

# Клітинні і молекулярно-генетичні механізми симбіозу та асоціативної взаємодії мікроорганізмів з рослинами у ризосфері

Л. Г. Льошина

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України  
Вул. Мурманська, 1, Київ, Україна, 02094

lioshina@ukr.net

---

*Розглянуто результати досліджень взаємодії мікроорганізмів і рослин у ризосфері. Особливу увагу приділено процесу контактної асоціації клітин мікроорганізмів і тканин рослин за участі конкретних молекулярних структур, у якому домінують роль приділяється білково-вуглеводним взаємовідносинам. Відзначено загальні риси та відмінності у формуванні арбускулярної мікоризи, бобово-ризобіального симбіозу та асоціації небобових рослин з азоспірилами.*

*Ключові слова: симбіоз, асоціативна взаємодія, арбускулярна мікориза, ризобії, азоспірили.*

---

Сучасний рівень науки демонструє, що жодна рослина не може у природних умовах підтримувати свою життєдіяльність за відсутності мікроорганізмів [1]. Використання сучасних молекулярно-генетичних методів показало, що мікрофлорі окремої рослини притаманна значна різноманітність [2, 3]. Процес фотосинтезу, що відбувається у вищих рослинах, повністю забезпечує їх енергією і вуглецем. Інші необхідні макро- і мікроелементи (у першу чергу азот і фосфор) рослини можуть отримувати в результаті взаємодії з мікроорганізмами в ризосфері і ризоплані. Так, бактерії родів *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconoacetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* і *Serratia* збагачують рослину азотом, а мікоризні гриби забезпечують асиміляцію фосфору і азоту та низки інших мікроелементів з ґрунту. Крім цього, рослини отримують від екзо- і ендосимбіонтів фітогормони, а токсини, що синтезують мікроорганізми, захищають її від

патогенів і фітофагів. Симбіонти також покращують водний і мінеральний статус рослини та знижують у них вміст етилену [4–7].

Найпоширенішим рослинно-мікробним симбіозом (до 90 % видів рослин) є мікоза – симбіоз грибів, які належать до *Glomeromycota*, та корінням рослин. Ця асоціація відома у двох основних варіантах: простіша ектомікориза (гриб не проникає всередину рослинних клітин) і ендомікориза, або арбускулярна мікориза (АМ), за якої гіфи гриба вросли в середину клітин коріння. Далі йдуть симбіотичні стосунки з азотфіксуючими бактеріями, до яких належать ризобії і актинобактерії. Деякі квіткові рослини здатні культивувати ці мікроорганізми всередині клітин свого коріння, створюючи при цьому бульбочки. Такі взаємовідносини бувають двох типів: бобово-ризобіальний симбіоз (БРС) (з бактеріями із групи альфапротеобактерій) [8, 9] та актинориза – симбіоз з актинобактеріями роду *Frankia*. Актинобактерії утворюють міцеліальні структури

на зразок грибів, тому раніш їх відносили до грибів і називали актиноміцетами [10].

*Симбіотичні взаємини між мікроорганізмами та корінням рослин. Арбускулярна мікориза.* Першим і самим давнім представником симбіотичної взаємодії між рослинним корінням та мікроорганізмами є АМ, яка виникла приблизно 450 млн років тому. В такій асоціації грибний міцелій розташовується у міжклітинному просторі кореня й утворює в його клітинах спеціальні трофічні органи – арбускули, які дають назву мікоризі. Цей симбіоз, в основному, є облігатним. Без взаємодії з рослиною мікоризні гриби можуть перебувати лише у вигляді спор, статеве розмноження невідомо, а окремі спори можуть містити сотні ядер, які одночасно знаходяться в одній клітині, але генетично неідентичні [11, 12]. Така взаємодія між мікроскопічними грибами і корінням особливо необхідна для дерев, чагарників і рослин з послабленою кореневою системою [13].

У процесі формування АМ, як і інших взаємодій бактерій з рослинами, виділяють три стадії, а саме – хемотаксис, прикріплення міцелію до коріння і колонізацію поверхні або внутрішніх тканин органів рослин [14, 15].

Розвиток АМ починається з преінфекції і формування апресоріїв. При цьому спостерігається проростання грибних спор, яке індукується корневими ексудатами. Виникають первинні гіфи, що ростуть, гілкуються, утворюючи структури прикріплення, – власне апресорії. Потім відбувається зростання міжклітинного міцелію. З апресоріїв починають утворюватися інфікуючі гіфи. Вони проникають крізь ризодерміс у кортекс, де і колонізують клітину, створюючи при цьому арбускули, які, в свою чергу, формують розгалужені структури, що глибоко проникають у рослинну клітину.

Арбускули перебувають в оточенні рослинної (періарбускулярної) мембрани та редукованої клітинної стінки і утворюють усередині клітин щільні клубки, на яких іноді виникають вирости. Активний обмін метаболітами між симбіонтами забезпечується саме за допомогою арбускул. При їхньому формуванні між стінками рослинних клітин і гіфами утворюється матрикс, який містить полісахариди і ферменти, що синтезуються обома

партнерами. При цьому в рослинній клітині відбувається низка цитологічних змін: ядро збільшується і деформується; хроматин переходить у дифузний стан; в цитоплазмі зростає кількість тілець Гольджі і ендоплазматичного ретикулуму, які беруть участь у формуванні періарбускулярної мембрани; значно зменшується або повністю зникає вакуоль; пластиди перетворюються на пропластиди і зростає кількість тубуліну. Продовжується розвиток позакорневих гіф, які забезпечують поглинання з ґрунту живильних речовин, і утворюються безстатеві спори для розмноження гриба [16, 17].

У корневих бульбочках живильні речовини проходять через перисимбіотичну мембрану, яка оточує азотфіксуючі бактероїди [18], а обмін розчиненої речовини при АМ відбувається в перисимбіотичних мембранах, що оточують арбускули [19]. Встановлено подібність епідермального проникнення при АМ з кортикальними преінфекційними нитками, які формуються під час нодуляції [20], і показано часткову збіжну активацію генної експресії [21]. Ця спільність особливо очевидна для каскадів прийняття та передачі сигналів, що ініціюють нодуляцію і мікоризацію [22]. Останні розробки в цій галузі підсумовано в оглядах [23–25].

Гени, залучені до обох асоціацій, одержали назву «загальних генів симбіозу» (common symbiosis genes) [26]. Аналіз білків, що кодуються «загальними генами симбіозу», показав, що більшість з них мають консервативну структуру в усіх квіткових. І тільки один з них, SYMRK (symbiosis receptor kinase), виявився варіабельним. Це трансмембранний білок, позаклітинна частина якого має різну довжину. «Довгий варіант» характерний для рослин, що утворюють бульбочки, а також їхніх найближчих родичів; «середній варіант» зустрічається у віддаленіших дводольних родичів бульбочкових рослин; «короткий варіант» притаманний однодольним (рису й кукурудзі). Бульбочки будь-якого типу (і ризобіальні, і актиноризні) спостерігаються лише у власників «довгого» варіанта гена SYMRK. Арбускулярна мікориза зустрічається в усіх трьох варіантах гена. Це підтверджено експериментами на мутантній формі *Lotus japonikus*, яка не утворює ані АМ, ані БРС. Перенесення «середнього» варіан-

та гена *SYMRK* томату й «короткого» варіанта гена рису відновлювало здатність до формування АМ, але не БРС. Перенесення «довгого» варіанта гена від люцерни, що утворює БРС, від *Datisca glomerata*, яка утворює симбіоз з актинобактеріями, та від безбульбочкової *Tropaeolum majus* призвело до відновлення у мутантного ледв'янця і АМ, і БРС. Авторами висловлено гіпотезу про те, що здатність формування актиноризи й БРС розвилася на основі генетичної програми АМ. І «генетична програма» бульбочкового симбіозу являє собою модифікацію «генетичної програми» арбускулярної мікоризи [27].

У клітинах, які беруть участь у симбіозі, з'являються білки, що синтезуються *de novo*. Деякі з них є спільними для АМ і бульбочково-ризобіальної взаємодії. Це білки перібактероїдної і періарбускулярної мембран, деякі ранні нодуліни (ENOD2, ENOD11, ENOD12) і невелика кількість леггемоглобіну. Утворення обох видів асоціації стимулюється ліпохітиноолігосахаридними Nod-факторами [28].

Вивчення генетичного контролю розвитку АМ показало, що мутації в генах *sym8*, *sym9*, *sym19*, *sym30*, *sym33* і *sym40* порушують мікоризацію гороху. І ці ж гени стимулюють утворення бульбочок при бобово-ризобіальній асоціації [29, 30]. Надекспресія гена *ENOD40* призводить до посилення формування арбускул [31]. Ступінь колонізації АМ керується рослиною і є дані, що до цього причетний ген *har1*, який кодує HAR1-рецептор кінази [32]. Впровадження гіфа в клітини рослин опосередковано генами *LjSYM4* і *LjSYM15*, а активація внутрішньоклітинної асиміляційної програми – генами *LjSYMRK* і *LjSYM4*, як це показано для *L. japonicus* [33, 34]. Деградацію арбускул може контролювати рослинний ген *Prp1*, що кодує глутатіон-S-трансферазу, а за відновлення осмотичного статусу клітини, порушеного через деградацію вакуоля, відповідає ген *Mtaqp1*, який кодує аквапорин і локалізований в тонопластах [35].

За останні роки, використовуючи транскриптомний аналіз, досліджено сотні нових генів у різних видах рослин, що активуються в результаті взаємодії грибів з корінням рослин [36]. Існує думка, що бобові мають генетичну систему, яка кон-

тролює розвиток подвійного симбіозу: гриби арбускулярної мікоризи–ризобії [37].

Активація процесів, що відбуваються в рослинній клітині у відповідь на проникнення міцелію *Glomus*, подібна до реакції клітини на атаку патогенів. Так само індукуються синтез фітоалексинів, калози, пероксидаз, літичних ферментів, захисних білків і при цьому модифікується клітинна стінка. Однак процеси, що відбуваються при АМ, менш інтенсивні і більш диференційовані в просторі і часі. Активність літичних ферментів виявляється тільки при інфікуванні епідермісу, а при колонізації кортексу і утворенні арбускул їхній рівень знижується до початкового. Є дані, що це пов'язано з виділенням грибами сигнальних факторів для репресії активності зазначених ферментів [38, 39].

На сьогодні найвивченішим є симбіоз бобових з мікроорганізмами, які утворюють як арбускулярну мікоризу, так і азотфіксуючі бульбочки [40].

*Бобово-ризобіальний симбіоз.* На початку 90-х років минулого століття обмін хімічними сигналами між бобовими й ризобіями, що спричиняє інфікування кореневих волосків і подальше утворення бульбочок, було названо «молекулярним діалогом» [41]. Ця симбіотична взаємодія розвивається теж постадійно: преінфекція, інфікування коріння, утворення бульбочок і їхнє функціонування як органів азотфіксації.

Процес інфікування коріння проходить через кореневі волоски, які при цьому скручуються, набуваючи форми «ручки парасольки» (стадія *Haic* – *Haic curling*). У місці згину клітинна стінка деградує і утворюється випинання плазмалеми. Відбувається як би захоплення бактерій корневими волосками з появою інфекційної нитки (ІН). Стінки ІН утворені з рослинних клітин, а вміст матриксу є спільним продуктом рослини і бактерії (стадія *Itf* – *Infection thread formation*). Паралельно з розвитком ІН починається закладання бульбочкового примордію, що здійснюється в результаті ініціації Nod-факторами мітотичної реактивації, дедиференціації і проліферації клітин кортексу (стадія *Ccd* – *Cortical cell division*). Внаслідок гістогенезу примордію формується апікальна меристема, а також периферійна (покровна і провідна) та центральна (що містить бактерії) тканини бульбочки.

ІН, що росте, проходить кореневий волосок і проникає в кортекс, а потім у бульбочку. Головною стадією тут є перехід бактерії всередину клітини, що відбувається за рахунок ендоцитозу (стадія *Bar* – *Bacterial release*). При цьому дистальні ділянки ІН перетворюються в особливі структури – інфекційні краплі, позбавлені клітинної стінки, які відкривають шлях у рослинну цитоплазму мембранним везикулам, що містять бактерії. Тому в рослинній цитоплазмі бактерії розташовуються не вільно, а всередині перибактероїдних мембран (ПБМ), які утворюються за участі апарату Гольджі і ендоплазматичного ретикулуму та містять бактеріальні білки.

Бактеріальна клітина, оточена ПБМ, є основною одиницею симбіозу – симбіосомою, яка і відповідає за постачання азоту рослинам [42]. Протягом деякого часу після виходу з інфекційної нитки ризобії зберігають свої розміри і паличкоподібну форму, а потім перетворюються на особливі структури – бактероїди (стадія *Bad* – *Bacteroid differentiation*). Таке перетворення мікроорганізмів веде до затихання деяких генів, необхідних для автономного існування, і бактероїди вже не можуть перетворюватися на форми, що вільно живуть і існують поза бульбочкою [43]. В результаті зазначених змін утворюється бульбочка, яка має три складові: апікальну меристему, що забезпечує ріст бульбочки, центральну частину, де відбувається азотфіксація, і периферійні провідні пучки, які забезпечують двосторонню провідність.

У бактероїдах активується синтез нітрогенази (стадія *Nif* – *Nitrogen fixation*) – центрального ферменту азотфіксації, що каталізує відновлення молекулярного азоту до амонію і представляє собою комплекс структурно і функціонально консервативних металоферментів. Цей комплекс включає два компоненти: залізовмісну АТФ-залежну редуктазу нітрогенази (Fe-білок) і динітрогеназу, що містить залізо і молібден (MoFe-білок). Димерний Fe-білок ( $\text{Fe}_2$ ) є донором електронів для більшого гетеротетрамерного MoFe-білка ( $\text{Fe}_4\text{MoS}_7$ ), де субодиниці  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  кодуються генами *nifD*, *nifK*, *nifH* відповідно. Усі азотфіксатори містять MoFe-нітрогеназну систему (нітрогеназу I), але в умовах недостатності молібдену і за присутності ванадію

експресується ванадій-вмісна V-нітрогеназа (нітрогеназа II), а за відсутності цих металів – Fe-нітрогеназа, що містить лише залізо (нітрогеназа III). При цьому процес азотфіксації є енергозалежним і вимагає присутності АТФ [44, 45]. У клітинах рослин зростає кількість мембранних структур, відбувається поліплоїдизація і розкручування хроматину, що пов'язано з посиленням активності транскрипції. Саме тоді відбувається синтез леггемоглобіну, що є специфічним результатом симбіозу: простетична група синтезується бактероїдами, а білковий компонент – за участі рослини. Леггемоглобін зв'язує кисень до оксигенованої форми  $\text{LbO}_2$  і забезпечує його транспорт до симбіосоми. В той же час кисень знаходиться у зв'язаному стані, що дозволяє активно працювати аерофобній нітрогеназі в мікроаеробних умовах [46].

Упізнавання ризобією рослини починається з розпізнавання флавоноїдів – вторинних метаболітів рослин, які виділяються проростаючим насінням і корінням рослин [47]. Флавоноїди відіграють ген-індукуючу функцію, яка проявляється при їхніх мікромольних концентраціях [48, 49]. Є спостереження, що один і той самий флавоноїд може бути індуктором для одних ризобій і інгібітором – для інших. Як, наприклад, дайдеїн і геністеїн індукують *B. japonicum* і *Rhizobium* sp. NGR234, але є інгібіторами для *R. leguminosarum* bv. *trifolii* і bv. *viciae* [50, 51].

Флавоноїдам властиве значне різноманіття. Так, приблизно 30 флавоноїдів, що стимулюють експресію *nod*-генів, ізолювано з дев'яти родів бобових [52].

Первинна взаємодія відбувається між флавоноїдами і білком гена *nodD*. Білок NODD активує систему генів вірулентності ризобій, які забезпечують синтез ліпохітинолігосахаридних Nod-факторів. Нещодавно проведеним дослідженням встановлено, що Nod-фактор ініціює в коріннях бобових продукування цитокініну через кальцій-залежні сигнальні шляхи. Цитокінін, в свою чергу, стимулює ділення кортикальних клітин на асоціативних ділянках бульбочки [53].

Особливості молекулярної структури Nod-факторів значною мірою визначають специфічність всієї подальшої взаємодії. Так, у сої ендегенні ізоф-

лавоноїди здатні індукувати *nod*-гени *B. japonicum* після того, як бактерія проникла в кореневу волосину рослини [54]. У *Sinorhizobium meliloti* основний чинник нодуляції (NodRm-1) є сульфатованим і ацильованим тетрасахаридом глюкозаміну [55]. Припускають, що білки NODG, NODE і NODF беруть участь у синтезі ацильного ланцюга, а NODPQ і NODH – у сульфатуванні фактора нодуляції. Гени *nodABC* є спільними для всіх видів ризобій і кодуєть корову частину молекули Nod-фактора. Інші гени, такі як *nodPQ*, *nodH*, *nodEF*, *nodX*, є видо- або навіть штамоспецифічними. Вони контролюють модифікації хімічної структури Nod-фактора, які визначають специфічність подальшої взаємодії. Гени *nodPQ* і *nodH*, виявлені у бульбочкових бактерій люцерни (*S. meliloti*), обумовлюють приєднання до Nod-фактора сульфатної групи, необхідної для індукції бульбочкоутворення. Інактивація даних генів призводить до втрати бактеріями здатності інокулювати люцерну, але при цьому зберігається можливість викликати ранні симбіотичні реакції у нехарактерного господаря – віки [56].

Флавоноїди рослин впливають на синтез ДНК через зв'язування з промоторною ділянкою (Nod-боксом) індубельного гена, тим самим ініціюючи РНК-полімерази для початку транскрипції [57]. Проте не всі флавоноїди ініціюють транскрипцію. З декількох флавоноїдів *S. meliloti* тільки лютеолін був здатний спричиняти експресію *nod*-гена [58]. Встановлено регулюючий механізм, чим показано, що 36 *nod*-генів, індукованих флавоноїдами, не експресуються одночасно. Перш за все синтезується Nod-фактор, далі – білки III типу і дещо пізніше продукується багатий на рамнозу ліпополісахарид (ЛПС) [59].

Окрім *nod*, до генів, які відіграють провідну роль у процесі симбіозу, належать *nif*- і *fix*-гени. Перші структурно гомологічні генам *nif* гама-протеобактерії *Klebsiella pneumoniae*, для якої гени азотфіксації досліджено вперше. До них відносять гени, необхідні для біосинтезу нітрогенази і регуляторних білків [60]. Гени *fix* теж потрібні для азотфіксації, але вони можуть існувати і в неазотфіксуючих організмах. Секвенуванням і мутаційним аналізом *nif*- і *fix*-генів виявлено, що їхні продукти мають подібну структуру й функції у ба-

гатьох діазотрофів, але за походженням вони доволі різні [61].

Чотири роки тому повідомлялося, що ідентифіковано набір із 756 генів, які більш або менш інтенсивно експресувалися протягом інфікування корневих клітин, формування бульбочки, функціонування й захисної відповіді при симбіотичній взаємодії між *M. truncatula* і *S. meliloti*. Визначено чотири головні групи генів, які диференційовано експресувалися: 1) гени, що інтенсивно підвищують експресію в молодих і зрілих бульбочках; 2) гени, які активуються в зрілих вузликах; 3) гени, що індукуються транзійтно на 3–4-й день після інокуляції; 4) гени, які знижують експресію під час бульбочкоутворення [62].

Здатність ініціювати експресію *nod*-генів притаманна й речовинам нефлавоноїдної природи. У насіннях люпину компоненти із стимулювальними властивостями – це альдонова, еритронова та тетронова кислоти [63]. Жасмонати рослин звичайно розглядають як індуктори генів, залучених до відповіді на поранення або атаку патогенів, але вони можуть також стимулювати експресію *nod*-генів у *B. japonicum* самостійно або в комбінації з індуктором-флавоноїдом [64]. Ксантани ініціюють транскрипцію *nod*-гена у *B. japonicum* [65].

Як і в разі АМ, ініційовані *nod*-гени продукують Nod-фактори, що представляють собою різні ліпохітиноолігосахари, без яких ризобії не можуть проникати в коріння бобових. Вони беруть участь у деформації корневих волосків, деполіаризації мембранної плазми, змінах цитоскелету корневих волосків, формуванні нитки передінфекції, кортикальному поділу клітини на ділянках бульбочкових примордій, інгібуванні реактивної системи виробництва кисню, порушенні метаболізму ауксину в коріннях, індукції рослинних нодулінів, інфікуванні, утворенні і функціонуванні бульбочок у симбіозі [66].

Так само Nod-фактори залучені до утворення на поверхні коріння рослин (кореневого чохла, ризодерми, корневих волосків) тонкого (1–10 мкм) шару аморфного слизового матеріалу – муцигелю, або біоплівки, яка представляє собою складний багатокомпонентний субстрат. За допомогою електронної мікроскопії показано при-

сутність фібрилярних клітин у точці дотику ризобій і поверхні кореня, що підтверджувало утворення біоплівки [67]. Остання важлива для формування імунної відповіді рослини і для захисту проти активного кисню та складається з позаклітинних полісахаридів, ЛПС, К-полісахаридів і циклічних глюканів. Крім того, на поверхні мікроорганізмів знаходяться О-специфічні ланцюги ЛПС, вбудовані в зовнішню мембрану бактерій. Полісахариди з полісахарид-ліпідних комплексів містять рамнозу, галактозу, галактуронову кислоту, невеликі кількості N-ацетил-D-глюкозаміну, манозу, фукозу, ксилозу, глюкозу в різних співвідношеннях.

Нещодавно ізольовано новий високомолекулярний полісахарид RBL5523 з *R. leguminosarum* bv. *viciae*, який містить головним чином глюкозу, манозу і невелику кількість галактози і рамнози та демонструє високу зв'язувальну здатність до лектину гороху і віки (*V. sativa*). Автори припускають, що цей полісахарид має важливе значення у первинному прикріпленні до кореневих волосків [68].

Наступним етапом симбіотичної взаємодії бактерій і рослин є взаємодія рослинних лектинів і бактеріальних полісахаридів. Перші уявлення щодо обміну рослинно-мікробними сигналами отримано на лектинах бобових як чинниках формування високоспеціалізованих бульбочкових симбіозів [69]. Численні експериментальні дані про вплив рослинних лектинів на метаболізм еукаріотних клітин свідчать про те, що цим вуглеводзв'язувальним білкам притаманні властивості сигнальних молекул. Крім фітолектинів, у процесі симбіозу беруть участь і бактеріальні лектини (аглютиніни клітинної поверхні асоціативних і симбіотичних мікроорганізмів) [70]. Лектини рослини, як і аглютиніни мікроорганізмів, сприяють фіксації мікроорганізму на тканинах рослини і впливають на метаболізм партнера [71].

Крім того, у ризобій, як і в АМ, існує кілька інших компонентів, необхідних для успішної колонізації кореня й подальшого утворення бульбочок або посилення росту рослини до початку фіксації азоту. Це індолілоцтова кислота (ІОК), синтез якої є флавоноїд-залежним і контролюється Nod-боксом NB15 у *Rhizobium* sp. NGR234.

Відсутність ІОК у мутантному штамі значно погіршує утворення бульбочок [72].

Пентациклічні тритерпеноїдні ліпіди – хопаноїди – підсилюють опір бактерій до біотичних та абіотичних стресів і зміцнюють мембрану. Встановлено, що експресія синтетичного гена хопаноїда у *Rhizobium* sp. NGR234 залежить від флавоноїду та Nod1-фактора і контролюється Nod-боксом NB1, що може визначати симбіотичне функціонування цих компонентів [73]. А люміхром із *S. meliloti* підсилює кореневе дихання і поліпшує ріст *M. sativa* [74].

Розвиток бобово-ризобіального симбіозу подібно до АМ регулюється рослиною-господарем, яка забезпечує оптимальну кількість і біохімічну активність ендосимбіонтів і це не дозволяє перейти симбіозу у патогенний процес. Феноли, які синтезуються в бульбочках, флавоноїди та активні форми кисню функціонують не як інгібітори мікроорганізмів, а як регулятори їхньої активності. Наявність у рослин системи контролю над розвитком різних форм симбіозу є основою для розробки методів біоконтролю патогенів за допомогою мікробних препаратів.

*Асоціативні бактерії.* Крім розглянутих симбіотичних відносин, великий інтерес останнім часом викликає взаємодія рослин з бактеріями, що стимулюють їхній ріст і розвиток (plant growth-promoting bacteria, PGPB), за якої створюється своєрідна екосистема, де існує не чітко виражений морфологічно, але взаємовигідний функціональний зв'язок. Такі відносини мікробіологи називають асоціативністю, а мікроорганізми, що живуть в асоціації, – асоціативними [75]. До них належать представники родин *Azotobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Spirillaceae*. Ці бактерії колонізують широке коло небобових рослин (насамперед злакові культури), які поширені в різних кліматичних зонах земної кулі.

Формування асоціації PGPB з рослиною проходить етапи, подібні до таких для класичних симбіотичних відносин, – хемотаксис, лектин-вуглеводна взаємодія, колонізація поверхні (у деяких випадках внутрішніх органів рослини) і етап встановлення зв'язків, обумовлений обміном речовин, корисних і рослині, і мікроорганізму.

Ефективність азотфіксації асоціативною мікрофлорою порівняно з симбіотичною не дуже велика, однак у цих бактерій є важливі властивості, що дозволяють допомогти рослині в її зростанні та розвитку – це солюбілізація фосфатів, зниження рівня етилену, сприяння поглинанню рослинами з ґрунту калію, азоту, заліза, синтез низки вітамінів (рибофлавін, тіамін, пантотенова кислота тощо) [5, 14, 76, 77]. Велика кількість PGPB продукує речовини, які інгібують патогенну мікрофлору і сприяють формуванню у рослин так званої індукованої системи стійкості (induced systemic resistance, ISR), що захищає рослину від фітопатогенів (вірусів, бактерій і грибів) [78–80, Му рарег]. При вивченні IRS у взаємовідносинах *A. thaliana*–*P. thivervalensis* встановлено, що інфікування бактеріями призводить до зміни рівня експресії генів арабідопсису, які обумовлюють відповідь на окисний стрес, поранення, стійкість до хвороб, а також до кодування білків з невстановленими функціями [81, 82].

Дослідження згаданих взаємин привернули увагу насамперед до мікроорганізмів, які належать до роду *Azospirillum*. Окрім досить вивчених *A. brasilense*, *A. lipoferum* та *A. irakense*, нещодавно виділено і охарактеризовано новий штам азоспірил – *A. canadense*, здатний фіксувати азот в асоціації з корінням кукурудзи [83].

Азоспірили утворюють два типи асоціацій – поверхневу і внутрішньотканинну. *A. irakense*, головним чином, зв'язується з кореневими волосками рису, тоді як *A. brasilense* розташовується на поверхні кореня [84].

Процес прикріплення *A. brasilense* до пшениці (*Triticum aestivum*) може здійснюватися у дві стадії [85]. Перша стадія – слабка, оборотна і неспецифічне закріплення, обумовлене рослинними лектинами, бактеріальними поверхневими білками, капсульними полісахаридами і джгутіками. Друга стадія прикріплення необоротна й опосередкована бактеріальними поверхневими полісахаридами.

Велике значення для формування асоціації має рухливість бактеріальних клітин. Для азоспірил рухливість буває трьох типів. У рідкому середовищі вони плавають (Fla<sup>+</sup>-фенотип), в щільніших середовищах бактерії збираються групами (Swa<sup>+</sup>-фенотип) або повільно розповсюджуються

(Gri<sup>+</sup>-фенотип). У середовищах різної щільності на клітинах усіх видів азоспірил утворюється поодинокий полярний джгутик. При певній в'язкості середовища у *A. brasilense*, *A. lipoferum* і *A. irakense* продукуються численні латеральні джгутіки (Laf), які коротше і тонше полярного та відрізняються від нього серологічно [86]. Крім того, полярний джгутик бере участь в адсорбції азоспірил на корінні рослин. За допомогою інсерційного мутагенезу показано, що гени *A. brasilense* Sp245, які визначають збирання і роботу джгутиків, розташовуються як мінімум в шести ділянках геному бактерії і розкидані по плазмідній і хромосомній ДНК [87].

Ще одним критерієм, який характеризує ефективність виникнення взаємодії, є адсорбційна здатність. Цей параметр пов'язаний з рівнем продукування поверхневих полімерів, що беруть участь у контактних взаємодіях партнерів [88]. Серед факторів, контролюючих цей процес, велике значення мають рН середовища й присутність двовалентних катіонів [89].

Однак вважається, що головну роль при контакті бактерій з клітинами кореня рослин відіграють адгезивні властивості лектинів, які проявляються при взаємодії зі специфічними полісахаридами, що містяться в муцигелі.

Велику кількість даних про лектини отримано на прикладі лектину паростків пшениці (аглютиніну зародків пшениці – АЗП). Зокрема, для азоспірил *A. brasilense* і *A. lipoferum* лектин пшениці є молекулярним сигналом, що ініціює процеси, необхідні для формування і функціонування їхньої асоціації [90]. Встановлено, що клітинна відповідь *A. brasilense* Sp245 на АЗП, як і в разі еукаріотів, плейотропна, тобто включає не менше 12 окремих ефектів. Лектин ініціює процеси азотфіксації, продукування ІОК, біосинтезу глутамінсинтази та впливає на ріст бактерій і неспецифічне посилення біосинтезу клітинних білків [91].

Зв'язування лектину з поверхнею бактерій спричиняє підвищене експонування гемаглютиніну і О-специфічних полісахарид-вмісних полімерів (ЛПС-білкових комплексів і полісахарид-ліпідних комплексів капсули і мембранного ЛПС) [92], а також збільшення вмісту асоційовано-

го з поверх-нею гемолітичного чинника на клітинах бактерій. Гемолізін теж, імовірно, залучається до процесу колонізації бактеріями рослини-господаря [93].

Серед вивчених О-специфічних полісахаридів (О-ПС) виявлено велику різноманітність структур. Одні штами мають повторювану пентасахаридну рамнозну ланку, інші – гексаолігосахариди, що складаються з рамнози, галактози, манози і замісників неуглеводної природи [94]. Полісахаридні комплекси здатні взаємодіяти з АЗП і разом з ЛПС індукувати деформацію кореневих волосків паростків пшениці [89]. У *A. brasilense* Sp245 виявлено два типи О-ПС: нейтральний і кислий. Ліпополісахарид Км252 містить лише нейтральний, а Км018 – тільки кислий О-ПС. Обробка коріння пшениці препаратами ЛПС, виділеними з клітин Sp245 і його омегонових *Lps*-мутантів, індукувала деформацію кореневих волосків. Деформуюча активність ЛПС Sp245 була значно вищою порівняно з Км252 і Км018. Використання *Lps*-мутанта Км252 для інокуляції паростків пшениці дозволило отримати додатковий доказ участі ЛПС в адсорбції азоспірил на корінні рослин [94, 95].

Відповідь азоспірили на лектин рослини розвивається через деякий час і ділиться на короткострокову і пролонговану. Так, через 3–4 год після взаємодії відбувається посилення біосинтезу клітинних білків і індукція синтезу нових білків. Розмір клітин бактерій збільшуються [96]. Індукується процес азотфіксації за рахунок активації нітрогеназного комплексу і посилюється транспорт амонію з клітини в середовище перебування бактерії. У мембранах бактерії змінюється співвідношення кислих фосфоліпідів, фосфатидилгліцерину і фосфатидилхоліну [97]. До пролонгованих симбіотичних відповідей відносять збільшення кількості клітин під впливом лектину та стимуляцію азоспірилою продукування ІОК [98, 99]. Основною умовою синтезу останньої ризосферними бактеріями є наявність у корневих екsudатах попередника ІОК – триптофану [100]. Інактивація гена *ipdC*, кодуєчого індоліл-3-піруват-декарбоксілазу (ключовий фермент в одному із шляхів біосинтезу ІОК), призводить до зниження продукування ІОК до 10–50 % від рівня дикого типу [101,

102]. Продемонстровано, що білок гена *ipdC* залучений і до біосинтезу фенілоцтової кислоти, ауксину з антибактеріальною активністю. У *A. brasilense*, мутантних за геном *ipd*, значно знижується рівень фенілоцтової кислоти [103].

Можливо, що бактерії використовують ауксин як один з елементів для колонізації клітин рослин, спричиняючи ефект фітостимуляції та пригнічення основних механізмів захисту рослини [104]. Наприклад, цей фітогормон може детоксикувати деякі аналоги триптофану або його нефізіологічні концентрації, які інгібують ріст бактерій [105]. Показано індукуючу роль ще одного фітогормону – гіберелінової кислоти – в ініціації експресії двох генів рису *Oryza sativa* [106].

Кількість інформації стосовно взаємовідносин мікроорганізмів і клітин рослин в ризосфері невинно зростає. Можливо, у майбутньому стане реальним генно-інженерне конструювання ризосфери, наприклад, за рахунок створення рослин з визначеним складом корневих екsudатів, які будуть залучати до ризосфери корисні мікроорганізми і пригнічувати розвиток шкідливих бактерій [107].

За останні 20 років поняття «молекулярного діалогу» було значно уточнене, але, незважаючи на це, залишається ще багато нез'ясованого.

Основними рисами при утворенні арбускулярної мікоризи, бобово-ризобіальної взаємодії та асоціативної взаємодії небобових і ендofітних азоспірил є подібні стадії формування симбіотичної взаємодії, спільні молекулярно-генетичні механізми відповіді (загальні гени симбіозу), виникнення зв'язку за рахунок білково-полісахаридної взаємодії, утворення біоплівки, залежність асоціації від багатьох фізіологічних факторів тощо. Ризосферні бактерії реагують на хемоатрактанти корневих екsudатів, які здатні стимулювати *nod*-гени. Специфічні білки бактерій відіграють ініціуювальну роль при взаємодії, але їхні функції потребують подальшого дослідження.

Велике значення у бактеріальному зараженні коріння мають рослинні лектини і їхня взаємодія з бактеріальними полісахаридами. Висловлено загальну гіпотезу специфічного лектинового розпізнавання, яка пояснює молекулярний механізм приєднання бактерій до коріння рослин.



При цьому існує велика кількість суперечливих даних стосовно точної ролі лектинів, однак немає сумніву в тому, що ці білки є досить важливими при взаємодії рослина–мікроорганізм.

Інтенсивність симбіотичної взаємодії залежить і від багатьох фізіологічних факторів, таких як вік культури, склад і кислотність середовища, клітинна рухливість та ін., що можуть значно варіювати й мати вирішальне значення у формуванні різних симбіотичних асоціацій.

Отримані дані із взаємодії між рослиною і бактеріальним компонентом симбіотичного і асоціативного комплексів демонструють, що між ними склалась ефективна й гнучка система взаємної координації та регуляції. Результатом обміну специфічними сигналами мікроорганізмів і клітин рослин у ризосфері є молекулярно-генетична відповідь, а також біохімічні, морфологічні, фізіологічні зміни кожного з симбіонтів, направлені на оптимізацію функціонування членів співтовариства як єдиного цілісного організму.

*L. G. Lioshina*

Cellular and molecular-genetic mechanisms of the symbiosis and associative interaction of microorganisms with plants in rhizosphere

Summary

*The review contains results of researches symbiotic and associative interaction of microorganisms and plants in rhizosphere. The special attention has been given to process of contact association of microorganisms cells and plants tissues with participation of concrete molecular structures at which the dominant role is pertained to protein-carbohydrate interaction. There are common features and distinctions at formation of arbuscular mycorrhiza, rhizobia-legume symbiosis and association not leguminous and Azospirillum are shown.*

*Key words: symbiosis, associative interaction, arbuscular mycorrhiza, rhizobia, azospirillum*

*Л. Г. Лёшина*

Клеточные и молекулярно-генетические механизмы симбиоза и ассоциативного взаимодействия микроорганизмов с растениями в ризосфере

Резюме

*Рассмотрены результаты исследований по симбиотическому и ассоциативному взаимодействию микроорганизмов и растений в ризосфере. Особое внимание уделено процессу контактной ассоциации клеток микроорганизмов и тканей растений с участием конкретных молекулярных структур, в ходе которой доминантная роль отводится белково-углеводным взаи-*

*моотношениям. Отмечены общие черты и различия при формировании арбускулярной микоризы, бобово-ризобияльного симбиоза и ассоциации небобовых растений и азоспирилл.*

*Ключевые слова: симбиоз, ассоциативное взаимодействие, арбускулярная микориза, ризобии, азоспириллы.*

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Tetz V. V. Pangenom // *Tsitologia*.—2003.—**45**, N 5.—P. 526–531.
2. Provorov N. A., Borisov A. Y., Tikhonovich I. A. Comparative genetics and evolutionary morphology of symbioses formed by plants with nitrogen-fixing microbes and endomycorrhizal fungi // *Zhurnal Obshchei Biologii*.—2002.—**63**, N 6.—P. 451–472.
3. Kent A. D., Triplett E. W. Microbial communities and their interaction in soil and rhizosphere ecosystems // *Annu. Rev. Microbiol.*—2002.—**56**, N 1.—P. 211–236.
4. Lutova L. A., Provorov N. A., Tikhodeev O. N., Tikhonovich I. A., Khodzhaiova L. T., Shishkova S. O. Genetics of plant development // Ed. S. G. Inge-Vechtomov.—M.: Nauka, 2000.—539 p.
5. Hurek T., Reinhold-Hurek B. Azoarcus sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes // *J. Biotechnol.*—2003.—**106**, N 2/3.—P. 169–178.
6. Ryu C. M., Farag M. A., Hu C. H., Reddy M. S., Wei H. X., Pare P. W., Kloepper J. W. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—2003.—**100**, N 8.—P. 4927–4932.
7. Somers E., Vanderleyden J., Srinivasan M. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet // *Crit. Rev. Microbiol.*—2004.—**30**.—P. 205–240.
8. Krishnan H. B., Bennett J. O. Rhizobium-legume symbioses: molecular signals elaborated by rhizobia that are important for nodulation // *Plant-Associated Bacteria* / Ed. S. S. Gnanamanickam.—Amsterdam: Springer, 2006.—P. 57–104.
9. Cooper J. E. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue // *J. Appl. Microbiol.*—2007.—**103**.—P. 1355–1365.
10. Wall L. G. The actinorhizal symbiosis // *J. Plant Growth Regul.*—2000.—**19**.—P. 167–182.
11. Kuhn G., Hijri M., Sanders I. R. Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi // *Nature*.—2001.—**414**.—P. 745–748.
12. Pawlowska T. E., Taylor J. W. Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi // *Nature*.—2004.—**427**.—P. 733–737.
13. Harrison M. J. The arbuscular mycorrhizal symbiosis // *Plant-microbe interaction* / Eds G. Stacey, N. T. Keen.—New York: Chapman and Hall, 1997.—P. 1–34.
14. Katzy E. I. Molecular-genetic processes that affect the associative interaction of soil bacteria with plants / Ed. V. V. Ignatov.—Saratov: SGU, 2003.—172 p.
15. Strack D., Fester T., Hause B., Schliemann W., Walter M. H. Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects // *J. Chem. Ecol.*—2003.—**29**.—P. 1955–1979.
16. Bago B., Pfeiffer P. E., Shachar-Hill Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas // *Plant Physiol.*—2000.—**124**.—P. 949–958.
17. Smith S. E., Dickson S., Smith F. A. Nutrient transfer in arbuscular mycorrhizas: how are fungal and plant processes integrated? // *Austr. J. Plant Physiol.*—2001.—**28**.—P. 683–694.

18. Day D. A., Kaiser B. N., Thomson R., Udvardi M. K., Moreau S., Puppo A. Nutrient transport across symbiotic membranes from legume nodules // *Austr. J. Plant Physiol.*—2001.—**28**.—P. 667–674.
19. Parniske M. Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? // *Curr. Opin. Plant Biol.*—2000.—**3**.—P. 320–328.
20. Genre A., Chabaud M., Timmers T., Bonfante P., Barker D. G. Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection // *Plant Cell.*—2005.—**17**.—P. 3489–3499.
21. Lum M. R., Hirsch A. M. Roots and their symbiotic microbes: strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient-limiting environment // *J. Plant Growth Regul.*—2002.—**21**.—P. 368–382.
22. Parniske M. Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis // *Curr. Opin. Plant Biol.*—2004.—**7**.—P. 414–421.
23. Limpens E., Bisseling T. Signaling in symbiosis // *Curr. Opin. Plant Biol.*—2003.—**6**.—P. 343–350.
24. Geurts R., Fedorova E., Bisseling T. Nod-factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection // *Curr. Opin. Plant Biol.*—2005.—**8**.—P. 346–352.
25. Stacey G., Libault M., Brechenmacher L., Wan J., May G. D. Genetics and functional genomics of legume nodulation // *Curr. Opin. Plant Biol.*—2006.—**9**.—P. 110–121.
26. Kistner C., Winzer T., Pitzschke A., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Webb K. J., Szczyglowski K., Parniske M. Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis // *Plant Cell.*—2005.—**17**.—P. 2217–2229.
27. Gherbi H., Markmann K., Svistoonoff S., Estevan J., Aufran D., Giczey G., Auguy F., Peret B., Laplaze L., Franche C., Parniske M., Bogusz D. SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and Frankiacteria // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2008.—**105**, N 12.—P. 4928–4932.
28. Xie Z.-P., Muller J., Wiemken A., Broughton W. J., Boller T. Nod factors and tri-iodobenzoic acid stimulate mycorrhizal colonization and affect carbohydrate partitioning in mycorrhizal roots of *Lablab purpureus* // *New Phytologist.*—1997.—**139**.—P. 361–366.
29. Borisov A. Y., Jacobi L. M., Lebsky V. K., Morzhina E. V., Tsyganov V. E., Voroshilova V. A., Tikhonovich I. A. Pea (*Pisum sativum* L.) genetic system controlling development of nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza // *New approaches and techniques in breeding sustainable fodder crops and amenity grasses* / Eds N. A. Provorov, I. A. Tikhonovich, F. Veronesi.—St-Petersburg: VIR publ., 2000.—P. 231–236.
30. Jacobi L. M., Zubkova L. A., Barmicheva E. M., Tsyganov V. E., Borisov A. Y., Tikhonovich I. A. Effect of mutations in the pea genes *Sym33* and *Sym40*. II. Dynamics of arbuscule development and turnover // *Mycorrhiza.*—2003.—**13**.—P. 9–16.
31. Staehelin C., Charon C., Boller T., Crespi M., Kondorosi A. *Medicago truncatula* plants overexpressing the early nodulin gene *enod40* exhibit accelerated mycorrhizal colonization and enhanced formation of arbuscules // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2001.—**98**.—P. 15366–15371.
32. Solaiman M. Z., Senoo K., Kawaguchi M., Imaizumi-Anraku H., Akao S., Tanaka A., Obata H. Characterization of mycorrhizas formed by *Glomus* sp. on root of hypermodulating mutants of *Lotus japonicus* // *J. Plant Res.*—2000.—**113**.—P. 443–448.
33. Demchenko K., Winzer T., Stougaard J., Parniske M., Pawlowski K. Distinct roles of *L. japonicus* SYMRK and SYM15 in root colonization and arbuscule formation // *New Phytologist.*—2004.—**163**.—P. 381–392.
34. Novero M., Faccio A., Genre A., Stougaard J., Webb K. J., Mulder L., Parniske M., Bonfante P. Dual requirement of the *LjSym4* gene for mycorrhizal development in epidermal and cortical cells of *Lotus japonicus* roots // *New Phytologist.*—2002.—**154**.—P. 741–749.
35. Franken P., Requena N. Analysis of expression in arbuscular mycorrhizas: new approaches and challenges // *New Phytologist.*—2001.—**150**.—P. 517–523.
36. Hohnjec N., Henckel K., Bekel T., Gouzy J., Dondrup M., Goesmann A., Kuster H. Transcriptional snapshots provide insights into the molecular basis of arbuscular mycorrhiza in the model legume *Medicago truncatula* // *Funct. Plant Biol.*—2006.—**33**.—P. 737–748.
37. Borisov A. Y., Danilova T. N., Koroleva T. A., Naumkina T. S., Pavlova Z. B., Pinaev A. G., Shtark O. Y., Tsyganov V. E., Voroshilova V. A., Zhernakov A. I., Zhukov V. A., Tikhonovich I. A. Pea (*Pisum sativum* L.) regulatory genes controlling development of nitrogen-fixing nodule and arbuscular mycorrhiza: fundamentals and application // *Biologia.*—2004.—**59**, N 13.—P. 137–144.
38. Shaul O., David R., Sinvani G., Ginzberg I., Ganon D., Wininger S., Ben-Dor B., Badani H., Ovdad N., Kapulnik Y. Plant defense responses during arbuscular mycorrhiza symbiosis // *Current advances in mycorrhizal research* / Eds G. K. Podila, D. D. Douds.—St. Paul: Amer. Phytopathol. Soc. press, 2000.—P. 61–68.
39. Yedidia I., Benhamou N., Kapulnik Y., Chet I. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *T. harzianum* strain T-203 // *Plant Physiol. Biochem.*—2000.—**38**.—P. 1–11.
40. Rodriguez-Navarro D. N., Dardanelli M. S., Ruiz-Sainz J. E. Attachment of bacteria to the roots of higher plants // *FEMS Microbiol. Lett.*—2007.—**272**, N 2.—P. 127–136.
41. Denarie J., Debell F., Truche G., Prome J.-C. Rhizobium and legume nodulation: a molecular dialogue // *New horizons in nitrogen fixation* / Eds R. Palacios, J. Mora, W. E. Newton.—Dordrecht: Kluwer, 1993.—P. 19–30.
42. Roth L. E., Stacey G. Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources // *Eur. J. Cell. Biol.*—1989.—**49**, N 1.—P. 13–23.
43. Quispel A. Evolutionary aspects of symbiotic adaptations: Rhizobium's contribution to evolution of associations // *The Rhizobiaceae* / Eds H. Spaink, A. Konodorosi, P. J. J. Hooykaas.—Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. publ., 1998.—P. 487–507.
44. Ljones T. Nitrogen fixation and bioenergetics: the role of ATP in nitrogenase catalysis // *FEBS Lett.*—1979.—**98**, N 1.—P. 1–8.
45. Bertsova Y. V., Demin O. V., Bogachev A. V. The respiratory protection of the nitrogenase complex in *Azotobacter vinelandii* // *Uspekhi Biol. Khimii.*—2005.—**45**.—P. 205–234.
46. Kaminski P. A., Batut J., Boistard P. A survey of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia // *The Rhizobiaceae* / Eds H. Spaink, A. Konodorosi, P. J. J. Hooykaas.—Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. publ., 1998.—P. 431–460.
47. Aoki T., Akashi T., Ayab S. Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis // *J. Plant Res.*—2000.—**113**.—P. 475–488.

48. Subramanian S., Stacey G., Oliver Y. Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation // Trends Plant Sci.–2007.–**12**, N 7.–P. 282–285
49. Begum A., Leibovitch S., Migner P., Zhang F. Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments // J. Exp. Bot.–2001.–**52**.–P. 1537–1543
50. van Brussel A. A. N., Recourt K., Pees E., Spaink H. P., Tak T., Wijffelman C., Kijne J., Lugtenberg B. J. J. A biovar-specific signal of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* induces increased nodulation gene-inducing activity in root exudate of *Vicia sativa* subsp. *Nigra* // J. Bacteriol.–1990.–**172**.–P. 5394–5401.
51. Schmidt P., Broughton W., Werner D. Nod factors of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium* sp. NGR234 induce flavonoid accumulation in soybean root exudates // Mol. Plant-Microbe Interact.–1994.–**7**.–P. 384–390.
52. Cooper J. E. Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection // Adv. Bot. Res.–2004.–**41**.–P. 1–62.
53. Oldroyd G. E. D. Nodules and hormones // Science.–2007.–**315**.–P. 52–53.
54. Subramanian S., Stacey G., Yu O. Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum* // Plant J.–2006.–**48**.–P. 261–273.
55. Lerouge P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Prome J. C., Denarie J. Symbiotic host specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal // Nature.–1990.–**344**, N 6268.–P. 781–784.
56. Ovtisyna A. O., Tikhonovich I. A. Structure, functions and possibility of the practical application of the signal molecules, initiating development rhizobium-legume symbioses // Ecol. Genetika.–2004.–**1**.–P. 36–46.
57. Chen X.-C., Feng J., Hou B.-H., Li F.-Q., Li Q., Hong G.-F. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum* // Nucl. Acids Res.–2005.–**33**.–P. 2540–2548.
58. Peck M. C., Fisher R. F., Long S. R. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti* // J. Bacteriol.–2006.–**188**.–P. 5417–5427.
59. Kobayashi H., Naciri-Graven Y., Broughton W. J., Perret X. Flavonoids induce temporal shifts in gene expression of nod-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234 // Mol. Microbiol.–2004.–**51**.–P. 335–347.
60. Dixon R., Kahn D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation // Nat. Rev. Microbiol.–2004.–**2**.–P. 621–631.
61. Lee S., Reth A., Meletzus D., Sevilla M., Kennedy C. Characterization of a major cluster of nif, fix, and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus* // J. Bacteriol.–2000.–**182**, N 24.–P. 7088–7091.
62. Yahyaoui F. E., Kuster H., Ben Amor B., Hohnjec N., Puhler A., Becker A., Gouzy J., Vernie T., Gough C., Niebel A., Godiard L., Gamas P. Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program // Plant Physiol.–2004.–**136**.–P. 3159–3176.
63. Gagnon H., Ibrahim R. K. Aldonic acids: a novel family of nod gene inducers of *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium lupini* and *Sinorhizobium meliloti* // Mol. Plant-Microbe Interact.–1998.–**11**.–P. 988–998.
64. Mabood F., Souleimanov A., Khan W., Smith D. Jasmonates induce Nod factor production by *Bradyrhizobium japonicum* // Plant Physiol. Biochem.–2006.–**44**.–P. 759–765.
65. Yuen J. P. Y., Cassini S. T., De Oliveira T. T., Nagem T. J., Stacey G. Xanthone induction of nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum* // Symbiosis.–1995.–**19**.–P. 131–140.
66. D'Haese W., Holsters M. Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity // Trends Microbiol.–2004.–**12**.–P. 555–561.
67. Fujishige N. A., Kapadia N. N., De Hoff P. L., Hirsch A. M. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation // FEMS Microbiol. Ecol.–2006.–**56**.–P. 195–206.
68. Laus M. C., Logman T. J., Lamers G. E., van Brusel A. A. N., Carlson R., Kijne J. W. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin // Mol. Microbiol.–2006.–**59**.–P. 1704–1713.
69. Rudiger H., Gabius H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications // Glycoconj. J.–2001.–**18**.–P. 589–613.
70. Karpunina L. V., Smiyan M. S., Kosenko L. V. The effect of the carbohydrate components of pea roots on the enzymatic activity of the surface agglutinins of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 252 // Microbiology.–2004.–**73**, N 4.–P. 461–464.
71. Antonyuk L. P., Ignatov V. V. The role of wheat germ agglutinin in plant-bacteria interactions: a hypothesis and the evidence in its support // Russ. J. of Plant Physiol.–2001.–**48**, N 3.–P. 427–433.
72. Theunis M., Kobayashi H., Broughton W. J., Prinsen E. Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234 // Mol. Plant-Microbe Interact.–2004.–**17**.–P. 1153–1161.
73. Kannenberg E., Perzl M., Hartner T. The occurrence of hopanoid lipids in *Bradyrhizobium* bacteria // FEMS Microbiol. Lett.–1995.–**127**.–P. 255–262.
74. Matiru V. N., Dakora F. D. Xylem transport and shoot accumulation of lumichrome, a newly recognized rhizobial signal, alters root respiration, stomatal conductance, leaf transpiration and photosynthetic rates in legumes and cereals // New Phytologist.–2005.–**165**.–P. 847–855.
75. Molecular bases of the relationships between associative microorganisms and plants / Ed. V. V. Ignatov.–M.: Nauka, 2005.–262 p.
76. Kravchenko L. V., Azarova T. S., Makarova N. M., Tikhonovich I. A. The effect of tryptophan present in plant root exudates on the phyto stimulating activity of rhizobacteria // Microbiology.–2004.–**73**, N 2.–P. 195–198.
77. Penrose D. M., Glick B. R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria // Physiol. Plant.–2003.–**118**, N 1.–P. 1310–1372.
78. Kloepper J. W., Ryu Ch.-M., Zhang Sh. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. // Phytopathology.–2004.–**94**, N 11.–P. 1259–1266.
79. Loon L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria // Eur. J. Plant Pathol.–2007.–**119**, N 3.–P. 243–254.
80. Jetiyanon K., Kloepper J. W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance

- against multiple plant diseases // *Biol. Control.*—2002.—**24**, N 3.—P. 285–291.
81. *Cartieaux F., Thibaud M.-C., Zimmerli L., Lessard S., Sarrobert C., David P., Gerbaud A., Robaglia C., Somerville S., Nussaume L.* Transcriptome analysis of *Arabidopsis* colonized by a plant-growth promoting rhizobacterium reveals a general effect on disease resistance // *Plant J.*—2003.—**36**, N 2.—P. 177–188.
  82. *Whipps J. M.* Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere // *J. Exp. Bot.*—2001.—**52**, Special issue.—P. 487–511.
  83. *Mehnaz S., Weselowski B., Lazarovits G.* *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*—2007.—**57**—P. 620–624.
  84. *Zhu G. Y., Dobbelaere S., Vanderleyden J.* Use of green fluorescent protein to visualize rice root colonization by *Azospirillum irakense* and *A. brasilense* // *Funct. Plant Biol.*—2002.—**29**—P. 1279–1285.
  85. *Michiels K., Croes C. L., Vanderleyden J.* Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots // *J. Gen. Microbiol.*—1991.—**137**—P. 2241–2246.
  86. *Katzy E. I.* Molecular-genetic aspects of formation at *Azospirillum brasilense* O-specific polysaccharides, motor organelles and extracellular metabolites important for this bacteria-plant interactions: Thesis. E Dr. biol. sci.—M., 2002.—388 p.
  87. *Katzy E. I.* Characterization of genes identified in the 120-MDa plasmid of an *Azospirillum brasilense* Sp245 mutant defective in polar flagellation and swarming // *Russ. J. of Genetics.*—2002.—**38**, N 1.—P. 22–32.
  88. *Burdman S., Okon Y., Jurkevitch E.* Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots // *Crit. Rev. Microbiol.*—2000.—**26**, N 2.—P. 91–110.
  89. *de Oliveira Pinheiro R., Boddey L. H., James E. K., Sprent J. I., Boddey R. M.* Adsorption and anchoring of *Azospirillum* strains to roots of wheat seedlings // *Plant and Soil.*—2002.—**246**, N 2.—P. 151–166.
  90. *Karpati E., Kiss P., Pony T., Fendrik I., De Zamaroczy M., Orosz L.* Interaction of *Azospirillum lipoferum* with wheat germ agglutinin stimulates nitrogen fixation // *J. Bacteriol.*—1999.—**181**, N 13.—P. 3949–3955.
  91. *Steenhoudt O., Vanderleyden J., Kefalogianni I., Aggelis G.* Modelling growth and biochemical activities of *Azospirillum* spp. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*—2002.—**58**, N 3.—P. 352–357.
  92. *Fedonenko Yu. P., Konnova O. N., Zatonky G. V., Shashkov A. S., Konnova S. A., Zdorovenko E. L., Ignatov V. V., Knirel Yu. A.* Structure of the O-polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum irakense* KBC1 // *Carbohydr. Res.*—2004.—**339**, N 10.—P. 1813–1816.
  93. *Fedonenko Yu. P., Egorenkova I. V., Konnova S. A., Ignatov V. V.* Involvement of the lipopolysaccharides of azospirilla in the interaction with wheat seedling roots // *Microbiology.*—2001.—**70**, N 3.—P. 384–390.
  94. *Fedonenko Yu. P., Zdorovenko E. L., Konnova S. A., Ignatov V. V., Shlyakhtin G. V.* Comparison of the lipopolysaccharides and O-specific polysaccharides of *Azospirillum brasilense* Sp245 and its omegon-Km mutants KM018 and KM252 // *Microbiology.*—2004.—**73**, N 2.—P. 180–187.
  95. *Fedonenko Yu. P., Borisov I. V., Konnova O. N., Zdorovenko E. L., Katsy E. I., Konnova S. A., Ignatov V. V.* Determination of the structure of the repeated unit of the *Azospirillum brasilense* SR75 O-specific polysaccharide and homology of the *lps*-loci in the plasmids of *Azospirillum brasilense* strains SR75 and Sp245 // *Microbiology.*—2005.—**74**, N 5.—P. 542–558.
  96. *Antonyuk L. P., Fomina O. R., Ignatov V. V.* Effect of wheat lectin on the metabolism of *Azospirillum brasilense*: induction of protein synthesis // *Microbiology.*—1997.—**66**, N 2.—P. 172–178.
  97. *Antonyuk L. P., Fomina O. R., Kalinina A. V., Semynov S. V., Nesmeyanova M. A., Ignatov V. V.* Wheat lectin possibly serves as a signal molecule in *Azospirillum*-wheat association // *Azospirillum VI and related microorganisms: Genetics, physiology, ecology* / Eds I. Fendrik et al.—Berlin: Springer (NATO ASI Ser.; V. G37), 1995.—P. 319–324.
  98. *Wasson A. P., Pellerone F. I., Mathesius U.* Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia // *Plant Cell.*—2006.—**18**—P. 1617–1629.
  99. *Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R.* Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling // *FEMS Microbiol. Rev.*—2007.—**31**, N 4.—P. 425–448.
  100. *Costacurta A., Vanderleyden J.* Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria // *Crit. Rev. Microbiol.*—1995.—**21**, N 1.—P. 1–18.
  101. *Van de Broek A., Gysegom P., Ona O., Hendrickx N., Prinsen E., Van Impe J., Vanderleyden J.* Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-acting sequence involved in auxin responsive expression // *Mol. Plant-Microbe Interact.*—2005.—**18**—P. 311–323.
  102. *Malhotra M., Srivastava S.* An *ipgC* gene knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion // *Antonie van Leeuwenhoek.*—2008.—**93**, N 4.—P. 425–433.
  103. *Somers E., Ptacek D., Gysegom P., Srinivasan M., Vanderleyden J.* *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis // *Appl. Environ. Microbiol.*—2005.—**71**—P. 1803–1810.
  104. *Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R.* Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling // *FEMS Microbiol. Rev.*—2007.—**31**—P. 425–448.
  105. *Sergeeva E., Hirkala D. L. M., Nelson L. M.* Production of indole-3-acetic acid, aromatic amino acid aminotransferase activities and plant growth promotion by *Pantoea agglomerans* rhizosphere isolates // *Plant and Soil.*—2007.—**297**, N 1–2.—P. 1–13.
  106. *Cassan F., Bottini R., Schneider G., Piccoli P.* *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA20 and metabolize the resultant aglycones to GA<sub>1</sub> in seedlings of rice dwarf mutants // *Plant Physiol.*—2001.—**125**—P. 2053–2058.
  107. *Oger P. M., Mansouri H., Nesme X., Dessaux Y.* Engineering root exudation of Lotus toward the production of two novel carbon compounds leads to the selection of distinct microbial populations in the rhizosphere // *Microbiol. Ecol.*—2004.—**47**, N 1.—P. 96–103.