

<https://doi.org/10.17816/ecogen17133-41>

РОЛЬ УНИВЕРСАЛЬНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ DELLA-БЕЛКОВ В КОНТРОЛЕ СИМБИОЗОВ

© А.В. Долгих, Е.А. Долгих

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург

Для цитирования: Долгих А.В., Долгих Е.А. Роль универсальных регуляторов роста и развития растений DELLA-белков в контроле симбиозов // Экологическая генетика. — 2019. — Т. 17. — № 1. — С. 33–41. <https://doi.org/10.17816/ecogen17133-41>.

Поступила: 29.11.2018

Одобрена: 18.02.2019

Принята: 25.03.2019

Универсальными участниками сигнальных путей, координирующими процессы роста и развития растений, являются регуляторы гиббереллинового ответа DELLA-белки. Эта регуляция обеспечивается путем интеграции внешних воздействий, а также внутренних сигналов, таких как изменение в уровне фитогормонов и вторичных мессенджеров. Поскольку DELLA-белки чрезвычайно чувствительны к повышению или же снижению эндогенного уровня гибберелловой кислоты (ГК), их прямое взаимодействие с транскрипционными факторами модулирует активность последних, а следовательно, и уровень экспрессии генов-мишеней в ответ на внешние воздействия, вызывающие изменения в уровне ГК. Одна из наиболее важных функций, которые выполняют DELLA-белки, связана с их участием в регуляции развития симбиозов растений с азотфиксирующими клубеньковыми бактериями и грибами арбускулярной микоризы. Однако молекулярные механизмы влияния DELLA-белков на развитие симбиозов остаются малоизученными. В обзоре проведен анализ классических и современных данных о функционировании DELLA-белков у растений.

Ключевые слова: DELLA-белки; рост и развитие; бобово-ризобиальный симбиоз; транскрипционные факторы.

THE ROLE OF UNIVERSAL REGULATORS OF PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT THE DELLA PROTEINS IN THE CONTROL OF SYMBIOSIS

© A.V. Dolgikh, E.A. Dolgikh

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia

For citation: Dolgikh AV, Dolgikh EA.

The role of universal regulators of plant growth and development the DELLA proteins in the control of symbiosis. *Ecological genetics*. 2019;17(1):33-41. <https://doi.org/10.17816/ecogen17133-41>.

Received: 29.11.2018

Revised: 18.02.2019

Accepted: 25.03.2019

The regulators of the gibberellin response, the DELLA proteins, are universal participants of signaling pathways that coordinate the processes of plant growth and development. This regulation is provided by the integration of external effect, as well as internal signals, such as a level of phytohormones and secondary messengers. Since DELLA proteins are extremely sensitive to increasing or decreasing of the gibberellic acid (GA) endogenous level, their direct interaction with transcription factors modulates the activity of the latter, and, consequently, the level of expression of target genes in response to external signals causing changes in the level of GA. However, the molecular mechanisms of the effect of DELLA proteins on the development of symbiosis remain poorly understood. The review analyzes classical and modern data on the functioning of DELLA proteins in plants.

Keywords: DELLA proteins; growth and development; symbiosis; legume-rhizobial symbiosis; transcription factors.

ВВЕДЕНИЕ

Способность растений своевременно реагировать на изменение внешних условий среды лежит в основе их выживания. Однако такая быстрая реакция требует наличия универсальных регуляторов, которые способны своевременно воспринимать и преобразовывать поступающую информацию. В настоящее время накапливается все больше данных о том, что универсальными участниками сигнальных путей, координирующими процессы роста и развития растений, являются регуляторы гиббереллинового ответа DELLA-белки. DELLA составляют одно из подсемейств GRAS-транскрипционных факторов, при этом GRAS-домен был

назван по имени первых трех открытых GRAS-транскрипционных факторов GA INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1-3 (RGA) и SCARECROW (SCR) у *Arabidopsis thaliana* [1]. Два из них, а именно GAI и RGA, являются DELLA-белками. Впоследствии были обнаружены другие представители подсемейства, в частности, у арабидопсиса известно пять DELLA-белков, и, помимо RGA и GAI, к ним относятся также RGA-LIKE1 (RGL1), RGL2 и RGL3 [2]. Свое название DELLA-белки получили благодаря наличию на N-конце особой последовательности аминокислот (DELLA-домена), консервативной для всех высших растений. На N-конце также присутствует

VHYNP-домен, и вместе с DELLA-доменом они отвечают за связывание с активированным рецептором к гиббереллинам (GA INSENSITIVE DWARF1, *GID1*). На C-конце DELLA-белков, соответственно, присутствует GRAS-домен, включающий несколько консервативных для GRAS-семейства мотивов (LHRI, VHID, LHRII, PFYRE и SAW), и сигнал ядерной локализации [3, 4]. GRAS-домен отвечает за такие функции GRAS-белков, как перемещение из клетки в клетку и взаимодействие с другими транскрипционными факторами. В белок-белковых взаимодействиях важнейшую роль играют LHR-мотивы GRAS-домена.

В связи с отсутствием у DELLA-белков ДНК-связывающего домена они регулируют транскрипцию двумя путями: через взаимодействие непосредственно с ДНК-связывающим доменом транскрипционного фактора, что ингибирует его влияние на экспрессию гена-мишени (ингибирующий эффект), или же через взаимодействие с транскрипционным фактором в качестве коактиватора, что, в свою очередь, индуцирует транскрипцию (активирующий эффект) [5]. Число транскрипционных факторов, регулируемых DELLA-белками, по некоторым оценкам, составляет более ста [6].

DELLA-БЕЛКИ – НЕГАТИВНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ГИББЕРЕЛЛИНОВОГО ОТВЕТА У РАСТЕНИЙ

Гиббереллины представляют собой фитогормоны, регулирующие процессы роста и развития на протяжении всего жизненного цикла растения, включая клеточное деление и элонгацию, рост побега и корня, а также цветение, развитие плода и созревание семян [7]. Большинство гиббереллинов являются кислотами, и поэтому принято обозначение ГК (гибберелловая кислота). Первоначально DELLA-белки рассматривали как репрессоры роста растений. Несколько позже было установлено, что DELLA-белки служат негативными регуляторами генов, экспрессия которых активируется ГК [4].

Повышение уровня ГК и ее связывание с рецептором *GID1* вызывает деградацию DELLA-белков, в основе которой лежит узнавание компонентами сигнального пути F-box белками (*GID2* в рисе *Oryza sativa* и SLEEPY в *A. thaliana*) DELLA-белков, что индуцирует сборку SCF E3 убиквитин-лигазного комплекса и последующую деградацию в 26S протеасоме [8]. Деградация DELLA-белков подавляет их репрессорное действие и, возможно, освобождает из комплекса рецептор *GID1*, который может участвовать во взаимодействии с другими молекулами DELLA-белков [9]. При этом некоторые DELLA-белки оказываются менее чувствительны к разрушению под влиянием ГК, чем другие [10, 11].

Исследования показали, что ГК вовлечена и в ответ растений на действие различных биотических и абиотических стрессовых факторов. Эндогенный уровень ГК,

по-видимому, зависит от таких внешних сигналов, как уровень освещенности и температура, а также регулируется различными фитогормонами [12]. Поскольку DELLA-белки чрезвычайно чувствительны к повышению или же снижению эндогенного уровня ГК, их прямое взаимодействие с транскрипционными факторами модулирует активность последних, а следовательно, и уровень экспрессии генов-мишеней в ответ на внешние воздействия, вызывающие изменения в уровне ГК.

Следует также отметить, что регуляция метаболизма с участием ГК может осуществляться, по крайней мере частично, независимо от DELLA-белков [13]. Например, повышение концентрации кальция в цитозоле при обработке ГК наблюдается уже через две минуты после обработки, а уровень DELLA-белков вследствие их деградации существенно снижается лишь через 5–10 минут [14], поэтому процессы, происходящие в цитозоле в первые минуты в ответ на обработку ГК, не могут контролироваться DELLA-белками.

Комплексный анализ генов-мишеней для DELLA-белков показал, что помимо ответа на изменение уровня ГК в связи с различными внешними воздействиями DELLA-белки также необходимы для поддержания гомеостаза ГК. В нескольких работах было продемонстрировано, что в мутантах *della*-уровень экспрессии генов, ответственных за биосинтез ГК, значительно снижен [15, 16]. Однако то, что DELLA-белки не имеют ДНК-связывающего домена и их влияние на биосинтез ГК осуществляется посредством связывания с транскрипционными факторами, указывает на наличие таких регуляторов, но их поиск представляет сложную задачу. Тем не менее установлено, что в контроле биосинтеза ГК антагонистом DELLA-белка может быть белок SCARECROW-LIKE3 [17].

Существует ряд работ, в которых показано, что гены биосинтеза ГК *Ga20ox* и *Ga3ox* находятся под непосредственным контролем DELLA-белков [18], при этом в некоторых более поздних исследованиях прямого влияния DELLA-белков выявлено не было [17]. Данные о воздействии DELLA-белков на гены распада ГК также неоднозначны. В результате анализа *della*-мутантов у гороха *Pisum sativum* L. было установлено значительное увеличение экспрессии гена *GA2ox*, контролирующего распад ГК, на ранних сроках развития проростков (6 дней) [16]. Однако у мутанта по гомологичным генам *DELLA* у родственного бобового растения *Medicago truncatula* существенной разницы в уровне экспрессии гена *GA2ox* по сравнению с диким типом в процессе развития растений обнаружено не было [15].

ЭВОЛЮЦИЯ КОМПЛЕКСА РЕЦЕПТОР *GID1* – DELLA

Появление сигнального пути, активируемого рецептором *GID1*, наиболее вероятно, произошло после отделения сосудистых растений от мхов. Рецептор *GID1*

и DELLA-подобные белки были обнаружены уже во мхах, однако для них не было выявлено ни прямого связывания рецептора с гормоном, ни влияния рецептора на DELLA-белки [19]. Первые функционально активные DELLA-белки появились, по-видимому, в плаунах, так как в *Selaginella moellendorffii* и *S. kraussiana* был обнаружен уже активный комплекс GID1 – DELLA [19]. При этом важно отметить, что в плаунах функции сигнального пути, активируемого ГК, по-видимому, отличаются от аналогичных в высших растениях, так как обработка ГК не стимулирует рост *Selaginella spp.* [20]. Истинные DELLA-белки были идентифицированы в голосеменных и покрытосеменных растениях [21].

В результате исследования геномов покрытосеменных растений было установлено, что у двудольных, в отличие от однодольных, гены, кодирующие DELLA-белки, часто дублированы и функции белков диверсифицированы. На основании филогенетического анализа было показано наличие двух клад DELLA-белков у двудольных растений. При этом число генов, кодирующих эти белки, не одинаково у таких таксономических групп, как *Asterids* и *Rosids*. Так, у *Rosids* таких видов, как *Populus*, *Pisum* и *Medicago*, а также у видов из семейства *Brassicaceae* обнаружены представители двух клад DELLA-белков. У *Asterids* же, например, в *Solanum lycopersicum* и *Latuca spp.* найдены только DELLA-белки, относящиеся к кладе 1. Отсутствие известных DELLA-белков, относящихся к кладе 2 у *Asterids*, вероятно, может быть обусловлено неполными данными по анализу геномов этих видов. Однако у мутантов *S. lycopersicum* (*Asterids*) по единственному гену *DELLA* выявлены нарушения, характерные для множественных мутантов *della* у *Rosids* [22].

Для DELLA-белков характерна функциональная избыточность, и они вполне могут быть взаимозаменяемы. Например, для двух DELLA-белков арабидопсиса RGA и RGL была показана возможность функциональной взаимозаменяемости. Ранее было установлено, что ген *RGA* вовлечен в регуляцию метаболизма ГК в тех органах, где *RGL* в норме не экспрессируется (гипокотиль, листья, побег). В мутанте *rga* наблюдали снижение экспрессии генов биосинтеза ГК (*GA20ox1*, *GA20ox2* и *GA20ox8*) [23]. Однако, когда в мутантных по гену *RGA* растениях ген *RGL* был экспрессирован под промоторм *RGA*, происходило восстановление функции гена. Эти данные свидетельствуют о том, что, по-видимому, функциональная диверсификация DELLA-белков определяется местом их синтеза и окружением, а не различиями в биохимической активности [22].

РОЛЬ DELLA-БЕЛКОВ В ИНТЕГРАЦИИ ДЕЙСТВИЙ ФИТОГОРМОНОВ

Регуляция процессов роста и развития органов растения требует четкой координации процессов проли-

ферации и дифференцировки. Эта регуляция обеспечивается путем интеграции внешних воздействий, а также внутренних сигналов, таких как изменение уровней фитогормонов и вторичных мессенджеров [24].

В настоящее время накоплены данные, подтверждающие, что DELLA-белки являются регуляторами, интегрирующими действие различных фитогормонов, и таким образом координируют регулируемые ими процессы. Еще в 1958 г. было показано, что удаление верхушки побега у *A. thaliana* ведет к нарушению роста корней и делает растение нечувствительным к воздействию ГК [25]. Однако при обработке ауксином места удаления верхушки рост корней восстанавливался, что свидетельствовало о том, что влияние верхушки побега на рост корней происходит посредством регуляции полярного транспорта ауксина от побега к корням. Это свидетельствует о том, что влияние этих гормонов (ГК и ауксина) однонаправленно. Вероятно, процесс деградации DELLA-белков под действием ГК сложнее, чем кажется на первый взгляд, и, по-видимому, может быть связан с действием ауксина.

В экспериментах на растениях *A. thaliana*, в корнях которых синтезировали DELLA-белки RGA, слитые с GFP (RGA-GFP), было продемонстрировано, что обработка ГК вызывает быстрое исчезновение меченого белка из ядер клеток корня. Однако у растений, у которых верхушка побега была удалена, даже спустя 4 часа после обработки ГК наблюдали детектируемый уровень RGA-GFP, хотя он был ниже, чем в контрольных необработанных растениях. При этом, если место удаления верхушки обрабатывали индолилуксусной кислотой (ИУК), происходило столь же быстрое исчезновение RGA-GFP, как и в случае с контрольным растением. Эти данные свидетельствуют о том, что вероятный механизм ауксинзависимого роста корней связан с усилением влияния ГК на разрушение DELLA-белков [26].

Обратный по действию на DELLA-белки эффект наблюдается при применении этилена. Известно, что фитогормон этилен ингибирует рост вегетативных органов растения. Однако, как оказалось, этот процесс может также зависеть от DELLA-белков, по крайней мере частично. При отсутствии в среде 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (АЦК) — предшественника биосинтеза этилена — длина корней у растений дикого типа и *della*-мутантов (*rga* и *gai*) была примерно одинакова. Вместе с тем при выращивании на среде с добавлением АЦК корни растений дикого типа были короче, чем у мутантов *rga* или *gai*, развивавшихся в тех же условиях (что свидетельствовало о нечувствительности мутантов к этилену). У двойного мутанта *rga gai* по двум DELLA-белкам RGA и GAI корни были даже длиннее, чем у одиночных мутантов *rga* и *gai* [27]. Исследования по обработке растений ГК, в корнях которых был синтезирован белок RGA-GFP, показали, что наблюдаемая обычно в данных условиях деградация

DELLA-белков значительно подавляется при добавлении этилена. Таким образом, влияние этилена на рост растений, по-видимому, опосредовано его воздействием на DELLA-белки, повышающем их стабильность [27]. При изучении механизмов влияния этилена было установлено, что они не связаны с повышением экспрессии генов, кодирующих DELLA-белки, но, вероятно, зависят от регулятора сигнального ответа на этилен *CTR1* (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1). В отсутствие этилена *CTR1* ингибирует экспрессию этиленрегулируемых генов. Однако при увеличении концентрации этилена действие репрессора подавляется [28]. В корнях, где экспрессия *CTR1* была подавлена путем введения конструкции для РНК-интерференции, в ответ на обработку ГК уровень *RGA-GFP* менялся мало, то есть в этих условиях DELLA-белки были устойчивы к обработке ГК. Наличие связи между действием этилена и ГК в регуляции роста растения показано и в других исследованиях [29, 30].

В контроле развития и поддержании размера апикальной меристемы корня существенную роль играют фитогормоны ауксин и цитокинин. В поддержании активности апикальной меристемы корня основное значение имеет ауксин, который стимулирует клеточные деления. В проксимальной части меристемы наблюдается переход клеток от деления к дифференцировке, это коррелирует со снижением градиента ауксина в данном участке корня. Цитокинин влияет на клеточную дифференцировку, подавляя стимулирующий эффект ауксина на деление клеток. Этот эффект осуществляется в результате взаимодействия регуляторов цитокининового и ауксинового ответа. В частности, у *Arabidopsis* регулятор цитокининового ответа В-типа, транскрипционный фактор *ARR1*, может индуцировать экспрессию гена репрессора ауксинового ответа *Aux/IAA* (*IAA3/SHY2*), который подавляет экспрессию генов *PIN*, кодирующих переносчики ауксина, что, таким образом, ингибирует транспорт ауксина [31, 32]. Известно, что в регуляции развития меристем важную роль играет также ГК, действие которой синергично действию ауксина. Данные последних лет свидетельствуют, что, вероятно, именно ГК выступает посредником влияния цитокинина и ауксина друг на друга, причем действие это опосредовано влиянием ГК на DELLA-белки. Установлено, что ГК обуславливает негативную регуляцию цитокининового ответа посредством влияния на *ARR1*. Действительно, при экзогенной обработке ГК уровень экспрессии *ARR1* в корнях значительно снижался. У мутанта *rga* (дефектного по DELLA-белку *RGA*), у которого влияние ГК конститутивно, уровень экспрессии *ARR1* и регулируемого им *SHY2* был также снижен, что позволяет полагать, что регуляция цитокининового ответа ГК связана с дестабилизацией DELLA-белков [31].

Оказалось также, что DELLA-белки участвуют и в непосредственной регуляции полярного транспорта

ауксина. В условиях недостатка ГК снижается количество переносчиков *PIN* в плазматической мембране (ПМ) клеток корня и повышается их перенос в вакуоли. При повышении уровня ГК происходит ингибирование переноса *PIN* в вакуоли и, как следствие, повышается содержание *PIN* в ПМ [33]. Оказалось, что у мутанта арабидопсиса, у которого с помощью РНК-интерференции были подавлены все пять известных для этого вида генов, кодирующих DELLA-белки, обработка высокими концентрациями ГК не приводила к увеличению содержания *PIN* в ПМ [34]. При этом обработка ингибитором биосинтеза ГК паклобутразолом вызывала снижение содержания *PIN* в ПМ [35]. Эти эксперименты демонстрируют, что ГК контролирует транспорт ауксина посредством переносчиков *PIN* через DELLA-белки. Известно, что в контроле переноса *PIN* могут участвовать регуляторы сборки тубулина префолдин (от англ. prefoldin), функция которых связана с регуляцией фолдинга элементов цитоскелета и их динамики при взаимодействии с DELLA-белками [36].

Таким образом, анализ исследований показал существование взаимодействий между сигнальными путями, активируемыми ГК, ауксином, цитокинином и этиленом. Природа этих взаимодействий пока до конца не ясна, однако появляется все больше данных о том, что DELLA-белки представляют собой важные регуляторы, контролирующие взаимодействие между фитогормонами.

УЧАСТИЕ DELLA-БЕЛКОВ В КОНТРОЛЕ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

Влияние DELLA-белков на интеграцию внутренних сигналов не ограничивается регуляцией фитогормональных взаимодействий, а включает также контроль за уровнем вторичных мессенджеров, таких как активные формы кислорода (АФК). Уровень АФК значительно повышается у растений при взаимодействии с фитопатогенами [37], а также под влиянием абиотических стрессовых факторов (например, при повышенной засоленности почвы и т. п.) [38].

Согласно данным последних лет ГК может влиять на уровень АФК, однако механизм этой регуляции стал более понятен после того, как появились данные о том, что в этом процессе участвуют DELLA-белки. В исследовании, проведенном на арабидопсисе, было показано, что DELLA-белки способствуют сохранению низкого уровня АФК у растений в условиях стресса и, таким образом, задерживают наступление клеточной смерти. В основе этого регуляторного механизма лежит способность DELLA-белков к индукции экспрессии АФК-утилизующих ферментов, в частности супероксиддисмутазы [39].

Помимо стимуляции клеточной смерти, АФК выполняют разнообразные функции в процессах роста и развития растений и, в частности, являются важ-

ными регуляторами роста и развития корней [40]. Например, существенную роль АФК играют в развитии корневых волосков. Мутант по гену, кодирующему NADPH-оксидазу, имеет сильно редуцированные корневые волоски. У мутанта по четырем генам (GAI, RGA, RGL1 и RGL2), кодирующим DELLA-белки, корневые волоски удлинены, однако обработка такого мутанта ингибитором NADPH-оксидазы уменьшает длину корневых волосков [39].

УЧАСТИЕ DELLA-БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ СИМБИОЗА БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ С АЗОТФИКСИРУЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ

Одна из наиболее важных функций, которые выполняют DELLA-белки, связана с их участием в регуляции развития симбиоза бобовых растений с азотфиксирующими клубеньковыми бактериями, который приводит к появлению новых органов на корнях растений — клубеньков. Возникновение симбиоза инициируется под влиянием сигнальных молекул ризобий Nod-факторов, которые активируют две реализующиеся параллельно программы — развитие инфекции и органогенез клубенька.

В рецепции Nod-факторов участвуют рецептор-подобные трансмембранные киназы с LysM-мотивами во внеклеточном домене [41–43]. Активация сигнального пути приводит к возникновению периодических колебаний уровня кальция в ядре клеток корня, что способствует активации кальций/кальмодулин-зависимой киназы (CCaMK), которая в свою очередь стимулирует работу нескольких транскрипционных факторов, таких как IPD3/CYCLOPS, а также NSP1, NSP2, ERN1 и NIN, регулирующих экспрессию генов-мишеней [44].

Было установлено, что в контроле формирования и развития клубеньков большое значение имеют фитогормоны, которые тесно взаимодействуют с компонентами сигнального пути, активируемого Nod-факторами. Существенную роль в этом процессе играют фитогормоны ауксин и цитокинин. Показано, что мутация, приводящая к постоянной активации рецептора цитокинина CRE1/LHK1, способствовала формированию клубеньков в отсутствие ризобий, а у мутантов с нарушением функциональной активности рецептора, напротив, наблюдалось существенное снижение количества клубеньков. При взаимодействии цитокинина с рецептором CRE1/LHK1 активируется сигнальный путь, компоненты которого могут непосредственно влиять на транспорт либо биосинтез ауксина. У мутантов *cre1* не наблюдали тех изменений в локализации белков PIN и полярном транспорте ауксина, которые происходят как при обработке Nod-факторами, так и при инокуляции ризобиями у растений дикого типа [45, 46]. При этом ингибиторы транспорта ауксина при обработке корней растений могут индуцировать появление клубенькоподобных структур [47].

Однако механизмы контроля развития симбиоза с участием цитокинина и ауксина требуют согласованного взаимодействия с другими фитогормонами, прежде всего ГК. ГК оказывает существенное влияние на развитие симбиоза, и, поскольку основными регуляторами, реагирующими на изменения уровня ГК, являются DELLA-белки, их роль в симбиозе также важна.

Эксперименты с экзогенным добавлением ГК позволяют оценить влияние DELLA-белков на развитие инфекции и органогенез клубеньков. Установлено, что обработка ГК ингибирует экспрессию генов, кодирующих транскрипционные факторы NSP2 и NIN, которые могут активироваться под влиянием Nod-факторов, а также цитокинина. Повышенная экспрессия гена, кодирующего позитивный регулятор действия ГК SLEEPY1, также негативно влияет на клубенькообразование [48].

ГК оказывает негативное влияние на процесс формирования инфекционных нитей. У мутанта гороха *na* по гену биосинтеза ГК наблюдали значительное увеличение числа образующихся инфекционных нитей. Напротив, обработка мутанта *na* экзогенным ГК снижала количество инфекционных нитей (оно было лишь несколько выше уровня, наблюдаемого у дикого типа) [49].

Сходным образом обработка растений *M. truncatula* ГК существенно снижала число формируемых инфекционных нитей, их количество было также снижено у мутантов *della* (у которых ГК действует конститутивно) [50]. Поскольку у DELLA-белков сайт связывания с рецептором GID1 находится на N-конце, мутации в этой области приводят к нарушению сборки комплекса GID1 с DELLA-белками, что препятствует деградации DELLA-белков под влиянием ГК. Синтез в растениях формы DELLA-белка (DELLAΔ18), нечувствительной к влиянию ГК, вызывает увеличение числа инфекционных нитей в клетках эпидермиса, хотя клубеньки при этом не формируются. Данный эффект можно объяснить тем, что обработка ГК подавляет развитие инфекционных нитей и происходит в результате влияния на DELLA-белки [50].

Обработка растений высокими концентрациями ГК (превышающими уровень эндогенного содержания) приводила к снижению клубенькообразования прямо пропорционально концентрации. При этом добавление ингибитора биосинтеза ГК паклобутразола стимулировало клубенькообразование [50].

Однако, вероятно, в зависимости от концентрации ГК ее влияние на процесс развития клубеньков может быть разным. У таких бобовых растений, как горох и *Sesbania rostrata*, мутации по генам биосинтеза ГК (что определяет пониженный уровень ГК) вызывают значительное снижение количества образующихся клубеньков. При обработке таких мутантов ГК клубенькообразование восстанавливается [51]. Важно отметить,

что те редкие клубеньки, которые иногда образуются у растений, мутантных по генам биосинтеза ГК, характеризуются измененной морфологией и они меньше тех, что формируются у растений дикого типа [51]. Сходный внешний вид клубеньков обуславливают также высокие концентрации ингибитора ГК паклобутразола [49].

Эти данные дают основание полагать, что ГК играет двойную роль в процессе развития ризобияльного симбиоза, так как, с одной стороны, определяет негативную регуляцию развития инфекции, а с другой — положительно влияет на клубенькообразование в конкретном диапазоне концентраций. Следует отметить, что сходная регуляция показана и для цитокинина. Цитокинин оказывает положительное влияние на начальные этапы органогенеза клубеньков, но негативно влияет на развитие инфекции в эпидермисе [48]. Это означает, что в процессе развития симбиоза, вероятно, положительное и негативное влияние фитогормонов тесно связано с местом и временем их действия, а также с их влиянием друг на друга. Недавно было показано, что обработка ГК может снижать содержание некоторых форм цитокинина в корнях и этот эффект зависит от DELLA-белков [52]. Таким образом, DELLA-белки могут влиять и на метаболизм цитокинина при клубенькообразовании.

Участие DELLA-белков в контроле развития ризобияльного симбиоза, вероятно, имеет место уже на ранних стадиях этого процесса. С помощью дигибридной дрожжевой системы и бимолекулярной флуоресцентной комплементации (от англ. bimolecular fluorescence complementation, BiFC) удалось выявить взаимодействия между DELLA-белками и транскрипционным фактором IPD3/CYCLOPS *M. truncatula* (регулятором сигнального пути, активируемого Nod-факторами) [50, 53]. При этом DELLA могут активировать сборку комплекса между CCaMK-IPD3/CYCLOPS-DELLA, что усиливает фосфорилирование IPD3/CYCLOPS [53].

Было также установлено участие DELLA-белков и в формировании другого комплекса, играющего важную роль в сигнальной регуляции симбиоза, а именно NSP1 – NSP2 [50, 53]. Как и в случае с IPD3/CYCLOPS, связывание трех DELLA-белков *M. truncatula* с транскрипционным фактором NSP2 стимулирует сборку комплекса с NSP1. Кроме того, через формирование комплекса NSP1 – NSP2 DELLA-белки могут вызывать индукцию экспрессии гена *ERN1*, кодирующего транскрипционный фактор. При трансфекции в протопласты арабидопсиса NSP1- и NSP2-транскрипционных факторов наблюдается весьма слабая индукция репортерного гена, соединенного с промотором *ERN1*, но при котрансфекции с DELLA эта индукция значительно усиливается. Анализ экспрессии генов — маркеров развития симбиоза подтверждает, что экспрессия *ERN1* и активируемого им гена *ENOD11* снижена у *della*-мутантов.

Наконец, с помощью коиммунопреципитации было показано, что DELLA-белки могут служить связующим звеном между IPD3 и NSP2, так как их преципитация отмечалась только в присутствии DELLA. Кроме того, DELLA-белки взаимодействуют с другим участником сигнального пути — транскрипционным фактором NF-YA1 [50].

Интересно, что уровень экспрессии генов, кодирующих NSP1- и NSP2-транскрипционные факторы, может отличаться у двойного *della1 della2* и одиночного *della1* мутантов *M. truncatula*. В двойном мутанте уровень экспрессии обоих генов *NSP1* и *NSP2* оказался значительно снижен по сравнению с диким типом. Эти данные согласуются с тем, что экзогенная обработка ГК также снижала уровень экспрессии этих генов, и, следовательно, это снижение опосредовано деградацией DELLA-белков под влиянием ГК [15]. В одиночном же мутанте значительной разницы в экспрессии *NSP1* и *NSP2* по сравнению с диким типом выявлено не было, что, вероятно, свидетельствует о том, что DELLA-белки могут частично компенсировать функции друг друга [50].

DELLA-БЕЛКИ — ОБЩИЕ КОМПОНЕНТЫ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ, КОНТРОЛИРУЮЩЕГО РАЗВИТИЕ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА И СИМБИОЗА С ГРИБАМИ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ

Под влиянием сигнальных молекул, выделяемых грибами арбускулярной микоризы (AM), у растений активируются процессы, которые способствуют росту и распространению грибных гиф в тканях корня и формированию межклеточного мицелия. На дальнейших этапах происходит развитие гиф в клетках коры и формирование специализированных структур, называемых арбускулами [54]. Через арбускулы в корень поступают фосфор и азот, а со стороны растения гриб получает углеводы [55]. Развитие симбиоза с грибами AM регулируется в соответствии с фосфатным, азотным и фотосинтетическим статусом растения.

Показано, что многие компоненты сигнального каскада, активируемого при развитии симбиоза, являются общими как для азотфиксирующего симбиоза, так и для симбиоза с грибами AM. Среди них CCaMK и транскрипционные факторы IPD3/CYCLOPS, NSP1 и NSP2 [56, 57]. Относительно недавно стало известно, что DELLA-белки также необходимы для развития симбиоза с грибами AM, то есть они служат «общими» регуляторами при развитии двух типов симбиозов [15, 53].

На модельном бобовом растении *M. truncatula* было продемонстрировано, что у растений в условиях недостатка фосфора уровень экспрессии генов, кодирующих DELLA-белки, значительно повышается и остается высоким в процессе развития симбиоза, однако снижается при добавлении в среду фосфора. При анализе мутантов

по DELLA-белкам было показано, что после инокуляции грибами AM у одиночных мутантов *della1* и *della2* развитие микоризы происходит так же, как у дикого типа, однако в двойном мутанте формирование арбускул снижается на 85 %. Транскрипция генов *MtPT4* и *MtLEC5*, являющихся маркером развития арбускул в клетках инокулированных растений [58], в двойном мутанте была значительно снижена, как и уровень экспрессии маркера развития гриба — гена альфа-тубулина *Glomus versiforme* [15].

Синтез в клетках корней белка DELLA1Δ18 (полученного с помощью конструкции *Della1Δ18*), нечувствительного к действию ГК, индуцировал в корнях растений *M. truncatula* экспрессию некоторых маркеров развития симбиоза с грибами AM *MtBCP1* и *MtSCP1*, *MtSbtM1* и *MtVapyrin* в отсутствие инокуляции грибами. Сходным образом синтез белка DELLA1Δ18 в клетках корня растений *Lotus japonicus* индуцировал экспрессию генов *NSP1* и *NSP2*, а также активируемого этими транскрипционными факторами гена *DWARF27*, участвующего в биосинтезе стриголактонов. Причем такой экспрессии достаточно для восстановления способности к формированию арбускул у мутанта *nsp1 nsp2* [59].

Таким образом, анализ данных по изучению DELLA-белков в развитии двух типов симбиозов подтверждает их роль универсальных участников сигнальных путей, которые позволяют растениям под влиянием внешних сигналов достаточно быстро активировать внутриклеточные регуляторы.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (РНФ 17-76-30016) с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» на базе ФГБНУ ВНИИСХМ.

ЛИТЕРАТУРА

- Xue L, Cui H, Buer B, et al. Network of GRAS transcription factors involved in the control of arbuscule development in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 2015;167(3):854-871. <https://doi.org/10.1104/pp.114.255430>.
- Hirsch S, Oldroyd GED. GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. *Plant Signaling & Behavior.* 2014;4(8):698-700. <https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9176>.
- Hirsch S, Oldroyd GED. GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. *Plant Signaling & Behavior.* 2014;4(8):698-700. <https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9176>.
- Vera-Sirera F, Gomez MD, Perez-Amador MA. DELLA proteins, a group of GRAS transcription regulators that mediate gibberellin signaling. In: *Plant Transcription Factors*. Elsevier; 2016. P. 313-328. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800854-6.00020-8>.
- Daviere JM, Achard P. Gibberellin signaling in plants. *Development.* 2013;140(6):1147-1151. <https://doi.org/10.1242/dev.087650>.
- Briones-Moreno A, Hernandez-Garcia J, Vargas-Chavez C, et al. Evolutionary analysis of DELLA-associated transcriptional networks. *Front Plant Sci.* 2017;8:626. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00626>.
- Sun TP. The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. *Curr Biol.* 2011;21(9):R338-345. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.02.036>.
- Dill A, Thomas SG, Hu J, et al. The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell.* 2004;16(6):1392-1405. <https://doi.org/10.1105/tpc.020958>.
- Hirano K, Kouketu E, Katoh H, et al. The suppressive function of the rice DELLA protein SLR1 is dependent on its transcriptional activation activity. *Plant J.* 2012;71(3):443-453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05000.x>.
- Fleck B, Harberd NP. Evidence that the Arabidopsis nuclear gibberellin signalling protein GAI is not destabilised by gibberellin. *The Plant Journal.* 2002;32(6):935-947. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01478.x>.
- Wen CK. Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell.* 2002;14(1):87-100. <https://doi.org/10.1105/tpc.010325>.
- Hedden P, Thomas SG. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J.* 2012;444(1):11-25. <https://doi.org/10.1042/BJ20120245>.
- Livne S, Lor VS, Nir I, et al. Uncovering DELLA-independent gibberellin responses by characterizing new tomato procer mutants. *Plant Cell.* 2015;27(6):1579-94. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132795>.
- Gubler F, Chandler PM, White RG, et al. Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol.* 2002;129(1):191-200. <https://doi.org/10.1104/pp.010918>.
- Floss DS, Levy JG, Levesque-Tremblay V, et al. DELLA proteins regulate arbuscule formation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(51):E5025-5034. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308973110>.
- Weston DE, Elliott RC, Lester DR, et al. The Pea DELLA proteins LA and CRY are important regulators of gibberellin synthesis and root growth. *Plant Physiol.* 2008;147(1):199-205. <https://doi.org/10.1104/pp.108.115808>.
- Zhang ZL, Ogawa M, Fleet CM, et al. Scarecrow-like 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(5):2160-2165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012232108>.

18. Zentella R, Zhang ZL, Park M, et al. Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2007;19(10):3037-3057. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.054999>.
19. Hirano K, Nakajima M, Asano K, et al. The GID1-mediated gibberellin perception mechanism is conserved in the *Lycophyte Selaginella moellendorffii* but not in the *Bryophyte Physcomitrella patens*. *Plant Cell*. 2007;19(10):3058-3079. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.051524>.
20. Yasumura Y, Crumpton-Taylor M, Fuentes S, Harberd NP. Step-by-step acquisition of the gibberellin-DELLA growth-regulatory mechanism during land-plant evolution. *Curr Biol*. 2007;17(14):1225-1230. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.037>.
21. Vandenbussche F, Fierro AC, Wiedemann G, et al. Evolutionary conservation of plant gibberellin signaling pathway components. *BMC Plant Biol*. 2007;7:65. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-65>.
22. Gallego-Bartolome J, Minguet EG, Marin JA, et al. Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in *Arabidopsis*. *Mol Biol Evol*. 2010;27(6):1247-1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq012>.
23. Frigerio M, Alabadi D, Perez-Gomez J, et al. Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2006;142(2):553-563. <https://doi.org/10.1104/pp.106.084871>.
24. Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Ed. by P.J. Davies. Springer; 2013.
25. Brian PW, Hemming HG. Complementary action of Gibberellic acid and auxins in pea internode extension. *Ann Bot*. 1958;22(1):1-17. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a083592>.
26. Fu X, Harberd NP. Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature*. 2003;421(6924):740-743. <https://doi.org/10.1038/nature01387>.
27. Achard P, Vriezen WH, Van Der Straeten D, Harberd NP. Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell*. 2003;15(12):2816-2825. <https://doi.org/10.1105/tpc.015685>.
28. Hua J, Meyerowitz EM. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*. 1998;94(2):261-271. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81425-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81425-7).
29. Gallego-Bartolome J, Minguet EG, Marin JA, et al. Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in *Arabidopsis*. *Mol Biol Evol*. 2010;27(6):1247-1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq012>.
30. Saibo NJM, Vriezen WH, Beemster GTS, Van Der Straeten D. Growth and stomata development of *Arabidopsis hypocotyls* are controlled by gibberellins and modulated by ethylene and auxins. *Plant J*. 2003;33(6):989-1000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01684.x>.
31. Moubayidin L, Perilli S, Dello Ioio R, et al. The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Curr Biol*. 2010;20(12):1138-43. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.05.035>.
32. Dello Ioio R, Linhares FS, Sabatini S. Emerging role of cytokinin as a regulator of cellular differentiation. *Curr Opin Plant Biol*. 2008;11(1):23-27. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.10.006>.
33. Lofke C, Luschnig C, Kleine-Vehn J. Posttranslational modification and trafficking of PIN auxin efflux carriers. *Mech Dev*. 2013;130(1):82-94. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2012.02.003>.
34. Kleine-Vehn J, Leitner J, Zwiewka M, et al. Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(46):17812-17817. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808073105>.
35. Salanenka Y, Verstraeten I, Lofke C, et al. Gibberellin DELLA signaling targets the retromer complex to redirect protein trafficking to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(14):3716-3721. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721760115>.
36. Lundin VF, Srayko M, Hyman AA, Leroux MR. Efficient chaperone-mediated tubulin biogenesis is essential for cell division and cell migration in *C. elegans*. *Dev Biol*. 2008;313(1):320-334. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.10.022>.
37. Torres MA, Jones JD, Dangl JL. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol*. 2006;141(2):373-378. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079467>.
38. Roy Choudhury S, Pandey S. Phosphatidic acid binding inhibits RGS1 activity to affect specific signaling pathways in *Arabidopsis*. *Plant J*. 2017;90(3):466-477. <https://doi.org/10.1111/tpj.13503>.
39. Achard P, Renou JP, Berthome R, et al. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr Biol*. 2008;18(9):656-660. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.034>.
40. Tsukagoshi H. Control of root growth and development by reactive oxygen species. *Curr Opin Plant Biol*. 2016;29:57-63. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.10.012>.
41. Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, et al. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*. 2003;425(6958):637-640. <https://doi.org/10.1038/nature02045>.
42. Zhukov V, Radutoiu S, Madsen LH, et al. The pea Sym37 receptor kinase gene controls infection-thread

- initiation and nodule development. *Mol Plant Microbe Interact.* 2008;21(12):1600-1608. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-12-1600>.
43. Kirienko AN, Porozov YB, Malkov NV, et al. Role of a receptor-like kinase K1 in pea *Rhizobium* symbiosis development. *Planta.* 2018;248(5):1101-1120. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2944-4>.
44. Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS, Downie JA. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet.* 2011;45:119-144. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>.
45. Grunwald U, Nyamsuren O, Tamasloukht M, et al. Identification of mycorrhiza-regulated genes with arbuscule development-related expression profile. *Plant Mol Biol.* 2004;55(4):553-566. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-1303-y>.
46. Plet J, Wasson A, Ariel F, et al. MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant J.* 2011;65(4):622-633. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2010.04447.x>.
47. Hirsch AM, Bhuvaneshwari TV, Torrey JG, Bisseling T. Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(4):1244-1248. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.4.1244>.
48. Gamas P, Brault M, Jardinaud MF, Frugier F. Cytokinins in Symbiotic Nodulation: When, Where, What for? *Trends Plant Sci.* 2017;22(9):792-802. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.012>.
49. McAdam EL, Reid JB, Foo E. Gibberellins promote nodule organogenesis but inhibit the infection stages of nodulation. *J Exp Bot.* 2018;69(8):2117-2130. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery046>.
50. Fonouni-Farde C, Tan S, Baudin M, et al. DELLA-mediated gibberellin signalling regulates Nod factor signalling and rhizobial infection. *Nat Commun.* 2016;7:12636. <https://doi.org/10.1038/ncomms12636>.
51. Ferguson BJ, Ross JJ, Reid JB. Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiol.* 2005;138(4):2396-2405. <https://doi.org/10.1104/pp.105.062414>.
52. Fonouni-Farde C, Kisiala A, Brault M, et al. DELLA-mediated gibberellin signaling regulates cytokinin-dependent symbiotic nodulation. *Plant Physiol.* 2017;175(4):1795-1806. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00919>.
53. Jin Y, Liu H, Luo D, et al. DELLA proteins are common components of symbiotic rhizobial and mycorrhizal signalling pathways. *Nat Commun.* 2016;7:12433. <https://doi.org/10.1038/ncomms12433>.
54. Harrison MJ. Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol.* 2012;15(6):691-8. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.08.010>.
55. Smith SE, Smith FA. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu Rev Plant Biol.* 2011;62:227-250. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103846>.
56. Levy J, Bres C, Geurts R, et al. A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science.* 2004;303(5662):1361-1364. <https://doi.org/10.1126/science.1093038>.
57. Banba M, Gutjahr C, Miyao A, et al. Divergence of evolutionary ways among common sym genes: CASTOR and CCaMK show functional conservation between two symbiosis systems and constitute the root of a common signaling pathway. *Plant Cell Physiol.* 2008;49(11):1659-71. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn153>.
58. Harrison MJ. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by Arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell.* 2002;14(10):2413-2429. <https://doi.org/10.1105/tpc.004861>.
59. Floss DS, Levesque-Tremblay V, Park HJ, Harrison MJ. DELLA proteins regulate expression of a subset of AM symbiosis-induced genes in *Medicago truncatula*. *Plant Signal Behav.* 2016;11(4):e1162369. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1162369>.

✉ Информация об авторах

Александра Вячеславовна Долгих — студент, лаборатория молекулярной и клеточной биологии. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. E-mail: sqshadol@gmail.com.

Елена Анатольевна Долгих — д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. SPIN: 4453-2060. E-mail: dol2helen@yahoo.com.

✉ Information about the authors

Aleksandra V. Dolgikh — Student, Laboratory of Molecular and Cellular Biology. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. E-mail: sqshadol@gmail.com.

Elena A. Dolgikh — Doctor of Science, Group Leader, Laboratory of Molecular and Cellular Biology. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. SPIN: 4453-2060. E-mail: dol2helen@yahoo.com.