

УДК 581.1

ЗАЩИТНЫЕ СИСТЕМЫ БОБОВОГО РАСТЕНИЯ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ РИЗОБИЯМИ

© 2016 г. А. К. Глянько

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Российской академии наук
(Иркутск, Россия)*

Обобщены данные о защитных механизмах бобового растения, инфицированного клубеньковыми бактериями (ризобиями). Доказывается тезис об участии защитных систем растения МТИ (MAMP-triggered immunity) и ЕТИ (effector-triggered immunity) в противодействии инвазии ризобий как возможных патогенов в ткани корня на начальных этапах взаимодействия организмов, а также в дальнейшем, как регулирующего механизма ризобиального инфицирования корней. Отмечается возможность блокирования растением инвазии ризобий в другие органы растения (например, эпикотили), не подвергающихся инфицированию клубеньковыми бактериями. В связи с этим предлагается ввести понятие локальной и системной устойчивости бобового растения к ризобиальной инфекции. В первом случае ризобии подавляют иммунный ответ клеток корня растения, во втором – усиливают устойчивость растения к ризобиям. Подробно рассматривается роль Nod-факторов ризобий (NFs) и взаимодействующих с ними растительных рецепторов в блокировании защитных реакций корня и запуске сигнального каскада по органогенезу клубенька. Отмечаются новые факты о роли NFs при формировании бобово-ризобиального симбиоза: отсутствие у некоторых ризобий (*Bradyrhizobium*) канонических *nodABC*-генов, которые требуются для синтеза NFs; восприятие Nod-фактора не бобовыми растениями (арабидопсисом, пшеницей, томатами), что ведет к супрессии МТИ-защитной системы у этих растений. Обсуждается роль бактериальных поверхностных экзополисахаридов в супрессии защитной системы корня против ризобий. Делается вывод, что природный (врожденный) иммунитет клеток бобового растения (кроме специфических NFs) активно участвует в формировании и функционировании бобово-ризобиального симбиоза.

Ключевые слова: *Rhizobium*, бобовые растения, бобово-ризобиальный симбиоз, Nod-факторы, МТИ/ЕТИ-защитные системы растения, T3/4SS-секреционные системы бактерий, LysM/LRR-домен RLKs-растительные рецепторы

Ассоциации растений с почвенными микроорганизмами – явление в природе ординарное. Широко распространенными являются патогенные и мутуалистические растительно-микробные взаимодействия. В первом случае патогенные бактерии при инвазии в растительные клетки получают одностороннюю выгоду, потребляя питательные вещества растения для своего размножения и «отравляя» растительный организм продуктами своей жизнедеятельности, что приводит к депрессии процессов жизнедеятельности растений, снижению их

продуктивности и в худшем случае к гибели. Примером наиболее агрессивных фитопатогенов может служить почвенная бактерия из рода *Rhizobium* – *Agrobacterium tumefaciens*, которая образует на растениях опухоли (галлы) посредством переноса в растительный геном Ti-плазмиды (tumour-inducing), что ведет к модификации метаболизма растения, заключающейся в усиленном синтезе гормонов роста (ауксинов и цитокининов), а также опинов – растительных соединений для питания *Agrobacterium tumefaciens*.

Мутуалистические ассоциации характеризуются взаимовыгодными связями между организмами, когда продукты их жизнедеятельности используются обоими партнерами. К

числу таких ассоциаций относится симбиоз между так называемыми клубеньковыми бактериями (семейство *Rhizobiaceae*) и растениями семейства бобовых (*Fabaceae*), составляющих значительную группу кормовых и пищевых культур, которые формируют бобово-ризобиальный симбиоз (БРС). При функционировании БРС между партнерами происходит обмен жизненно необходимыми соединениями: клубеньковые бактерии, локализуясь во вновь образованных корневых клубеньках, поставляют бобовому растению восстановленный азот (аммоний), а растение снабжает бактерии углеводами (дикарбоновыми кислотами). Бобовые (*Fabaceae*) – единственное семейство растений, за исключением *Parasponia andersonii* из семейства *Cannabaceae*, способных устанавливать симбиотическое взаимовыгодное сотрудничество с почвенными клубеньковыми бактериями (ризобиями). В семейство *Rhizobiaceae* входят грам-отрицательные бактерии из разных родов: *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mezorhizobium*, *Sinorhizobium*. Формировать мутуалистические ассоциации с древесными растениями (например, с ольхой и облепихой) могут также грам-положительные почвенные азотфиксирующие бактерии рода *Frankia* (семейство *Actinomycetes*), которые (в отличие от ризобий) фиксируют атмосферный азот и в свободном состоянии, а при проникновении в корни растений образуют корневые клубеньки, в которых они, как и ризобии, с участием ферментного комплекса нитрогеназы восстанавливают атмосферный N_2 до аммония, потребляемого затем растением.

Раскрытие механизмов бобово-ризобиальных взаимодействий связано с преодолением бактериями защитных систем растения-хозяина и «легитимным» существованием ризобий в тканях корней бобового растения. С помощью каких механизмов происходит это взаимодействие и как «враги» (ризобии) превращаются в «друзей» растения – вопросы требующие детального изучения в связи с перспективой создания N_2 -фиксирующего аппарата в других, имеющих большое хозяйственное значение, растениях, которые могли бы фиксировать атмосферный азот в кооперации с бактериями (Проворов, Воробьев, 2010; Beatty, Good, 2011).

В данном обзоре сделана попытка раскрыть физиологические особенности функционирования защитных систем инфицированного ризобиями бобового растения в сравнении с патогенными и другими вирулентными бактерия-

ми. При этом учитывалось мнение, что на самых ранних этапах инвазии ризобии (как и другие бактерии) встречают со стороны бобовых растений противодействие внедрению путем активации защиты (Deakin, Broughton, 2009). Однако в дальнейшем ризобии обходят или подавляют защитные реакции, но, по-видимому, «оставляют» растению-хозяину возможность регулировать процесс инфекции с применением часто тех же самых механизмов иммунитета, которые применяются против других микроорганизмов (Kouchi et al., 2004; Lohar et al., 2006).

Механизмы взаимодействия микроорганизмов с растениями

Основная особенность растительно-бактериального взаимодействия состоит в том, что внедрение любых бактерий в ткани растительного организма сопровождается активацией его защитных реакций, подавление или преодоление которых ведет к бактериальной колонизации растительных клеток. В настоящее время выделяют две ветви растительной иммунной системы клеток (Jones, Dangl, 2006; Шамрай, 2014; Шафикова, Омеличкина, 2015). Одна использует трансмембранные растительные рецепторы PRRs (pattern recognition receptors), которые воспринимают микробные или патогенные молекулы (patterns) MAMPs или PAMPs (microbial- or pathogen-associated molecular patterns). Эти микробные молекулярные структуры – «паттерны» (элиситоры), имеются практически у всех микроорганизмов, в том числе и у ризобий. Примером их может служить бактериальный флагеллин и грибной хитин. Вследствие этого на начальных стадиях инвазии любые бактерии распознаются как чужие, что ведет к инициации неспецифического ответа иммунной системы клеток растения (Jones, Dangl, 2006). Этот тип иммунитета носит название PTI (pattern-triggered immunity) или MTI (MAMP-triggered immunity). Следует добавить, что растительные PRRs – это поверхностно локализованные на мембранах рецепторные киназы (RKs) (receptor kinases) или рецептор-подобные белки (RLPs) (receptor-like proteins), содержащие различные лиганд-связанные внеклеточные домены (эктодомены), которые воспринимают MAMPs или PAMPs (Gourion et al., 2015). Связывание MAMPs с внеклеточными доменами рецепторных киназ (например, LysM RLK) активизирует внутриклеточные киназные домены (например, LRR RLK), которые в свою очередь вызывают активацию комплексного сигнального каскада, ве-

дущего к инициации различных защитных реакций.

Вторая ветвь природного (врожденного) иммунитета растения носит название ETI (effector-triggered immunity) и является специфическим уровнем защиты клеток. Она действует внутриклеточно и характеризуется взаимодействием эффекторов – продуктов авирулентных (*Avr*) генов патогенов и рецепторных белков растения (продуктов *R*-генов). В результате реализации этого взаимодействия развивается реакция сверхчувствительности (СЧР), вследствие которой наступает смерть растительной клетки и торможение бактериальной инфекции (Katagiri, Tsuda, 2010). При этом взаимодействии растения используют полиморфные NB-LRR-белковые продукты, кодируемые *R*-генами. Они названы NB (nucleotide binding) и LRR (leucine-rich repeat) – от повторов богатых лейцином во внутриклеточном N-концевом домене. Патогенные соединения (*Avr*-белки) узнаются NB-LRR-белками и активируют гены защиты. Следует отметить, что структурно NB-LRR-белки сходны с животными NOD-подобными рецепторами NLRs (Nucleotide Like Receptors), воспринимающими бактериальные эффекторы внутри клетки (Stuart et al., 2013).

Доставка эффекторных белков и нуклеиновых кислот в клетки растения осуществляется так называемыми секреторными системами T3SS или T4SS (the type 3/4 secretion systems) патогенных микробов. Эти системы используются грам-отрицательными патогенными бактериями для транспортировки эффекторных соединений в клетки растения-хозяина. Патогены (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Pantoea* и др.) используют секреторные системы на ранних стадиях инфекции, чтобы установить контакт «cell-to-cell». Когда контакт установлен, T3/4SS осуществляют прямую секрецию и транслокацию различных групп бактериальных белков, нуклеиновых кислот, токсинов, известных как секреторные эффекторы, в клетки растения-хозяина (Jeandroz et al., 2013; Zipfel, 2014).

Следовательно, связанная с мембранными рецепторами растения РТИ(МТИ)-иммунная система обеспечивает первичную устойчивость к большинству непатогенных и патогенных микробов и вносит вклад в основную устойчивость растения в течение инфекции. Однако более существенная роль в иммунитете растения принадлежит ETI, которая использует внутриклеточные иммунные рецепторы (NB-LRR), взаимодействуя со многими эффектор-

ными белками патогенных микробов (например, *AvrPto*, *AvrPtoB* бактериального патогена *Pseudomonas syringae*). При реализации ETI действует принцип «ген-на-ген» (Flor, 1947), что означает соответствие бактериального белкового эффектора растительному соединению – продукту *R*-гена (например, комплементарный NB-LRR). Возможное функционирование этих механизмов взаимного узнавания у ризобий и бобовых растений будет рассмотрено ниже.

Условия для формирования бобово-ризобиального симбиоза

Симбиоз между ризобиями и бобовыми характеризуется образованием на корнях азотфиксирующих клубеньков. Хотя ризобии заселяют корни по пути, который напоминает путь используемый патогенными микроорганизмами, защитные реакции растения-хозяина не инициируются в течение успешного симбиоза. Однако бобовое растение, очевидно, регулирует инвазию бактерий: сбои в эффективном формировании клубенька или инфекция с мутантными ризобиями часто вызывают защитные реакции растения-хозяина, которые наблюдаются и при инвазии патогенов.

Публикации последних лет указывают на то, что природный (врожденный) иммунитет растения играет существенную роль в течение ранних этапов бобово-ризобиального взаимодействия (Mithofer, 2002; Jones et al., 2008; Yang et al., 2010; Gough, Jacquet, 2013; Liang et al., 2013; Lopez-Gomes et al., 2012; Okazaki et al., 2013; Lomovatskaya et al., 2015). У ризобий и бобовых растений основными участниками процесса узнавания партнеров являются с одной стороны ризобиальные липохитоолигосахариды (Nod-факторы), и с другой – рецептор-подобные киназы (RLKs) бобовых растений. Nod-факторы (NFs) синтезируются ризобиальными бактериями в результате экспрессии *nod*-генов, инициируемой фенольными соединениями, выделяемыми растением в ризосферу. Nod-факторы воспринимаются эпидермальными клетками растения, на плазмалемме которых локализован комплекс рецептор-подобных киназ (RLK – receptor-like kinases), например, NFR или NFP. Химическое узнавание партнеров на начальных стадиях БРС ведет к активации симбиотических путей у растения-хозяина, связанных с инфекцией и клубенькообразованием (MurRAY, 2011) и, по-видимому, с супрессией защитных систем (Gourion et al., 2015). По сути это первая ветвь реакции растения-хозяина на инвазию ризобий: бактериальный компонент в виде Nod-фактора (MAMP-pattern)

и растительный компонент – рецептор PRR в виде рецептор-подобных киназ, локализованных на плазмалемме клетки (LysM RLK) и внутриклеточно (LRR RLK) (Ferguson et al., 2010).

Необходимо отметить наличие в корнях люцерны (*Medicago truncatula*) лектин-подобных рецепторных киназ (LecRKs) (Navarro-Gochicoa et al., 2003). Лектин, как эктодомен в этой рецепторной киназе, может взаимодействовать с различными MAMP: ризобиальными олигосахаридами, патогенным хитином и глюканом. LecRKs не взаимодействуют с NFs (Navarro-Gochicoa et al., 2003). Физиологическая роль LecRK окончательно не выяснена, но доказано положительное влияние бобового лектина на процессы нодуляции и защитные реакции растений (Hirsch, 1999; Молодченкова, Адамовская, 2014; Мельникова, Коць, 2015).

Взаимодействие ризобий и бобового растения на начальных этапах сопровождается деформацией корневых волосков, образованием специфических структур – инфекционных нитей (IT, infection threads), в которых происходит размножение ризобий и их транспорт к кортикальным клеткам корня, где инициируется меристематическая активность и органогенез клубенька (Глянько, 2015б). Достигнув кортекса, ризобии проникают в клетки растения-хозяина и в образовавшихся клубеньках дифференцируются в бактериоиды, в которых происходит процесс фиксации атмосферного азота с участием бактериального нитрогеназного ферментного комплекса.

Таким образом, относительно свободное заселение ризобиями клеток корня свидетельствует о снижении устойчивости растения против этих бактерий, вероятно, путем блокирования или «обхода» защитных систем растения-хозяина. Подтверждением этому является значительное угнетение экспрессии генов, связанных с защитой, в инфицированных клетках клубенька по сравнению с неинфицированными (Kouchi et al., 2004; Limpens et al., 2013). Очевидно также, что ризобии могут обходить защиту бобового растения, «прячась» в инфекционных нитях, и окружая себя перибактероидной мембраной. Однако данные литературы свидетельствуют о том, что бактериальный мутуалист на ранних стадиях взаимодействия с растением может проявлять свойства фитопатогенов, активируя факторы вирулентности (например, цАМФ - циклический аденозинмонофосфат), что позволяет им не только проникать в клетки растения, но также ослаблять его

устойчивость (Lomovatskaya et al., 2015). По данным Соколовой (2001), ризобиальное инфицирование активирует в корнях гороха пектолитический фермент полигалактуроназу, что ведет к снижению уровня пектинов, размягчению клеточной оболочки и способствует более легкому проникновению в корень ризобий. Здесь можно говорить об активации факторов вирулентности у микросимбионта, что характерно и для вирулентных патогенов. О снижении устойчивости бобового растения при ризобиальной инфекции также идет речь в статье Gourion et al. (2015), посвященной анализу факторов, вовлеченных в супрессию растительного иммунитета в течение БРС. Однако следует отметить, что не весь корень одинаково восприимчив к ризобиальной инфекции (Глянько и др., 2007). Существуют определенные зоны корня (инфекционные сайты, фокусы инфекции), чувствительные к ризобиям. Предполагается, что они определяются точками меристематической активности в кортикальных клетках, где в дальнейшем и образуется клубеньковая меристема (Nutman, 1959; Соколова, 2001). По данным Васильевой с соавт. (2005а; б), после ризобиальной инокуляции (через 24 и 48 ч) изменяется содержание супероксидного анионрадикала ($O_2^{\cdot-}$), пероксида водорода, а также активность супероксиддисмутазы и каталазы не только в корне этиолированных проростков гороха, но и в эпикотиле – органе, который не участвует в инфицировании. Эти факты могут говорить о системной регуляции, препятствующей инфицированию ризобиями эпикотиля и, по-видимому, всего растения. Индуцируется эта система, возможно, за счет образования так называемых «факторов тревоги» на начальной стадии инвазии ризобий за счет волнового распространения их по растению. Это явление обсуждается применительно к патогенам (Шамрай, 2014; Шафилова, Омеличкина, 2015). Но если принять во внимание, что ризобии на начальных стадиях инфицирования ведут себя как патогенные микроорганизмы, то такое предположение вполне приемлемо. Но, с другой стороны, бобовые способны индуцировать защитные реакции и в течение ризобиальной инфекции, о чем, в частности, свидетельствуют результаты опытов с гибелью инфекционных нитей в корнях люцерны в результате сверхчувствительной реакции (Vasse et al., 1993) и блокирование защитных реакций в функционирующих клубеньках люцерны ризобиальным белком VasA, ассоциированным также с животными патогенами (Berrabah et al., 2015).

Итак, основной вопрос: ризобии вирулентный патоген или нет? На первый взгляд, нет условий, чтобы растение инициировало защитные механизмы при ризобиальном инфицировании. Однако на самой ранней стадии инвазии и на некоторых других стадиях ризобии, по-видимому, воспринимаются как враги и растение включает защитные механизмы для противодействия их проникновению в клетки корня (Djordjevic et al., 1987; Baron, Zambryski, 1995). Поэтому присутствие определенных ризобиальных соединений, противодействующих защитным реакциям растения-хозяина, позволяет ризобиям инфицировать растительные клетки. Можно сделать вывод, что клубеньковые бактерии бобовых растений, с одной стороны, проявляют свойства фитопатогенов на ранних этапах взаимодействия, а с другой – обладают собственными уникальными метаболическими путями, позволяющими регулировать эффективность инфекции и функциональную активность симбиоза (Saeki, 2011). К этим соединениям можно отнести, в частности, ризобиальные полисахариды, МАРМ-соединения (например, ризобиальный флагеллин, грибной хитин), ТЗСС и Т4СС – системы, Nop L (nodulation protein L). Итак, с точки зрения эволюции комменсальный и мутуалистический симбиозы возникли из растительно-патогенных взаимоотношений (Nakagawa et al., 2011).

Защитные реакции, наблюдаемые при инвазии ризобий

Начальная стадия бобово-ризобиального взаимодействия включает взаимное узнавание симбиотических партнеров, проникновение и распространение микросимбионта внутри растительных клеток с одновременной инициацией образования примордия клубенька (Ferguson et al., 2010; Oldrout et al., 2011). Обмен сигналами между двумя организмами индуцирует клеточное деление во внутреннем корневом кортексе с образованием примордия клубенька (Long, 2001; Глянко, 2015б). Параллельно корень подвергается ризобиальной инфекции через инфекционные нити (ИТ), формирующиеся в корневых волосках (Jones et al., 2007). Ризобии затем передвигаются по ИТ к клеткам растения-хозяина с помощью эндоцитоза, образуя оргanelло-подобные структуры – симбиосомы, которые дифференцируются затем в азотфиксирующие бактериоиды. Следует отметить, что бобовые растения способны к тонкой регуляции инфекционного процесса и клубенькообразования, определяя локализацию проникновения ризобий, их количество и число клубеньков

(Проворов, 1996; Hadri et al., 1998). Инфекционный процесс возникает в очень небольшом количестве корневых волосков. Процент инфицированных корневых волосков по отношению к деформированным варьирует от 0,6 до 32 и обычно больше 8% (Разумовская, 1967). Количество не окончивших свое развитие ИТ может составлять от 10 до 80%. Таким образом, удачная инфекция, заканчивающаяся образованием клубенька, происходит не так часто, как можно было бы ожидать. Гибель ИТ при совместимом симбиозе подтверждена в опытах Vasse et al. (1993), показавших накопление в ИТ фенольных соединений, PR-белков, фитоалексинов и других соединений, характерных для сверхчувствительной реакции (СЧР) при фитопатогенной атаке. Так, один из таких PR-белков – кислая хитиназа некротических клеток, гидролизует Nod-фактор в ИТ (Vasse et al., 1993).

Предполагается, что возникновение СЧР при ризобиальной инфекции – это часть механизма регуляции числа успешных инфекций и образовавшихся клубеньков по типу обратной связи. Другим фактором регуляции ризобиальной инфекции могут быть растительные АФК и другие сигнальные молекулы (ионы) (O_2^- , NO, Ca^{2+}), играющие важную роль при патогенезе (Doke, 1983; Аверьянов и др., 1991; Глянко и др., 2007; Глянко, 2015а). Однако необходимо отметить, что при нормальных условиях растение стремится ограничить инфекцию, но не стремится полностью заблокировать вторжение ризобий в корень (Vasse et al., 1993). Это можно объяснить тем, что при увеличении инфекционной нагрузки на растение ризобии могут в сильной степени подавлять развитие защитно-регуляторных функций растения-хозяина, что приводит к избыточному образованию малоэффективных клубеньков (Проворов, 1996).

Как уже отмечалось, на начальных стадиях ризобиального инфицирования защитные реакции растения активируются, но затем быстро супрессируются. Установлено, что у сои инокуляция *Bradyrhizobium japonicum* при экспозиции 12 ч вызывала у растения сильную индукцию генов, связанных с защитными функциями. Однако спустя 24 ч активация защитных генов сменялась супрессией этих генов (Libault et al., 2010). Подобная закономерность выявлена и в других работах. Так, при симбиозе люцерны с *Sinorhizobium meliloti* наблюдалась экспрессия (up-регуляция) защитных генов через 1 ч после инокуляции и депрессия их синтеза (down-регуляция) через 6 ч после инокуляции (Lohar et al., 2006). Эти дан-

ные подтверждаются результатами других работ (Kouchi et al., 2004; Lopes-Gomez et al., 2012).

Одним из основных механизмов защиты растений от инфекции является усиление генерации АФК. Этот механизм хорошо изучен при патогенезе (Мерзляк, 1989; Apel, Hirt, 2004; Carol, Dolan 2006). При инфицировании бобовых симбиотическими бактериями подобный механизм также функционирует (Васильева и др., 2001; Santos et al., 2001; D'Haese et al., 2003; Глянко и др., 2007) и может включаться на начальных этапах инфицирования и в течение инфекции (Vasse et al., 1993; Mehdy, 1994). В опытах Васильевой с соавт. (2005а) спустя 24 и 48 ч после инокуляции проростков гороха ризобиями содержание H_2O_2 в корнях уменьшалось на 43 и 48%, а в эпикотиле увеличивалось на 170 и 221% соответственно. Те же самые закономерности были обнаружены и при изучении содержания в корнях и эпикотилях гороха супероксидного радикала ($O_2^{\cdot-}$) (Васильева и др., 2001). Эти данные говорят о том, что ризобии по-разному влияют на синтез АФК в органах, воспринимающих клубеньковые бактерии (корень) и не воспринимающих их (эпикотиль).

Есть результаты, доказывающие необходимость пероксида водорода и для ризобияльной инфекции. Так, мутант люцерны в симбиозе с *S. meliloti* характеризуется сильной деградацией H_2O_2 вследствие сверхэкспрессии гена каталазы, в результате чего изменяются инфекционные свойства и наблюдается снижение количества клубеньков (Jamet et al., 2007). Но в то же время ризобияльная инфекция способствует снижению содержания H_2O_2 и салициловой кислоты в корнях этиолированных проростков гороха (Глянко и др., 2005а). По данным Lohar et al. (2007), переходящее уменьшение АФК в корнях люцерны способствует деформации корневого волоска при инокуляции *Sinorhizobium meliloti*. В ряде работ показана положительная роль НАДФН-оксидазы, участвующей в генерации H_2O_2 , в становлении бобово-ризобияльного симбиоза (Marino et al., 2011; Montiel et al., 2012; Arthikala et al., 2014). Не исключено, что АФК и другие противомикробные соединения растения-хозяина участвуют в авторегулировании нодуляции путем блокирования в определенные временные этапы процессов ризобияльной инфекции (Saeki, 2011). Таким образом, эти результаты указывают, что генетически заложенные функции устойчивости у бобового растения активизируются в течение самых ранних стадий ризобияльной ин-

фекции и в дальнейшем при формировании симбиоза. Иначе говоря, бактериальные симбиотические азотфиксаторы на ранних этапах взаимодействия проявляют свойства патогенов, что позволяет им проникать в растение путем подавления его иммунитета (Kambara et al., 2009; Kereszt et al., 2011; Okazaki et al., 2013).

Следовательно, бобовое растение в одних случаях смягчает защитную реакцию, а в других усиливает. Можно сделать заключение, что при ризобияльной инфекции система бактериальной защиты ослабляется только в корневой зоне (наиболее чувствительной к ризобиям) и не теряет своей эффективности в других органах. В этом случае можно говорить о локальной и системной регуляции устойчивости растения-хозяина к ризобияльной инфекции. В случае локальной инфекции (например, в зоне корня, наиболее чувствительной к инфекции) бактерии-ризобии подавляют защитные реакции растения-хозяина с помощью различных механизмов, в том числе характерных для фитопатогенов, например, с помощью поверхностных экзополисахаридов или Nod-факторов (Mithofer, 2002; Lin et al., 2013; Lehman, Long, 2013). Во втором случае, некоторые ризобии (например, *Sinorhizobium fredii*, *Mesorhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum*) используют, как и фитопатогенные бактерии, секреторные системы Т3SS или Т4SS для доставки эффекторных белков в растительные клетки, которые могут узнаваться внутриклеточными доменами мембранных RLK, вызывая инициацию защитной системы ETI, что передается от клетки к клетке и увеличивает устойчивость клеток к инвазии.

Одним из таких белков является NopL (nodulation outer protein L), который доставляется в растительную клетку секреторной системой Т3SS и блокирует защитные реакции, в частности, транскрипцию *PR*-генов и модифицирует активность растительных киназ (Bartsev et al., 2004; Okazaki et al., 2013). Этот белок выявлен у *Mesorhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum* и у широкоспецифического штамма NGR234 (*Sinorhizobium fredii*).

N_2 -фиксирующие бактерии на ранних этапах взаимодействия проявляют свойства фитопатогенов, используя факторы вирулентности – эффекторные соединения (Tamrakaki, 2014). Например, нуклеотидциклазы играют существенную роль не только в регуляции механизмов их вирулентности, но и в процессах, связанных с ранними стадиями инфицирования и образованием клубеньков (Ample et al., 2003). Необходимо отметить, что в регуляции синтеза

ЭПС, вероятно, принимает участие цАМФ (циклический аденозинмонофосфат) (Lomovatskaya et al., 2015). Дефицитные по активности фермента аденилатциклазы (АЦ) штаммы *Rhizobium meliloti* отличались повышенным уровнем синтеза ЭПС, что отрицательно влияло на эффективность азотфиксации и способность люцерны формировать полноценные клубеньки (Bianchini et al., 1993). Предполагается, что АЦ участвует в трансдукции сигналов, индуцирующих нодуляцию.

Участие МТИ (PTI) в подавлении симбиоза было доказано в опытах с применением бактериального МАР-флагеллина (flg22) (Felix et al., 1999; Lopes-Gomez et al., 2012). Было показано, что обработка flg22 – активным эпитопом МАР, снижает реакцию *Lotus japonicus* на Nod-факторы и значительно уменьшает нодуляцию относительно контроля. Эти результаты могут свидетельствовать об уменьшении способности ризобий противостоять устойчивости, связанной с flg22. Дополнительно, экспрессия в растении флагеллин-чувствительного рецептора FLS2 резко уменьшает количество клубеньков у *Lotus japonicus* (Lopez-Gomez et al., 2012), что говорит об уменьшении защитных реакций в течение нодуляции. Подобно эффекту flg22 на бобово-ризобиальный симбиоз действуют гормоны защитной системы растений: салициловая кислота (Stacey et al., 2006; Peleg-Grosman et al., 2009), жасмоновая кислота и этилен (Penmetsa, Cook, 1997; Sun et al., 2006).

Таким образом, можно заключить, что иммунная система клеток бобового растения может препятствовать инвазии ризобий на самых ранних стадиях симбиотического взаимодействия, а также при определенных условиях в течение формирования и функционирования БРС, что подтверждает гипотезу о существовании многократных этапов подавления иммунитета растения в течение симбиотического процесса (Saeki, 2011; Verraban et al., 2015). По мнению Gourion et al. (2015), ризобиальная инфекция, сопровождаемая подавлением защитных реакций и «вторжением» совместимого ризобиального штамма в растительные клетки, была движущей силой, которая привела к ризобиальной хозяйской специфичности.

Роль ризобиальных полисахаридов в блокировании защитных реакций растения

Кроме паттернов и эффекторных белков, имеются другие бактериальные факторы, которые предотвращают защитные реакции растения в течение симбиотического процесса. Эти факторы часто не требуются непосредственно

для БРС. Например, клубеньки, полученные при инфекции мутантами *Bradyrhizobium japonicum*, индуцируют стрессовые реакции и имеют некротические повреждения (Gourion et al., 2009). Выяснено, что повреждения на клеточной поверхности клеток люцерны связаны с дефектом в синтезе ризобиальных экзополисахаридов (Mithofer, 2002; Lehman, Long, 2013). Доказана роль ризобиальных полисахаридов как антагонистов в отрицательном регулировании индукции защитных реакций (Mithofer, 2002; Lin et al., 2013). Олигополисахариды – компоненты клеточной поверхности бактерий, являются сигнальными молекулами при взаимоотношениях микробов с хозяином, включая и животных (Long, Staskawicz, 1993; Benhamou, 1996; Pellok et al., 2000). Показано, что экзополисахариды (EPS), липополисахариды (LPS) и циклические β-глюканы функционируют при формировании БРС. Опыты с различными ассоциациями ризобий и бобовых показали, что мутанты, дефектные в синтезе любого из этих углеводов, не способны к достаточному инфицированию хозяина или образованию эффективных азотфиксирующих клубеньков. Нарушения в симбиотическом взаимодействии в этом случае сопровождаются защитными реакциями растения (Finan et al., 1985; Niehaus et al., 1993; Dunlap et al., 1996; Campbell et al., 2002). По данным Lehman, Long (2013), EPS (succinoglycan, galactoglucan) из *Sinorhizobium meliloti* проявляют защитное действие против H₂O₂ в течение раннего симбиоза с люцерной. EPS из различных бактерий, включая *S. meliloti*, супрессируют устойчивость, связанную с МАР (MTI) (Aslam et al., 2008). Причина этого в том, что МТИ супрессируется из-за хелатирования EPS кальцием, который является важным клеточным сигналом, вовлеченным в МТИ (Aslam et al., 2008). Эти результаты позволяют говорить о существенной роли ризобиальных полисахаридов в нодуляционном процессе. По-видимому, они могут играть роль сигнальных молекул и супрессоров защитных реакций растения-хозяина.

Роль Nod-фактора в подавлении защитных систем растения

Самой первой реакцией ризобий на бобовое растение является продукция и секреция ими NFs, которые иницируют инфекционный процесс и индуцируют морфогенез клубенька. Ризобиальные гены, ответственные за NF-продукцию, не только активно транскрибируются после инфекции, но также остаются активными в зоне азотфиксации в клубеньках

ЗАЩИТНЫЕ СИСТЕМЫ БОБОВОГО РАСТЕНИЯ

Medicago truncatula (Roux et al., 2014). Это говорит о том, что NFs могут функционировать и после органогенеза клубенька.

Nod-фактор, представляющий собой липохитоолигосахарид с 3-6 остатками N-ацетил-D-глюкозамина, очевидно, является бактериальным МАР-соединением. У свободно живущих почвенных ризобий NFs не присутствуют и их синтез инициируется фенольными соединениями бобового растения, выделяемыми в ризосферу (Макарова, 2012). Олигосахаридная основа (скелет) Nod-факторов подобна грибному хитину, который является элиситором (МАР), вызывающим инициацию защитных механизмов растения. Установлено, что бобовые растения распознают липохитоолигосахариды (LCO) и хитоолигосахариды за счет того, что основной скелет NFs имеет модификации, различающиеся у разных видов ризобий длиной и степенью насыщенности боковых остатков жирных кислот и наличием радикалов – ацетила, сульфата, карбомила и др. (Gough, Cullimore, 2011). Боковые цепи NFs специфически взаимодействуют с растительным рецептором и этот молекулярный комплекс двух организмов осуществляет трансдукцию сигнала по пути мутуалистического взаимодействия (Gough, Cullimore, 2011). Сложная структура NFs определяет специфичность ризобий к бобовым растениям-хозяевам (Spaink, 1995). При этом полиспецифичность ризобий к растению-хозяину обусловлена разнообразием синтеза ими NFs. Примером широкой специфичности Nod-факторов является ризобиальный штамм NGR234, способный инфицировать и нодулировать более 112 видов бобовых растений, а также не бобовое растение *Parasponia andersonii* (Skorpił, Broughton, 2005). Растительные рецепторы (LysM RPKs) «признают» ризобиальные Nod-факторы, ингибируя МТИ-защитную систему путем неизвестного механизма и инициирует каскад реакций по формированию БРС (Liang et al., 2014). Это основное условие в определенных обстоятельствах может нарушаться, что приводит к включению механизмов защиты. Неожиданным является то, что Nod-факторы могут «узнаваться» и не бобовыми растениями (арабидопсисом, пшеницей, томатами) с помощью механизма, ведущего к сильному ингибированию защитной системы растений, связанной с МАР и инициируемой flg22 (Liang et al., 2013). Это еще раз подтверждает эволюционное развитие мутуалистических отношений – от патогенеза к симбиозу.

NFs, как полагали в течение долгого времени, обязательно требовались для БРС. Однако, как показали исследования последних лет, не все ризобии способны продуцировать NFs. Так, секвестирование генома двух ризобиальных симбионтов бобового растения *Aeschynomene afraspera* показало, что эти ризобиальные штаммы (из рода *Bradyrhizobium*) лишены канонических *nod*-генов NFs (Giraud et al., 2007). Это согласуется с тем, что соя и мутант *L. japonicus* способны нодулироваться и инфицироваться в отсутствие либо NFs, либо их рецепторов соответственно (Madsen et al., 2010; Okazaki et al., 2013). Кроме того, некоторые ризобии не требуют NFs для БРС; другие – используют ТЗСС или Т4СС. Часть ризобий, по видимому, использует и NFs и ТЗ/4СС. Эти данные подтверждают коэволюцию симбионта и растения-хозяина. Возможно, что патогенные взаимодействия с растением в течение эволюции характеризовались потерей некоторых особенностей патогенеза и ответ растения-хозяина на вторжение ризобий стал менее агрессивным (Gourion et al., 2015).

Было показано, что ТЗСС-эффектор из *Bradyrhizobium elkanii* мог заменять NF-рецептор у соответствующих мутантов сои (Okazaki et al., 2013). Поскольку ТЗСС-эффектор и NFs могут подавлять природную устойчивость, то в этом специфическом случае эффекторные белки *Rhizobium* (например, NopL) могут выполнить такую функцию в отсутствие NF-сигналинга (Bartsev et al., 2004).

Показано подавление активности МТИ с помощью высоких концентраций NFs (Liang et al., 2013). Эта супрессия была независимой от нодуляционного сигнального пути, так как наблюдалась у мутантов сои, неспособных экспрессировать NF-рецепторы (NFR1 и NFR5). Супрессия МТИ с помощью NFs была обнаружена у бобовых и у не бобовых растений (томаты, пшеница, арабидопсис). NFs супрессия МТИ позволяет предполагать, что использование LCO первоначально играло роль у патогенов, а в процессе эволюции адаптировалась к поддержанию симбиотической инфекции (Liang et al., 2013).

Следует отметить, что Nod-факторы инактивируются хитиназами и способны индуцировать активность гидролазы, что подтверждает гипотезу о том, что инактивация Nod-фактора является существенным звеном в симбиотическом сигналинге (Stahelin et al., 1995). Следует заметить, что инициация механизмов защиты растения высокими дозами Nod-

факторов (10^{-6} - 10^{-9} М) в *Rhizobium*-инфицированных корнях может быть частью механизма с помощью которого нодуляция регулируется по принципу обратной связи, а именно, путем включения или отключения защитных реакций растения разными концентрациями NFs (Buffard et al., 1996).

Ризобии могут влиять на МТИ через NF-связанную супрессию МТИ путем ингибирования защитных реакций внеклеточным хелатированием кальцием бактериальных экзополисахаридов или ингибированием продукции АФК с использованием бактериальных липополисахаридов (Aslam et al., 2008).

Известно, что в процессе БРС функционирует большое количество симбиоз-специфических растительных пептидов, сходных с антимикробными пептидами – эффекторами природной устойчивости. Например, бактериальный VasA-белок, вызывающий внутриклеточные заразные болезни у животных, также функционирует в бактериоидах, обеспечивая нормальную N_2 -фиксирующую способность ризобий путем подавления защитной системы клубеньков (Vergrah et al., 2014). Это говорит о том, что вирулентный фактор патогенеза и эффекторы природной устойчивости используются в симбиозе в пользу макросимбионта.

Таким образом, результаты исследований последних лет свидетельствуют о разных функциях ризобиальных Nod-факторов. Кроме основной функции, как MAMP-паттерна, взаимодействовать с растительным рецептором и запускать каскад симбиотических реакций, NFs могут участвовать в блокировании или активации защитной системы растительных клеток, в регуляции симбиотического сигналинга и, возможно, в других еще не известных реакциях, связанных с органогенезом клубенька и его функционированием.

Заключение

В эволюционном плане началом возникновения мутуалистического симбиоза очевидно являются изменения во взаимоотношениях микробов-патогенов и растений (Кругова, 2009). Этот тезис подтверждает первоначальный ответ растения-хозяина на инвазию ризобий включением защитных механизмов, аналогичных тем, которые функционируют при вторжении патогенов, а также в течение симбиотического взаимодействия организмов (Kouchi et al., 2004; Saeki, 2011).

В связи с этим, анализируя данные о защитной системе бобового растения, инфицированного ризобиями, следует прежде всего от-

метить особенность формирования БРС – это биохимическое соответствие Nod-факторов рецепторам растения-хозяина (LysM-рецептор или LRR-рецептор киназа). Взаимодействие этих соединений вызывает каскад реакций, ведущих к формированию БРС и блокированию защитных реакций. Однако, по данным Nakagawa et al. (2011), NFs не только активируют симбиотические гены у *Lotus japonicus*, но также могут транзитивно активировать гены защиты через рецепторы Nod-факторов. Следует отметить, что хитин-олигосахариды – структурные аналоги Nod-факторов, также могут индуцировать экспрессию симбиотических генов у *Lotus japonicus* через неопознанный рецептор хитина (Nakagawa et al., 2011).

Вторая особенность – это включение растением-хозяином механизмов защиты для регуляции ризобиальной инфекции с использованием двух ветвей растительной иммунной системы. Первая – МТИ, использует трансмембранные растительные PRRs и микробные или патогенные соединения MAMPs или PAMPs. Вторая ветвь ЕТИ – внутриклеточная, действует с использованием полиморфных NB-LRR – белковых продуктов растения и патогенных эффекторов. Эти природные защитные системы растений – МТИ и ЕТИ, могут действовать против ризобий, но блокируются ризобиями при успешном инфицировании. Ризобии могут проявлять себя как патогены на самых ранних этапах инвазии и, вероятно, для недопущения инфицирования других органов растения (например, эпикотилей гороха), когда включаются защитные системы растения. В этих случаях следует, по-видимому, различать локальную и системную устойчивость бобового растения против ризобиальной инфекции. Кроме того, защитные реакции бобового растения активируются при отклонении путей ризобиальной инфекции и нодуляции под влиянием различных факторов.

Общепризнано, что ризобиальные Nod-факторы – обязательные соединения для запуска сигнального каскада при формировании БРС (Giraud et al, 2007). Тем не менее, недавно установлено, что некоторые ризобии (*Bradyrhizobium*, штаммы ORS278, BTAi1) не имеют канонических *nodABC*-генов, которые требуются для синтеза NFs. Однако инокуляция ими бобовых растений из рода *Aeschynomene* не выявила различий в процессах нодуляции у *nod*-независимых и *nod*-зависимых растений этого рода (Bonaldi et al., 2011). Неожиданным является то, что Nod-факторы воспринимаются и не

бобовыми растениями (арабидопсисом, пшеницей, томатами) (Liang et al., 2013). Показано, что в этом случае наблюдается супрессия с МАР-связанного иммунитета растения. Найдено, что мутанты сои по Nod-факторному рецептору NFR1 или NFR5 были не способны индуцировать симбиотические функции (например экспрессию генов) в ответ на добавление Nod-фактора, но они (мутанты) остаются способными супрессировать МАР-защитную систему (Zeng et al., 2012; Liang et al., 2013).

Следовательно, бактериальные симбиотические азотфиксаторы на ранних этапах взаимодействия проявляют свойства патогенов, что позволяет им проникать в растение путем подавления его иммунитета (Kambara et al., 2009; Kereszt et al., 2011; Okazaki et al., 2013). Однако новые данные позволяют изменять сложившиеся представления о бобово-ризобиальном симбиозе. Так, Nod-факторы, обязательные для бобово-ризобиального симбиоза, были необязательны в некоторых других случаях. Например, хитин-олигосахариды – структурные аналоги Nod-факторов, могут активировать симбиотические гены у *Lotus japonicus* без участия рецепторов NFs, но, вероятно, с участием других рецепторов (Nakagawa et al., 2011). Подобно этому, NF-рецептор, вовлеченный в симбиоз на ранней стадии, был обнаружен функционирующим в течение патогенной инфекции (Kereszt et al., 2011). Поэтому, имеется достаточно оснований считать, что природный иммунитет растения против патогенов является решающим компонентом в установлении и поддержании бобово-ризобиального симбиоза.

Таким образом, имеющиеся результаты указывают, что генетически заложенные функции устойчивости у бобового растения активизируются в течение самых ранних стадий ризобиальной инфекции, а также при внутриклеточных стадиях формирования симбиоза. Следовательно, природная (врожденная) устойчивость бобового растения и, по-видимому, других N₂-фиксирующих растений, активно участвует в формировании и функционировании бобово-ризобиального симбиоза. Основным противодействующим фактором при этом являются ризобиальные NFs, которые запускают каскад симбиотических реакций и ингибируют активность защитных систем растения-хозяина, которые могли бы быть помехой в успешной инфекции ризобий. Следует также добавить, что разгадка физиологических, генетических, биохимических, молекулярных и других меха-

низмов мутуалистических взаимоотношений ризобий и бобовых растений – путь к созданию новых культурных растений, обладающих уникальной способностью фиксировать атмосферный азот.

ЛИТЕРАТУРА

- Аверьянов А.А. Активные формы кислорода и иммунитет растений // Успехи соврем. биологии. – 1991. – Т. 111, № 5. – С. 722-737.
- Васильева Г.Г., Глянько А.К., Миронова Н.В., Путилина Т.Е. Супероксидный анион-радикал и активность супероксиддисмутазы в проростках гороха с разной способностью к нодуляции при инокуляции клубеньковыми бактериями // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2005а. – Вип. 1(6). – С. 45-50.
- Васильева Г.Г., Глянько А.К., Миронова Н.В. Содержание пероксида водорода и активность каталазы при инокуляции клубеньковыми бактериями проростков гороха с разной способностью к нодуляции // Прикл. биохимия и микробиология. – 2005б. – Т. 41, № 6. – С. 621-625.
- Васильева Г.Г., Миронова Н.В., Глянько А.К., Шепотько Л.Н. Генерация супероксидных радикалов в проростках гороха при инокуляции азотфиксирующими бактериями разной совместимости // С.-х. биология. – 2001. – № 3. – С. 79-83.
- Глянько А.К., Макарова Л.Е., Васильева Г.Г., Миронова Н.В. Возможное участие перекиси водорода и салициловой кислоты в бобово-ризобиальном симбиозе // Изв. Российской АН. Сер. биологическая. – 2005. – Т. 32, № 3. – С. 300-305.
- Глянько А.К., Акимова Г.П., Соколова М.Г., Макарова Л.Е., Васильева Г.Г. Защитно-регуляторные механизмы при развитии бобово-ризобиального симбиоза // Прикл. биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 3. – С. 289-297.
- Глянько А.К. Сигнальные системы ризобий (*Rhizobiaceae*) и бобовых растений (*Fabaceae*) при формировании бобово-ризобиального симбиоза (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015а. – Т. 51, № 5. – С. 453-464.
- Глянько А.К. Фитогормоны и клубенькообразование у бобовых растений // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2015б. – Вип. 3 (36). – С. 6-19.
- Кругова Е.Д. Специфические стратегии клубеньковых и фитопатогенных бактерий при инфицировании растений // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 1. – С. 3-15.
- Макарова Л.Е. Физиологическое значение фенольных соединений при формировании бобово-ризобиального симбиоза на этапе преинфекции // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2012. – Вип. 2 (26). – С. 25-40.

- Мельникова Н.Н., Коць С.Я. Влияние бинарных композиций лектинов сои и гороха на формирование соево-ризобиального симбиоза // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2015. – Вип. 2 (35). – С. 64-71.
- Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники. Сер. «Физиология растений». – М.: ВИНТИ, 1989. – Т. 6. – 166 с.
- Молодченкова О.О., Адамовская В.Г. Лектины и защитные реакции растений // Вісн. Харків. Нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2014. – Вип. 1 (31). – С. 30-46.
- Проворов Н.А. Эволюция генетических систем симбиоза у клубеньковых бактерий // Генетика. – 1996. – Т. 32, № 8. – С. 1029-1040.
- Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза. – СПб: Инфорнавигатор, 2012. – 400 с.
- Разумовская З.Г. Процесс заражения растений клубеньковыми бактериями // Биологический азот и его роль в биологии. / Под ред. Е.Н. Мишустина – М.: Наука, 1967. – С. 64-76.
- Соколова М.Г. Физиологические особенности начальных этапов инфицирования корней гороха *Rhizobium leguminosarum* при разных температурах. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Иркутск, 2001. – 21 с.
- Шамрай С.Н. Иммунная система растений: базальный иммунитет // Цитология и генетика. – 2014. – Т. 48, № 4. – С. 67-82.
- Шафикова Т.Н., Омеличкина Ю.В. Молекулярно-генетические аспекты иммунитета растений к фитопатогенным бактериям и грибам // Физиология растений. – 2015. – Т. 62, № 5. – С. 611-627.
- Ampe F., Kiss E., Sabourdy F., Batut J. Transcriptome analysis of during symbiosis // Genome Biol. - 2003. – V. 4 (2): R15. Doi: 10.1186/gb-2003-4-2-r15.
- Arthikala M-K., Sanchez-Lopez R., Nova N., Santana O., Cardenas L., Quinto C. RbohB, a *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene, enhances symbiosome number, bacteroid size, and nitrogen fixation in nodules and impairs mycorrhizal colonization // New Phytol. – 2014. – V. 202. – P. 886-900.
- Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction // Annu. Rev. Plant Biol. – 2004. – V. 55. – P. 373-399.
- Aslam S.N., Newman M-A., Erbs G., Morrissey K.L., Chinchilla D., Boller T., Jensen T.T., De Castro C., Ierano T., Molinaro A., Jacson R.W., Knight M.P., Cooper R.M. Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation // Curr. Biol. – 2008. – V. 18. – P. 1078-1083.
- Baron C., Zambryski P.C. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding; variations of a common theme? // Annu. Rev. Genet. – 1995. – V. 29. – P. 107-129.
- Bartsev A.V., Deakin W.L., Bukli N.M., NcAlvin C.B., Stacey G., Malnoë P., Broughton W.L., Staehelin C. NopL, an effector protein of *Rhizobium* sp. NGR234, thwarts activation of plant defense reaction // Plant Physiol. – 2004. - V. 134. – P. 871-879.
- Beatly P.H., Good A.G. Future prospects for cereals that fix nitrogen // Science. – 2011. – V. 333. – P. 416-417.
- Benhamou N. Elicitor-induced plant defence pathways // Trend Plant Sci. – 1996. – V. 1. – P. 233-240.
- Berrabah F., Ratet P., Gourion B. Multiple steps control immunity during the intracellular accommodation of rhizobia // J. Exp. Bot. – 2015. – V. 66. – P. 1977-1985.
- Berrabah F., Bourcy M., Cayrel A., Eschstruth A., Mondy S., Ratet P., Gourion B. Growth conditions determine the *DNF2* requirement for symbiosis // PloS ONE. – 2014. – V. 9. – e91866. Doi: 10.1371/journal.pone.0091866.
- Bianchini G.M., Carricarte V.C., Flawia M.M., Sanchez-Rivas C. Isolation of adenylate cyclase mutant from *Rhizobium meliloti* deficient in nodulation // World J. Microbiol. Biotechnol. - 1993. – V. 9. – P.168-173.
- Bonaldi K., Gargani D., Prin Y., Fardoux J., Gully D., Nouwen N., Giraud E. Nodulation of *Aeschynomene afraspera* and *A. indica* by photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285: the nod-dependent versus the nod-independent symbiotic interaction // Mol. Plant-Microbe Interac. – 2011. – V. 24. – P. 1359-1371.
- Buffard D., Esnault R., Kondorosi A. Role of plant defence in alfalfa during symbiosis // Word J. Microbiol. Biotechnol. – 1996. – V. 12. – P. 175-188.
- Cambell G.R.O., Reuhs B., Walker G. Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolysaccharide core // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – V. 99. – P. 3938-3943.
- Carol R.J., Dolan L. The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs // J. Exp. Bot. – 2006. – V. 57. – P. 1829-1834.
- Djordjevic M.A., Gabriel D.W., Rolfe B.J. *Rhizobium* – the refined parasite avoid the host response? // Annu. Rev. Phytopathol. – 1987. – V. 25. – P. 145-168.
- Doke N. Involment of superoxides anions generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components // Physiol. Plant Pathol. – 1983. – V. 23. – P. 345-357.
- D'Haese W., De Rycke R., Mathis R., Goomachtig S., Pagnotta S., Verplancke C., Capoen W., Holsters M. Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base nodulation of a semiaquatic

ЗАЩИТНЫЕ СИСТЕМЫ БОБОВОГО РАСТЕНИЯ

- legume // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – V. 100. – P. 11789-11794.
- Deakin W.J., Broughton W.J. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems // Nat. Rev. Microbiol. – 2009. – V. 7. – P. 312-320.
- Dunlap J., Minami E., Bhagwat A.A., Keister D.L., Stacey G. Nodule development induced by mutants of *Bradyrhizobium japonicum* defective in cyclic β -glucan synthesis // Mol. Plant-Microbe Interac. – 1996. – V. 7. – P. 546-555.
- Ferguson B.J., Indrasumunar A., Hayashi S., Lin M-H., Lin Y-H., Reid D.E., Gresshoff P.M. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation // J. Integr. Plant Biol. – 2010. – V.52. – P. 61-76.
- Felix G., Duran J.D., Volko S., Boller T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin // Plant J. – 1999. – V. 18. – P. 265-276.
- Finan T.M., Hirsch A.M., Leigh J.A., Johansen E., Kuldau G.A., Deegan S., Walker G.C., Signer E. Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation // Cell. – 1985. – V. 40. – P. 869-877.
- Flor H.H. Inheritance of reaction to rust in flax // J. Agric. Res. – 1947. – V. 74. – P. 241-262.
- Giraud E., Moulin L., Vallenet D., Barbe V., Cytryn E., Avarre J.C. Legumes symbioses: absence of *Nod* genes in photosynthetic *Bradyrhizobia* // Science. – 2007. – V. 316. – P. 1307-1312.
- Gourion B., Berrabah F., Ratet P., Stacey G. *Rhizobium*-legume symbioses: the crucial role of plant immunity // Trends Plant Sci. – 2015. – V. 20. – P. 186-194.
- Gough C., Jacquet C. Nod factor perception protein carries weight in biotic interaction // Trends Plant Sci. – 2013. – V. 18. – P. 566-574.
- Gough C., Cullimore J. Lipochitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions // Mol. Plant-Microbe Interac. – 2011. – V. 24. – P. 867-878.
- Gong Z., Zhu J., Yu G., Zou H. Disruption of *nifA* gene influences multiple cellular processes in *Sinorhizobium meliloti* // J. Genet. Genomics. – 2007. – V. 34. – P. 783-789.
- Hadri A.E., Spaink H.P., Bisseling T., Brewin N.J. Diversity of root nodulation and rhizobial infection process / The *Rhizobiaceae* / Eds. H.P. Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas. – Dordrecht: Kluwer Acad. Press, 1998. – P. 347-360.
- Hirsch A.M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation // Curr. Opin. Plant Biol. – 1999. – V. 2. – P. 320-326.
- Jamet A., Mandon K., Puppo A., Herouart D. H_2O_2 is required for optimal establishment of the *Medicago sativa* / *Sinorhizobium meliloti* symbiosis // J. Bacteriol. – 2007. – V. 189. – P. 8741-8745.
- Jeandroz S., Lamotte O., Astier J., Rasul S., Trapet P., Besson-Bard A., Bourque S., Nicolas-Frances V., Berkowitz G.A., Wendehenne D. There's more to the picture than meets the eye: nitric cross talk with Ca^{2+} signaling // Plant Physiol. – 2013. – V. 163. – P. 459-470.
- Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E., Walker G.C. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model // Nature Rev. Microbiol. – 2007. – V. 5. – P. 619-633.
- Jones K.M., Sharopova N., Lohar D.P., Zhang J.Q., VandenBosch K.F. Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – V. 105. – P. 704-709.
- Jones J.D., Dangl J.L. The plant immune system // Nature. – 2006. – V. 444. – P. 323-329.
- Kambara K., Ardisson S., Kobayashi H., Saad M.M., Schumpp O., Broughton W.J., Deakin W.J. Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis // Mol. Microbiol. – 2009. – V. 71. – P. 92-106.
- Katagiri F., Tsuda K. Understanding the plant immune system // Mol. Plant-Microbe Interac. – 2010. – V. 23. – P. 1531-1536.
- Kereszt A., Mergaert P., Maroti G., Kondorosi E. Innate immunity effectors and virulence factors in symbiosis // Curr. Opin. Microbiol. – 2011. – V. 14. – P. 76-81.
- Kouchi H., Shimomura K., Hata S., Hirota A., Wu G.J., Kumagai H., Taabata S. Large-scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume, *Lotus japonicus* // DNA Res. – 2004. – V. 11. – P. 263-274.
- Lehman A.P., Long S.R. Exopolysaccharides from *Sinorhizobium meliloti* can protect against H_2O_2 -dependent damage // J. Bacteriol. – 2013. – V. 195. – P. 5362-5369.
- Liang Y., Cao Y., Tanaka K., Thibivilliers S., Wan J., Choi J., Ho Kang C., Qiu J., Stacey G. Nonlegumes respond to rhizobial Nod factors by suppressing the innate immune response // Science. – 2013. – V. 341. – P. 1384-1387.
- Libault M., Farmer A., Brechenmacher L., Drnevich J., Landley R.L., Bilgin D.D., Radwan O., Neece D.J., Clough S.J., May G.D., Stacey G. Complete transcriptome of the soybean root hair cell, a single-cell model, and its alteration in response to *Bradyrhizobium japonicum* infection // Plant Physiol. – 2010. – V. 152. – P. 541-552.
- Limpens E., Moling S., Hooivel G., Pereira P.A., Bisseling T., Becker J.D., Kuster H. Cell- and tissue-specific transcriptome analyses of *Medicago truncatula* root nodules // PloS ONE. – 2013. – V. 8 (2). – e64377. Doi: 10.1371/journal.pone. e64377.
- Lin C.T., Chen Y.C., Jinn T.R., Wu C.C., Hong Y.M., Wu W.H. Role of the cAMP-dependent carbon ca-

- tabolite repression in capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* // PLoS ONE. – 2013. – V. 8 (2). – e54430. Doi: 10.1371/journal.pone.0054430.
- Long S.R. Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis // Plant Physiol. – 2001. – V. 125. – P. 69-72.
- Long S.R., Staskawicz B.J. Prokaryotic plant parasites // Cell. – 1993. – V. 7. – P. 921-935.
- Lohar D.P., Sharopova N., Endre G., Penuela S., Samac D., Town C., Silverstein K.A.T., VandenBosch K.A. Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula* // Plant Physiol. – 2006. – V. 140. – P. 221-234.
- Lohar D.P., Haridas S., Gantt J.S., VandenBosch K.A. A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis // New Phytol. – 2007. – V. 173. – P. 39-49.
- Lopez-Gomez M., Sandal N., Stougaard J., Boller T. Interplay of flg22-induced defense responses and nodulation in *Lotus japonicus* // J. Exp. Bot. – 2012. – V. 63. – P. 393-401.
- Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Kuzakova O.V. From pathogens to mutualists: role the cAMP on their virulence // Yale Review of Education Sci. – 2015. – V. 6. – P. 522-539.
- Madsen L.H., Tirichine L., Jurkiewicz A., Sullivan J.T., Heckmann A.B., Bek A.S., Ronson C.W., James E.K., Stougaard J. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus* // Nat. Commun. – 2010. – V. 1: 10.
- Marino D., Andrio E., Danchin E.G.J., Oger E., Gucciardi S., Lambert A., Puppo A., Pauly N. A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning // New Phytol. – 2011. – V. 189. – P. 580-592.
- Mehdy M.C. Active oxygen species in plant defense against pathogens // Plant Physiol. – 1994. V. 105. – P. 467-472.
- Mithofer A. Suppression of plant defence in rhizobia-legume symbiosis // Trends Plant Sci. – 2002. – V. 7. – P. 440-444.
- Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. – 2002. – V. 7. – P. 405-410.
- Montiel J., Nava N., Garrdenas L., Sanchez-Lopez R., Arthikala M-K., Santana O., Sanchez F., Quinto C. A *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene is required for root infection by *Rhizobia* // Mol. Cell Physiol. – 2012. – V. 53. – P. 1751-1767.
- Murray J.D. Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes // Mol. Plant-Microbe Interac. – 2011. – V. 24. – P. 631-639.
- Nakagawa T., Kaku H., Shimoda Y., Sugiyama A., Shimamura M., Takanashi K., Yazaki K., Aoki T., Shibuya N., Kouchi H. From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor kinases are crucial for evolution of legume-*Rhizobium* symbiosis // Plant J. – 2011. – V. 65. – P. 169-180.
- Navarro-Gochicoa M.-T., Camut S., Timmers A.C.J., Niebel A., Herve C., Boutet E., Bono J.J., Imberly A., Cullimore J.V. Characterization of four lectin-like receptor kinases expressed in root of *Medicago truncatula*. Structure, location, regulation of expression, and potential role in the symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* // Plant Physiol. – 2003. – V. 133. – P. 1893-1910.
- Niehaus K., Kapp D., Pühler A. Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by a exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant // Planta. – 1993. – V. 190. – P. 415-425.
- Nutman P.S. Some observation on root-hair infection by nodule bacteria // J. Exp. Bot. – 1959. – V. 10. – P. 250-263.
- Okazaki S., Kaneko T., Sato S., Saeki K. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2013. – V. 110. – P. 17131-17136.
- Oldrout G.E.D., Murray J.D., Poole P.S., Downie J.A. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis // Annu. Rev. Genet. – 2011. – V. 45. – P. 119-144.
- Peleg-Grossman S., Golani Y., Kaye Y., Melamed-Book N. NPR1 protein regulates pathogenic and symbiotic interactions between *Rhizobium* and legumes and nonlegumes // PLoS ONE. – 2009. – V. 4. – e8399. Doi: 10.1371/journal.pone.008399.
- Pellock B.J., Cheng H.P., Walker G.C. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides // J. Bacteriol. – 2000. – V. 182. – P. 4310-4318.
- Penmetsa R.V., Cook D.R. A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont // Science. – 1997. – V. 275. – P. 527-530.
- Roux B., Rodde N., Jardinaud M-F., Timmers T., Sauviac L., Cottret L., Carrere S., Sallet E., Courcelle E., Moreau S., Debelle F., Capela D., de Carvalho F., Gouzy J., Bruand C., James P. An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing // Plant J. – 2014. – V. 77. – P. 817-837.
- Saeki K. Rhizobial measures to evade host defense strategies and endogenous threats to persistent symbiotic nitrogen fixation: a focus on two legume-rhizobium model systems // Cellular Mol. Life Sci. – 2011. – V. 68. – P. 1327-1339.
- Santos R., Herouart D., Sigaud S., Touati D., Puppo A. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction // Mol. Plant-Microbe Interac. – 2001. – V. 14. – P. 86-89.

ЗАЩИТНЫЕ СИСТЕМЫ БОБОВОГО РАСТЕНИЯ

- Stahelin C., Schultze M., Kondorosi E., Kondirosi A.* Lipooligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium meliloti* induce their rapid degradation by the host plant alfalfa // *Plant Physiol.* – 1995. – V. 108. – P. 1607-1614.
- Stacey G., McAlvin C.B., Kim S.Y., Olivares J., Soto M.J.* Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141. – P. 1473-1481.
- Stuart L.M., Paquette N., Boyer L.* Effector-triggered versus pattern-triggered immunity: how animals sense pathogens // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – V. 13. – P. 199-206.
- Skorpil P., Broughton W.J.* Molecular interaction between *Rhizobium* and Legumes // *Molecular Basis of Symbiosis* / Ed. J. Overmann. – Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. – P. 143-165.
- Spaink H.P.* The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the ins and outs of symbiogenesis // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 1995. – V. 33. – P. 345-368.
- Sun J., Cardoza V., Mitchell D.M., Oldroyd G., Harris J.M.* Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation // *Plant J.* – 2006. – V. 46. – P. 961-970.
- Tampakaki A.* Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria // *Front. Plant Sci.* – 2014. – V. 27 (5); 114. Doi: 10.3389/fpls.2014.00114.
- Vasse J., de Billy F., Truchet J.* Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti* – alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction // *Plant J.* – 1993. – V. 4. – P. 555-566.
- Yang S., Tang F., Gao M., Krishnan H.B., Shu H.* R gene-controlled host specificity in the legume-rhizobia symbiosis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2010. – V. 107. – P. 18735-18740.
- Zeng L., Velasquez A., Munkvold K., Zhang J., Martin G.* A tomato LysM receptor-like kinase promotes immunity and its kinase activity is inhibited by AvrPtoB // *Plant J.* – 2012. – V. 69. – P. 92-103.
- Zipfel C.* Plant pattern-recognition receptors // *Trends Immunol.* – 2014. – V. 35. – P. 345-351.

Поступила в редакцию
17.02.2016 г.

DEFENSIVE MECHANISMS OF RHIZOBIA-INFECTED LEGUME PLANTS

A. K. Glyan'ko

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
Siberian Division of the Russian Academy of Sciences
(Irkutsk, Russia)*

E-mail: akglyanko@sifibr.irk.ru

The paper reviews the data on defensive mechanisms of a legume subjected to nodular bacteria (rhizobia) infection. The hypothesis of participation of plant defensive systems MTI (MAMP-triggered immunity) and ETI (effector-triggered immunity) in counteracting rhizobia invasion as probable pathogenic agents in root tissues at the initial stages of organisms interaction, and later on as a regulating mechanism of root rhizobial infection is substantiated. The plant ability to block rhizobia invasion into plant's other organs (for instance, epicotyls), which are not subjected to infecting by rhizobium is stated. With this in view, a notion of legume local and systemic resistance to rhizobial infection is proposed. In the former case rhizobia suppress immune response of plant root cells, in the latter they enhance plant resistance to rhizobia. Detailed consideration is given to the role of Nod-factors of rhizobia (NFs) and interacting plant receptors in blocking root defensive reactions and triggering signal cascade within nodules organogenesis. New facts related to NFs role in formation of rhizobial-legume symbiosis are described: lack of canonic *nodABC*-genes required for NFs synthesis in some rhizobia (*Bradyrhizobium*); perception of Nod-factor by non-legumes (arabidopsis, wheat, tomato), which leads to suppression of plant MTI-defensive systems. The role of bacterial surface exopolysaccharides in root defensive systems suppression against rhizobia is discussed. It is concluded that natural (inherent) legume cell immunity (except specific NFs) actively participates in formation of rhizobial-legume symbiosis.

Key words: *Rhizobium*, legumes, rhizobial-legume symbiosis, Nod-factors, plant MTI/ETI-defensive mechanisms, bacterial T3/4SS-secretion mechanisms, LysM/LRR-domain kinase-plant receptors

ГЛЯНЬКО

**ЗАХИСНІ СИСТЕМИ БОБОВИХ РОСЛИН
ПРИ ІНФІКУВАННІ РИЗОБІЯМИ**

А. К. Глянько

*Федеральна державна бюджетна установа науки
Сибірський інститут фізіології і біохімії рослин
Сибірського відділення Російської академії наук
(Іркутськ, Росія)
E-mail: akglyanko@sifibr.irk.ru*

Узагальнено дані про захисні механізми бобової рослини, інфікованої бульбочковими бактеріями (ризобіями). Наводяться докази на користь тези про участь захисних систем рослини МТІ (MAMP-triggered immunity) і ЕТІ (effector-triggered immunity) у протидії інвазії ризобій як можливих патогенів в тканини кореня на початкових етапах взаємодії організмів, а також у подальшому, як регулюючого механізму ризобіального інфікування коренів. Відзначається можливість блокування рослиною інвазії ризобій в інші органи рослини (наприклад, епікотилі), що не піддаються інфікуванню бульбочковими бактеріями. У зв'язку з цим пропонується ввести поняття локальної та системної стійкості бобової рослини до ризобіальної інфекції. У першому випадку ризобії пригнічують імунну відповідь клітин кореня рослини, у другому – підсилюють стійкість рослини до ризобії. Докладно розглядається роль Nod-факторів ризобій (NFs) і рослинних рецепторів, що взаємодіють з ними, у блокуванні захисних реакцій кореня і запуску сигнального каскаду з органогенезу бульбочки. Відзначаються нові факти щодо ролі NFs у формуванні бобово-ризобіального симбіозу: відсутність у деяких ризобій (*Bradyrhizobium*) канонічних *nodABC*-генів, які потрібні для синтезу NFs; сприйняття Nod-фактора не бобовими рослинами (арабідопсисом, пшеницею, томатами), що веде до супресії МТІ-захисної системи у цих рослин. Обговорюється роль бактеріальних поверхневих екзополісахаридів в супресії захисної системи кореня проти ризобій. Зроблено висновок, що природний (уроджений) імунітет клітин бобової рослини (крім специфічних NFs) бере активну участь у формуванні та функціонуванні бобово-ризобіального симбіозу.

Ключові слова: *Rhizobium*, бобові рослини, бобово-ризобіальних симбіоз, Nod-фактори, МТІ/ЕТІ-захисні системи рослини, T3/4SS-секреційні системи бактерій, LysM/LRR-домен RLKs-рослинні рецептори