i> 721. Имеют адгезивные свойства, С-конец специфически связывается с Ca^{2+} .	Hinsa, 2003; Cho, 2009; Martínez-Gil, 2014.

На начальной стадии адсорбции бактериальных клеток к корням растений все ризобии используют Ca^{2+} -связывающие белки, называемые рикадгезинами [Smit et al., 1992]. Рикадгезины (rhicadhesin) – белки, обладающие двумя обязательными функциональными центрами: для рецептора, локализованного на бактериальной поверхности клетки, и для рецептора на поверхности корневого волоска растений. Рикадгезин был найден у различных представителей семейства *Rhizobiaceae*, но не у других семейств микроорганизмов [Spaink, 2002]. Было показано, что решающее значение в заякоривании белка играет наличие ионов Ca^{2+} на поверхности бактерий [Smit et al., 1992]. Клетки *R. leguminosarum* bv. *viciae*, выращенные при низких концентрациях Ca^{2+} , показывают пониженную адсорбцию к поверхности корневых волосков гороха (*Pisum sativum*). В таких условиях рикадгезин освобождается с бактериальной поверхности в питательную среду. Сами ионы Ca^{2+} не участвуют в связывании рикадгезина с корневой поверхностью, вместо этого, Ca^{2+} заякоревает рикадгезин на поверхности ризобияльных клеток [Smit et al., 1992; Rodriguez-Navarro et al., 2007].

По предположению Laus с соавт. [2006] прикрепление ризобий к кончикам корневых волосков растений является чувствительным к pH среды. Так в слабощелочных условиях среды прикрепление бактерий к корням растений опосредуется рикадгезином [Laus et al., 2006].

Ризобияльный адгезин RapA1

Некоторые адгезины могут опосредовать определенный тип адсорбции, например, прикрепление к корням, но не к инертным поверхностям. К таким адгезинам относятся белки адгезии семейства Rap (*Rhizobium*-adhering proteins), выделенные из *R. leguminosarum* bv. *trifolii* [Ausmees et al., 2001]. Они содержат один или несколько так называемых RA доменов, которые имеют высокую степень гомологии и состоят из 100-120 аминокислот. Известно несколько белков данного семейства: RapA, RapB и RapC. RapA белок имеет два RA домена и две изоформы, называемые RapA1 и RapA2. RapA1 имеет сходство с рикадгезином, так как он также может связывать Ca^{2+} и участвовать в адсорбции бактерий к поверхности корневых волосков растений, но, тем не менее, отличается некоторыми биохимическими свойствами и имеет размер 24 кДа вместо 14 кДа. Кроме того, RapA1 является производным только небольшой группы ризобий [Ausmees et al., 2001]. С помощью RapA1-антител данный белок был обнаружен только у близкородственных штаммов и видов: *R. leguminosarum* bvs. *trifolii*, *viciae*, *phaseoli* и *R. etli*, а не у всех представителей рода *Rhizobium* [Ausmees et al., 2001]. В соответствии с этим, в геномах *R. leguminosarum* и *R. etli* были найдены гомологичные Rap последовательности. В естественных условиях белок RapA1 распознает полисахариды на поверхности бактерий и способствует агглютинации ризобий через клеточные полюса [Ausmees et al., 2001].

Было показано, что последовательность гена *rapA1* имеет гомологию с PssP (ЭПС полимеризации белка в *R. leguminosarum* bv. *trifolii*; GenBank AF067140), а также большое сходство с последовательностью EhoP, кодирующую сукциногликан-транспортные белки у *Sinorhizobium meliloti* [Glucksmann et al., 1993]. Эти данные могут говорить о том, что ген белка RapA1 располагается вблизи кластера генов, участвующих в синтезе кислых ЭПС (симбиотически активных веществ у некоторых ризобий) [Ausmees et al., 2001].

RA области RapA1, RapA2, RapB и RapC белков имеют гомологию с С-концевой частью белков PlyA и PlyBR. *leguminosarum* [Finnie et al., 1998], которые являются внеклеточными белками, способными деградировать ЭПС и карбоксиметилцеллюлозу [Ausmees et al., 2001; D'Haese et al., 2004].

Ausmees с соавт. [2001] доказали, что RapA1 является Ca^{2+} -связывающим белком. Для этого использовали RapA1 белок с укороченным С-концом (RapA1d). Иммуноблоттинг на нитроцеллюлозном фильтре дал значительно более сильный сигнал с целым RapA1 белком по сравнению с мутантным RapA1d. Это показало, что С-конец белка, который укорочен в RapA1d, участвует в связывании Ca^{2+} [Ausmees et al., 2001]. Для доказательства того, что RapA1 является полярным клеточно-ассоциированным поверхностным белком, Ausmees с соавт. (2001) провели косвенный иммунофлуоресцентный анализ с клетками ризобий и цельными и мутантными белками RapA1. Было показано, что при рассмотрении клеток под флуоресцентным микроскопом сигналы были расположены исключительно на одном полюсе бактерий. Кроме того, цельный RapA1 белок содержал большие, сильно флуоресцирующие скопления агрегированных бактерий. Это доказывает, что белок, содержащий два функциональных Ra домена, может агглютинировать бактерии, а неспособность RapA1d белка к агрегации показывает, что удаление аминокислот с С-конца белка делает и второй Ra домен нефункциональным. Все это подтвердило предположение, что весь Ra домен составляет один сайт-связывающий рецептор [Ausmees et al., 2001].

Как было сказано, RapA1 является производным только небольшой группы ризобий. Это показано при оценке способности RapA1 белка агглютинировать различные ризобии. Были проанализированы штаммы бактерий: *R. leguminosarum* bv. *trifolii* R200, *R. leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA 2671, *S. medicae* USDA 1037, *S. fredii* USDA 257, *S. teranga* USDA 4894, *R. etli* CFN42, *R. tropici*

CIAT299, *R. loti* USDA 3471, *R. galegae* USDA 4128 и *R. huakuii* USDA 4779. Агглютинировались только клетки *R. leguminosarum* bvs. *trifolii*, *phaseoli*, *viciae* и *R. etli*. В этих же штаммах ранее была показана экспрессия RapA1 белков. Таким образом, рецепторы для связывания RapA1 белков имеют только определенные штаммы ризобий [Ausmees et al., 2001].

Также было высказано предположение, что RapA1 белок имеет лектиновую природу, так как есть несколько причин полагать, что рецепторы для Rap белков имеют углеводную структуру: близость *rapA1* генов к генам кластера, участвующих в синтезе ЭПС, а также сходство Ra последовательностей между белками Rap, PlyA и PlyB. А, как известно, углевод-связывающие белки, которые специфически распознают дисахара, называются лектинами. По некоторым признакам RapA1 напоминает лектин *B. japonicum* BJ38 [Ho et al., 1994]. Оба белка являются полярными, поверхностными и клеточно-ассоциированными и способны агглютинировать бактерии. Это позволяет предположить, что белок RapA1 играет важную роль в процессах прикрепления, как и лектин BJ38 [Ausmees et al., 2001].

Таким образом, основываясь на литературных данных, было решено использовать белок RapA1 в качестве инструмента для создания различных симбиотических систем между клубеньковыми бактериями и растениями, с целью улучшения колонизации корневой системы ризобиями. Подобные эксперименты уже проводились в нашей лаборатории, где в качестве инструмента был использован лектин бобового растения, способный специфически связываться с полисахаридами на поверхности клеточных стенок ризобий. Было доказано, что трансформация геном лектина небобовых растений позволяет получать искусственные корневые ассоциации с ризобиями, что в сочетании с использованием микроорганизмов с фунгистатической активностью может более эффективно защищать корневую систему растений от патогенных грибов [Вершинина и др., 2011; Благова, 2015].

По данным Ausmees с соавт. [2001] ген *rapA1* обнаруживается только у небольшой группы ризобий: *R. leguminosarum* bvs. *trifolii*, *phaseoli*, *viciae* и *R. etli*. Поэтому для поиска гена *rapA1* ранее были выбраны 12 штаммов из коллекции бактерий Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, относящиеся по последовательности гена 16S рРНК к виду *R. leguminosarum* и обладающие ростостимулирующей активностью по отношению к растениям клевера, репы и салата латука. В результате исследований ген *rapA1* был обнаружен в большинстве исследуемых штаммов

R. leguminosarum. Для дальнейших экспериментов были отобраны штаммы PVu5 и TPr4, выделенные из фасоли обыкновенной и клевера лугового.

С помощью подобранных праймеров rapF и rapR была амплифицирована кодирующая часть гена *rapA1* из ДНК штаммов *R. leguminosarum* с помощью Pfu-полимеразы. Затем амплифицированную ДНК

клонировали в промежуточный вектор pAL-TA. Из плазмиды pJN105TurboGFP с помощью рестриктаз *BamHI* и *HindIII* вырезали ген флуоресцентного белка *gfp* и на его место под управлением сильного конститутивного промотора фага PT5 переклонировали ген *rapA1* (рис. 2).

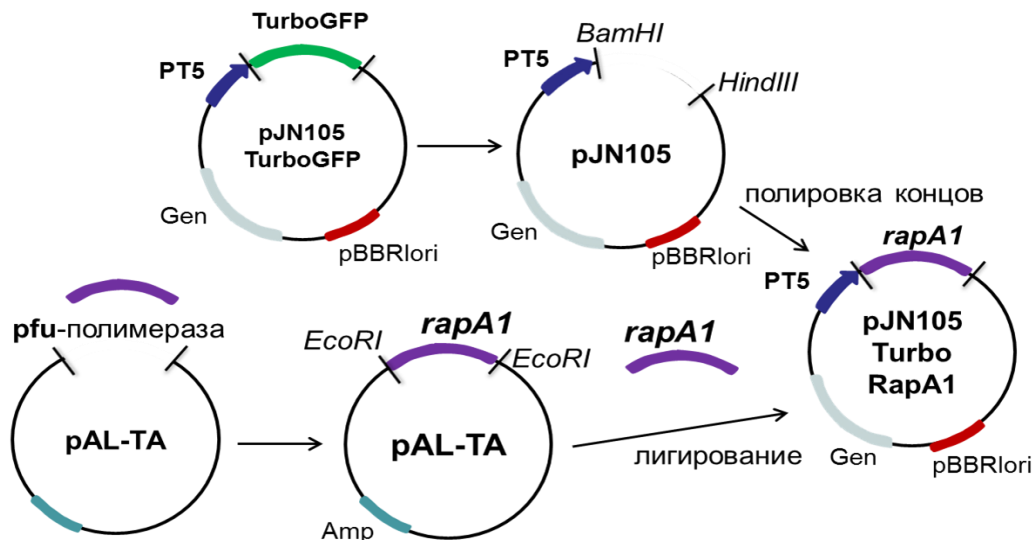


Рисунок 2. Схема конструирования вектора pJN105TurboRapA1

Полученной конструкцией трансформировали *E. coli* XL1-Blue. Наличие гена подтвердил ПЦР-анализ. Кроме амплификации правильность ориентации гена и рамки считывания была подтверждена путем секвенирования последовательности вектора на месте стыка промотора и целевого гена. В результате секвенированные последовательности генов *rapA1* из разных штаммов оказались гомологичны последовательности данного гена у *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, зарегистрированного под номером AF265223 в GenBank. Для дальнейших исследований полученной плазмидой pJN105TurboRapA1 были трансформированы исходные штаммы бактерий *R. leguminosarum*. Наличие вектора проверяли путем амплификации специфичных участков ДНК вектора pJN105TurboRapA1. Далее для анализа эффективности работы векторной конструкции в трансформированных и исходных штаммах проводили Вестерн-блот анализ белков бактерий на наличие белка RapA1. В результате анализа белков, иммунореактивных к поликлональным кроличьим антителам, полученным к пептиду RapA1, у рекомбинантных штаммов бактерий были обнаружены полосы около 25 кДа, соответствующие ожидаемому размеру адгезина, которые

отсутствовали у контрольных штаммов. Полученный результат доказал эффективную работу вектора pJN105TurboRapA1 и стабильную продукцию белка RapA1 в трансформированных ризобияльных клетках. Далее был проведен анализ сверхэкспрессии гена *rapA1* в штаммах *R. leguminosarum*, из которых выделен этот ген: изучено влияние на агглютинацию, на нитрогеназную активность и образование клубеньков.

Визуальная оценка степени агглютинации бактериальных клеток под флуоресцентным микроскопом на клетках как *E. coli*, так и *R. leguminosarum* показала, что они агглютинируют, главным образом, в присутствии рекомбинантных бактерий, вырабатывающих адгезин RapA1. Несомненно, интересным в проведенных нами экспериментах представлялся тот факт, что для связывания и агрегации ризобий достаточно наработки RapA1 в сокультивируемом штамме микроорганизмов. При этом это могут быть как клубеньковые бактерии, так и другие бактерии, например, *E. coli* и *P. aureofaciens*. Данный результат является предпосылкой возможности создания бинарных биопрепаратов на основе клубеньковых бактерий, в которых, кроме основного штамма ризобий, будет присутствовать штамм-продукент

RapA1, способствующий активному прикреплению ризобий к поверхности корня растений и агглютинирующей способности для эффективного формирования биопленок [Хакимова и др., 2017].

Кроме того, была проведена проверка влияния конститутивной экспрессии гена *rapA1* в клетках микросимбионта на эффективность образования клубеньков, на биомассу, на ростовые параметры растений и нитрогеназную активность. Для этого растения фасоли обрабатывали исходными (*R. leguminosarum* PVu5) и рекомбинантными штаммами ризобий (*R. leguminosarum* PVu5 + RapA1). В качестве контроля брали растения, не обработанные бактериями. Через месяц после закладки эксперимента были проведены замеры всех перечисленных показателей. Визуальная оценка формирования клубеньков показала, что у необработанных контрольных растений фасоли клубеньки отсутствуют. Во всех остальных вариантах опыта клубеньки на корнях сформировались, но их количество у растений фасоли, обработанных рекомбинантными ризобиями, было примерно в 2 раза больше ($15,6 \pm 3$), чем у контрольных растений, инокулированных исходным штаммом ризобий ($7,1 \pm 2$).

Полученные нами данные показывают, что обработка растений штаммами *R. leguminosarum* с повышенной экспрессией RapA1 увеличивает количество клубеньков и, соответственно, нитрогеназную активность, что, возможно, связано с лучшей адсорбцией ризобий на поверхности корней на начальных этапах симбиоза. Несомненно, улучшение ростовых параметров, сырой и сухой биомассы связано с улучшением азотного питания растений.

При этом рекомбинантный штамм ризобий оказал лучшее влияние на растения, показывая наибольший эффект на все параметры. Повышение числа клубеньков, сформировавшихся на корнях опытных растений, может свидетельствовать о связывании RapA1 с полисахаридными компонентами клеточной стенки корней фасоли [Нигматуллина и др., 2015].

Заключение

Первоначальным этапом, необходимым для инфекционного процесса и формирования клубеньков, является прикреплению ризобий к корневым волоскам растения-хозяина. Корнями растений выделяются флавоноиды, которые индуцируют у клубеньковых бактерий экспрессию генов клубенькообразования (*nod*-гены). В результате ризобии синтезируют Nod-факторы. Кроме них необходимы и другие факторы для формирования активных клубеньков, такие как ЭПС, ЛПС, КПС, лектины растений и бактериальные адгезины

(агглютинины). Все эти вещества являются молекулами-посредниками для прикреплению клубеньковых бактерий к корням бобовых растений. Изучая их свойства, теоретически возможно использование их потенциала для усиления адгезионной способности бактериальных клеток в процессах прикреплению к поверхности корневых волосков растений. Ранее в нашей лаборатории уже проводились подобные работы, где в качестве инструмента был использован растительный лектин, способный специфически связываться с полисахаридами на поверхности клеточных стенок ризобий. Было доказано, что применение лектинов в качестве трансгенов позволяет получать искусственные корневые ассоциации с ризобиями, что в сочетании с использованием микроорганизмов с фунгистатической активностью может более эффективно защищать корневую систему растений от патогенных грибов (Вершинина и др., 2011; Благова и др., 2015). Как показали наши дальнейшие исследования, использование бактериального агглютинина как RapA1 может помочь в создании искусственных симбиотических взаимодействий ризобий с различными растениями, где данный белок, как и лектины бобовых растений, может оказаться хорошим инструментом для модификации таких систем. При этом спектр штаммов не ограничивается только ризобиями, так как данный адгезин не обладает строгой специфичностью по отношению к данным микросимбионтам. Кроме свойств адгезина белок RapA1 имеет также агглютинирующую способность, что является необходимым в процессах формирования биопленок на поверхности корней растений, что также повышает конкурентоспособность интродуцированных штаммов ризобий в условиях агроценоза. А биопрепараты на основе рекомбинантных ризобий могут найти свое применение в сельском хозяйстве в рамках перехода на экологическое земледелие.

Работа была выполнена в рамках госзадания (тема № АААА-А16-116020350028-4) при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ-Инициативный № 16-04-00902 а, РФФИ мол_а № 16-34-01076.

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. Благодатская Е.В., Ермолаев А.М., Мякшина Т.Н. Экологические стратегии микробных сообществ под растениями луговых систем // Изв. РАН. Сер. Биология. 2004. Т. 31. С. 740-748. [Blagodatskaya E.V., Ermolaev A.V., Myakshina T.N. Ecological strategies of soil microbial communities under plants of meadow ecosystems // Biology Bulletin. 2004. V. 31. P. 620-627.]
 3. Вершинина З.Р., Благова Д.К., Нигматуллина Л.Р., Лавина А.М., Баймиев А.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. [Vershinina 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. №3. P. 42-53.]
 4. Вершинина З.Р., Баймиев А.Х., Благова Д.К., Князев А.В., Баймиев А.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. [Vershinina Z.R., Baymiev A.Kh., Blagova D.K., Knyazev A.V., Baymiev A.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.]
 5. Вершинина З.Р., Благова Д.К., Нигматуллина Л.Р., Оркодашвили А.М., Баймиев А.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. [Vershinina Z.R., Blagova D.K., Nigmatullina L.R., Orkadoshvili A.M., Baymiev A.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.]
 6. Моргун В.В., Коць С.Я., Кириченко Е.В. Ростостимулирующие ризобактерии и их практическое применение // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т.41. С. 187-207. [Morgun V.V., Kots S.Y., Kirichenko E.V. Growth-stimulating rhizobacteria and the impractical application // Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rasteniy. 2009. V.41. P.187-207.]
 7. Наплекова Н.Н., Чудинова Ю.В. Влияние внешних факторов на антагонизм бактерий в ризосфере льна к фитопатогенным грибам // Вестник КрасГАУ. 2009. № 5. С. 62. [Naplekov N.N., Chudinova Yu. V. The external factors influence on bacterium antagonism in lint rizosphere to the plant pathogenic fungi // Vestnik krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2009. № 5. P. 62.]
 8. Нигматуллина Л.Р., Лавина А.М., Вершинина З.Р., Баймиев А.Х. Вклад бактериального адгезина RapA1 в эффективность формирования симбиоза *Rhizobium leguminosarum* с растениями фасоли // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 705-711. [Nigmatullina L.R., Lavina A.M., Vershinina Z.R., Baymiev A.Kh. Role of bacterial adhesin RAPA1 in formation of efficient symbiosis of *Rhizobium leguminosarum* with bean plants // Microbiology. 2015. T. 84. S. 804-810.] DOI: 10.7868/S0026365615060099
 9. Оркодашвили А.М., Вершинина З.Р., Нигматуллина Л.Р., Лутфуллин А.З., Баймиев А.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». 2013. С. 143-147. [Orkadoshvili A.M., Vershinina Z.R., Nigmatullina L.R., Lutfullin A.Z., Baymiev A.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.]
 10. Патика В. П., Омелянец Т. Г., Гриник И. В., Петриченко В. Ф. Экология микроорганизмов. К.: Основа, 2007. 192 с. [Patika V.P., Omelyanets T.G., Grinic I. V., Petrichenko V.F. Ecology of microorganisms. 2007. 192 p.]
 11. Соколова М.Г., Акимова Г.П., Хуснидинов Ш.К. Эффективность применения биопрепаратов ассоциативных бактерий на различных овощных культурах // Агрэкология. 2009. № 7. С.54-59. [Sokolova M.G., Akimova G.P., Husnidinova Sh.K. Effectiveness of application of biologics of associative bacteria on various vegetable cultures. Agroekologiya. 2009. № 7. P.54-59.]
 12. Спайнк Г., Кондорози А., Хукас П. Rhizobiaceae: молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями. СПб.: Бионт, 2002. 567 с. [Spaink G., Kondoroshi A., Hukas P. Rhizobiaceae: molecular biology of bacteria interacting with plants. 2002. 567 p.]
 13. Стрелкова Е.А., Позднякова Н.В., Журина М.В., Плакунов В.К., Беляев С.С. Роль внеклеточного полимерного матрикса в устойчивости

- бактериальных биопленок к экстремальным факторам среды // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 131-138. [Strelkova E.A., Pozdnyakova N.V., Zhurina M.V., Plakunov V.K., Belyaev S.S. The role of extracellular polymeric matrix in the stability of bacterial biofilms to extreme environmental factors. *Mikrobiologiya*. 2013. V. 82. P. 119-125.] DOI: 10.7868/S0026365613020158
14. Тихонович И.А., Круглов Ю.В. Микробиологические аспекты плодородия почвы и проблемы устойчивого земледелия // Плодородие. 2006. № 5. С. 9-12. [Tihonovich I.A., Kruglov Yu.V. Microbiological aspects of soil fertility and sustainable farming problems // *Plodorodiye*. 2006. № 5. P. 9-12.]
15. Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х. Использование штаммов-продуцентов адгезина RapA1 в *Rhizobium leguminosarum* для создания бинарных биоудобрений // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 4. С. 400-405. [Khakimova L.R., Lavina A.M., Vershinina Z.R., Baymiev Al.Kh. Usage of strain-producers of adhesion RapA1 from *Rhizobium leguminosarum* for the creation of binary biofertilizers // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011. V. 53. № 4. P. 400-405.] DOI: 10.7868/S0555109917040080
16. Цавкелова Е.А., Чердынцев Т.А., Нетрусов А.И. Образование ауксинов бактериями, ассоциированными с корнями орхидей // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 55-62. [Tsavkelova E.A., Cherdyntsev E.A., Netrusov A.I. The formation of auxins by bacteria associated with the roots of orchids // *Mikrobiologiya*. 2005. V. 74. С. 46-53.]
17. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцев Т.А., Нетрусов А.И. Гормоны и гормоноподобные соединения микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. С. 261-268. [Tsavkelova E.A., Klimova S.Yu., Cherdyntsev E.A., Netrusov A.I. Hormones and hormone-like compounds of microorganisms // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2006. V. 42. P. 229-235.]
18. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Роль поверхностных компонентов ризобий в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132. С. 211-222. [Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. The role of surface components of rhizobia in symbiotic interactions with leguminous plants // *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2012. V. 132. P. 211-222.]
19. Adesemoye A., Ugoji E. Evaluating *Pseudomonas aeruginosa* as plant growth-promoting rhizobacteria in West Africa // *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 2009. V.42. P. 188-200. DOI: 10.1080/03235400601014791
20. Antoun H., Prévost D. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria // *PGPR: Biocontrol and biofertilization*. Springer Netherlands, 2006. P. 1-38.
21. Ashraf M.A., Asif M., Zaheer A., Malik A., Ali Q., Rasool M. Plant growth promoting rhizobacteria and sustainable agriculture: A review // *African J. Microbiol. Res.* 2013. V. 7. P. 704-709. DOI: 10.5897/AJMR12.936
22. 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
23. Bahat-Samet E., Castro-Sowinski S., Okon Y. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense* // *FEMS Microbiol. Lett.* 2004. V.237. P. 195-203. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09696.x
24. Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances // *Can. J. Microbiol.* 2004. V.50. P. 521-577. DOI: 10.1139/w04-035
25. Becker A., Fraysse N., Sharypova L. Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2005. V. 18. P. 899-905. DOI: 10.1094/MPMI-18-0899
26. Bogino P.C., Oliva M.M., Sorroche F. G., Giordano W. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V.14. P. 15838-15859. DOI: 10.3390/ijms140815838
27. Branda S.S., Vik S., Friedman L., Kolter R. Biofilms: The matrix revisited // *Trends Microbiol.* 2005. V.13. P. 20-26. DOI: 10.1016/j.tim.2004.11.006
28. Bullied W.J., Buss T.J., Vessey J.K. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation and N accumulation in grain legumes // *J. Plant Sci.* 2002. V.82. P. 291-298. DOI: 10.4141/P01-047
29. Cattelan A.J., Hartel P.G., Fuhrmann J.J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth // *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1999. V. 63. P. 1670-1680.
30. Chaintreuil C., Giraud E., Prin Y., Lorquin J., Ba A., Gillis M., Lajudie P., Dreyfus B. Photosynthetic Bradyrhizobia are natural endophytes of the african wild rice *Oryza breviligulata* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 5437-5447. DOI: 10.1128/AEM.66.12.5437-5447.2000
31. Cho J.H., Jung D.K., Lee K., Rhee S. Crystal Structure and functional analysis of the extradiol dioxygenase LapB from a long-chain alkylphenol degradation pathway in *Pseudomonas* // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 49. P. 34321-34330. DOI: 10.1074/jbc.M109.031054
32. Clifford J.C., Rapicavoli J.N., Roper M.C. A rhamnose-rich O-antigen mediates adhesion, virulence

- and host colonization for the xylem-limited phytopathogen, *Xylella fastidiosa* // Mol. Plant. Microbe Interact. 2013. V. 26. P. 676-685. DOI: 10.1094/MPMI-12-12-0283-R
33. Cocking E.C., Davey M.R. Nitrogen from the air for non-legume crops // Chem. Industry. 1991. P. 831-835.
34. Cooper J.E. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue // J. Appl. Microbiol. 2007. V. 103. № 5. P. 1355. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03366.x
35. D'Haese W., Glushka J., De Rycke R., Holsters M., Carlson R.W. Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata* // Mol. Microbiol. 2004. V. 52. № 2. P. 485. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.03989.x
36. Davey M.E., O'Toole G.A. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. V. 64. P. 847-867. DOI: 10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000
37. De Freitas J.R., Germida J.J. Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat // Can. J. Microbiol. 1990. V. 36. P. 265-272. DOI: 10.1139/m90-046
38. De Silva A., Patterson K., Rothrock C., Moore J. Growth promotion of highbush blueberry by fungal and bacterial inoculants // Hort. Sci. 2000. V. 35. P. 1228-1230. DOI: 10.1128/AEM.67.11.5055-5062.2001
39. Dey R., Pal K.K., Bhatt D.M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria // Microbiol. 2004. V. 159. P. 371-394. DOI: 10.1016/j.micres.2004.08.004
40. Finnie C., Zorreguieta A., Hartley N. M., Downie J. A. Characterization of *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharideglycanases that are secreted via a type I exporter and have a novel heptapeptide repeat motif // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 1691-1699.
41. Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix // Nature Rev. Microbiol. 2010. V. 8. P. 623-633. DOI: 10.1038/nrmicro2415
42. Fraysse N., Lindner B., Kaczynski Z., Sharypova L., Holst O., Niehaus K., Poinso V. *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 produces a low-molecular-mass capsular polysaccharide that is a homopolymer of 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid harboring a phospholipid anchor // Glycobiol. 2005. V. 15. № 1. P. 101. DOI: 10.1093/glycob/cwh142
43. Fujishige N.A., Lum M.R., De Hoff P.L., Whitelegge J.P., Faull K.F., Hirsch A.M. *Rhizobium* common *nod* genes are required for biofilm formation // Mol. Microbiol. 2008. V. 67. № 3. P. 504. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.06064.x
44. Gage D.J. Infection and invasion of roots by symbiotic nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes // Microbiol. and Molecular Biol. Rev. 2004. V. 68. P. 280-300. DOI: 10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004
45. Garcia-Fraile P., Carro L., Robledo M., Ramirez-Bahena M-H., Flores-Felix J-D. *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans // PLoS ONE. 2012. V. 7. e38122. doi:10.1371/journal.pone.0038122.
46. Glick B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria // Can. J. Microbiol. 1995. V. 41. P. 109-117. DOI: 10.1139/m95-015
47. Glucksmann M. A., Reuber T. L., Walker G. C. Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis // J. Bacteriol. 1993. V. 175. P. 7045-7055. DOI: 10.1128/jb.175.21.7045-7055.1993
48. González J.E., Reuhs B.L., Walker G.C. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa* // Proc. Natl. Acad. Sci. 1996. V. 93. P. 8636-8641.
49. Gutiérrez-Zamora M.L., Martínez-Romero E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.) // J. Biotechnol. 2001. V. 91. P. 117-126. DOI: 10.1016/S0168-1656(01)00332-7
50. Hartmann A., Rothballer M., Schmid M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research // Plant Soil. 2008. V. 312. P. 7-14. DOI: 10.1007/s11104-007-9514-z
51. Herman M.A.B., Nault B.A., Smart C.D. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York // Crop Protect. 2008. V. 27. P. 996-1002. DOI: 10.1016/j.cropro.2007.12.004
52. Hinsä S.M., Espinosa-Urgel M., Ramos J.L., O'Toole G.A. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein // Molecular Microbiology. 2003. V. 49. P. 905-918. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03615.x
53. Ho S.C., Wang J.L., Schindler M., Loh J. T. Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum*. III. Lectin expression, bacterial binding, and nodulation efficiency // Plant J. 1994. V. 5. P. 873-884. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1994.5060873.x
54. Kang S.H., Cho K.K., Bok J.D. et al. Cloning, sequencing and characterization of a novel gene, *phoI*, from soil bacterium *Enterobacter* sp.4 // Curr. Microbiol. 2006. V. 52. P. 243-248. DOI: 10.1007/s00284-005-4467-z

55. Kao C.V., Li S.H., Chen Y.L., Chen S.S. Utilization of the metano-cyano complex tetracyanonickelate by *Azotobacter vinelandii* // Lett. Appl. Microbiol. 2005. V. 41. P. 216-220. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01731.x
56. Klebensberger J., Birkenmaier A., Geffers R., Kjelleberg S., Philipp B. SiaA and SiaD are essential for inducing autoaggregation as a specific response to detergent stress in *Pseudomonas aeruginosa* // Environ. Microbiol. 2009. V. 11. P. 3073-3086. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02012.x
57. Kloepper J.W., Rodriguez-Kabana R., Zehnder G.W., Murphy J., Sikora E., Fernandez C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases // Austral. Plant Pathol. 1999. V. 28. P.27-33.
58. Kloepper J.W. A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR // In: Sixth International PGPR Workshop. Calicut. India. 2003.
59. Laus M.C., van Brussel A.A.N., Kijne J.W. Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs // Mol. Plant. Microbe Interact. 2005. V. 18. P. 533-538. DOI: 10.1094/MPMI-18-0533
60. Laus M.C., Logman T.J., Lamers G.E., van Brussel A.A.N., Carlson R., Kijne J.W. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin // Mol. Microbiol. 2006. V. 59. P. 1704–1713. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05057.x
61. Lerouge I., Vanderleyd J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant microbe interactions // FEMS Microbiol. Rev. 2002. V. 26. P. 17-47. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00597.x
62. Liu X.M., Zhang H. The effects of bacterial volatile emission on plant abiotic stress tolerances // Front Plant Sci. 2015. V. 6. P. 774. DOI: 10.3389/fpls.2015.00774
63. Lucy M., Reed E., Glick B.R. Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria // Antonie van Leeuwenhoek. 2004. V. 86. P. 1-25.
64. Malik A., Sakamoto M., Hanazaki S., Osawa M., Susuki T., Tochigi M., Kakii K. Coaggregation among nonfloculating bacteria isolated from activated sludge // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 6056-6064. DOI: 10.1128/AEM.69.10.6056-6063.2003
65. Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology // Mol. Plant Pathol. 2012. V. 13. P. 614-629. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x
66. Markova Yu.A., Romanenko A.S., Shafikova T.N. Mechanisms of bacterial polyhostality // Journal of Stress Physiology and Biochemistry. Rev. 2007. V. 3. P. 18.
67. Martínez-Gil M., Ramos-González M.I., Espinosa-Urgel M. Roles of cyclic Di-GMP and the Gac system in transcriptional control of the genes coding for the *Pseudomonas putida* adhesins LapA and LapF // J. Bacteriol. – 2014. V. 196. P. 1484-1495. DOI: 10.1128/JB.01287-13
68. 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
69. 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 Biology and Biochemistry. 2009. V.41. P. 2017-2020. DOI: 10.1016/j.soilbio.2009.07.016
70. Naidu V.S.G.R., Panwar J.D.S., Annapurna K. Effect of synthetic auxins and Azorhizobium caulinodans on growth and yield of rice // Indian J Microbiol. 2004. V. 44. P. 211-213.
71. Nicholson W.L. Roles of *Bacillus* endospores in the environment // Cell. Mol. Life Sci. 2002. V. 59. P. 410-416.
72. Pena H.B., Reyes I. Nitrogen fixing bacteria and phosphate solubilizers isolated in lettuce (*Lactuca sativa* L.) and evaluated as plant growth promoters // Interciencia. 2007. V. 32. P. 560-565.
73. Perez-Montano F., Alias-Villegas C., Bellogin R.A., del Cerro P. et al. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production // Microbiol. Res. 2014. V. 169. P. 325-336. DOI: 10.1016/j.micres.2013.09.011
74. Perret X., Staehelin C., Broughton W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity // Microbiol. Mol.Biol. Rev. 2000. V. 64. P.180. DOI: 10.1128/MMBR.64.1.180-201.2000
75. Perrine F.M., Prayito J., Frank J.J., Dazzo B., Rolfe B.G. *Rhizobium* plasmids are involved in the inhibition or stimulation of rice growth and development // J. Plant Physiol. 2001. V. 28. P. 923-937. DOI: 10.1071/PP01046
76. Probanza A., Mateos J., Lucas Garcia J., Ramos B., de Felipe M., Gutierrez F. Effects of inoculation with PGPR *Bacillus* and *Pisolithus tinctorius* on *Pinus pinea* L. growth, bacterial rhizosphere colonization, and mycorrhizal infection // Microb. Ecol. 2001. V. 41. P. 140-148. DOI: 10.1007/s002480000081
77. Quadt-Hallmann A., Hallmann J., Kloepper J.W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria // J. Microbiol. 1997. V. 43. P. 254-259. DOI: 10.1139/m97-035
78. Recep K., Fikrettin S., Erkol D., Cafer E. Biological control of the potato dry rot caused by

- Fusarium species using PGPR strains // Biol Control. 2009. V.50. P. 194-198. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2009.04.004
79. Rinaudi L.V., Giordano W. Analysis of the mucR gene regulating biosynthesis of exopolysaccharides: implications for biofilm formation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 // FEMS Microbiol. Lett. 2010. V. 304. P.1. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01826.x
80. Rodriguez-Navarro D.N., Dardanelli M.S., Ruiz-Sainz J.E. Attachment of bacteria to the roots of higher plants // FEMS Microbiol. Lett. 2007. V. 272. P. 127-131. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00761.x
81. Rudrappa T., Biedrzycki M.L., Bais H.P. Causes and consequences of plant-associated biofilms // FEMS Microbiol. Ecol. 2008. V. 64. P. 153-166. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00465.x
82. Ryan P.R., Delhaize E. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots // Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 2001. V. 52. P. 527-560.
83. Ryder C., Byrd M., Wozniak D.J. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // Curr. Opin. Microbiol. 2007. V. 10. P. 644-648. DOI: 10.1016/j.mib.2007.09.010
84. Sabry S.R.S., Saleh S.A., Batchelor C.A., Jones J., Jotham J., Webster G., Kothari S.L., Davey M.R., Cocking E.C. Endophytic establishment of Azorhizobium caulinodans in wheat // Proc. R. Soc. Lond. 1997. V. 264. P. 341-346. DOI: 10.1098/rspb.1997.0049
85. Smit G., Swart S., Lugtenberg B. J., Kijne J. W. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots // Mol. Microbiol. 1992. V.6. P. 2897-2903.
86. Sorroche F.G., Rinaudi L.V., Zorreguieta A., Giordano W. EPS II-dependent autoaggregation of *Sinorhizobium meliloti* planktonic cells // Curr. Microbiol. 2010. V. 61. P. 465-470.
87. Spiers A.J., Rainey P.B. The *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader biofilm requires attachment factor, cellulose fibre and LPS interactions to maintain strength and integrity // Microbiology. 2005. V. 151. P. 2829-2839. DOI: 10.1099/mic.0.27984-0
88. Stoodley P. Biofilms as complex differentiated communities / P. Stoodley, K. Sauer, D.G. Davies, J.W. Costerton // Annu. Rev. Microbiol. 2002. V. 56. P. 187-209. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705
89. Sutherland I.W. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework // Microbiology. 2001. V. 147. P. 3-9. DOI: 10.1099/00221287-147-1-3
90. Townsend G.E., Keating D.H. Identification and characterization of KpsS, a novel polysaccharide sulphotransferase in *Mesorhizobium loti* // Mol. Microbiol. 2008. V. 68. P. 1149. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06215.x
91. Vanderlinde E.M., Muszynski A., Harrison J.J., Koval S.F., Foreman D.L., Ceri H., Kannenberg E.L., Carlson R.W., Yost C.K. *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 3841, deficient in 27-hydroxyoctacosanoate-modified lipopolysaccharide, is impaired in desiccation tolerance, biofilm formation and motility // Microbiology. 2009. V. 155. P. 3055-3069. DOI: 10.1099/mic.0.025031-0
92. Vaningelgem F., Zamfir M., Mozzi F., Adriany T., Vancanneyt M., Swings J., de Vuyst L. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 900-912. DOI: 10.1128/AEM.70.2.900-912.2004
93. Yanni Y.G. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots // Functional Plant Biology. 2001. V. 28. P. 845-870. DOI: 10.1071/PP01069
94. Young C.S., Lethbridge G., Shaw L.J., Burns R.G. Survival of inoculated *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in non-planted and rhizosphere soil // Soil Biol. Biochem. 1995. V. 27. P. 1017-1026. DOI: 10.1016/0038-0717(95)00030-I