

© Жуков В. А., Рычагова Т. С.,  
Штарк О. Ю., Борисов А. Ю.,  
Тихонович И. А.

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ С КЛУБЕНЬКОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ

ГНУ ВНИИ

сельскохозяйственной  
микробиологии

Россельхозакадемии, Пушкин,  
Санкт-Петербург

✿ Рассмотрен генетический контроль сигнальных взаимодействий между партнерами при образовании бобово-ризобиального симбиоза. Основой данных взаимодействий является восприятие растением сигнальных молекул (Nod-факторов), выделяемых клубеньковыми бактериями. Разнообразие рецепторных киназ у бобовых растений отражает специфичность взаимодействия с различными штаммами клубеньковых бактерий.

✿ **Ключевые слова:**

бобово-ризобиальный симбиоз, специфичность сигнальных взаимодействий, Nod-фактор, рецепторные киназы, горох посевной.

### ВВЕДЕНИЕ

Полезные симбиотические микроорганизмы играют важную роль в жизни растений, обеспечивая их минеральное питание, защиту от патогенов и фитофагов, а также адаптации к различным стрессам. Наибольшее экологическое значение для растений имеют грибы арбускулярной микоризы и эндосимбионты-азотфиксаторы (Проворов и др., 2002). В настоящее время наиболее интенсивно изучается эндосимбиоз, образуемый бобовыми растениями (сем. *Fabaceae*) и клубеньковыми бактериями, или ризобиями (сем. *Rhizobiaceae*). Актуальность исследований и ценность получаемых результатов в области изучения данного типа азотфиксирующего симбиоза объясняется рядом причин.

Во-первых, необходимость исследования бобово-ризобиального симбиоза определяется важностью бобовых растений как сельскохозяйственных культур, выращиваемых в различных агроклиматических зонах. Бобовые растения в наибольшей степени отвечают требованиям концепции адаптивного земледелия, благодаря своей способности к максимальному использованию потенциала полезной почвенной микрофлоры, по причине своей высокой и разносторонней симбиотической активности (Celik et al., 2004). В связи с этим ведутся активные исследования симбиозов бобовых растений, направленные на создание высокоэффективных растительно-микробных систем для адаптивного растениеводства (Тихонович и др., 2005; Борисов и др., 2007).

Во-вторых, бобово-ризобиальный симбиоз, возникший в ходе эволюции на основе более древней симбиотической системы — арбускулярной микоризы, — является уникальной моделью для изучения взаимодействия между растениями и микроорганизмами ввиду его факультативности для обоих партнеров, которые по отдельности могут быть исследованы методами генетического анализа (Parniske, 2008). В ходе длительной совместной эволюции бобовых растений и клубеньковых бактерий возникла система сигнального взаимодействия между симбионтами, обеспечивающая строго специфическое узнавание партнеров и ведущая к их генетической интеграции. В формирующемся «надорганизме» интегрируются метаболические процессы симбионтов, определяются специализированные варианты дифференцировки органов, тканей, клеток растения, а также самих бактерий (Тихонович и др., 2005). Таким образом, изучение бобово-ризобиального симбиоза позволяет выявить основные механизмы, лежащие в основе развития и функционирования растительно-микробных систем, что, в свою очередь, обогащает фундаментальные основы биологии и генетики развития высших растений.

В настоящее время активно развиваются исследования, направленные на разработку методов создания наиболее эффективных растительно-микробных систем бобовых, при функционировании которых максимально реализуется потенциал продуктивности растения (Штарк и др. 2006; Борисов и др., 2007). Особую актуальность поэтому приобретает изучение систем узнавания партнерами друг друга. Уникальной особенностью каждого конкретного штамма ризобий является спектр выделяемых им сигнальных молекул, называемых Nod-факторами (Geurts et al., 1997), а специфичность

Поступила в редакцию 18.11.2008  
Принята к публикации 30.12.2008

взаимодействия растения с определенными штаммами ризобий определяется наличием у растения рецепторов, распознающих структуру Nod-факторов (Limpens et al., 2003; Radutoiu et al., 2003, 2007; Oldroyd, Downie, 2008). Исследования природы этих рецепторов, и, в более общем смысле, генетического контроля специфичности взаимодействия с микроорганизмами со стороны растения, позволят в ближайшем будущем вести научно обоснованную селекцию наиболее эффективных пар микро- и макросимбионта. Изучение же изменчивости по признаку специфичности взаимодействия с симбиотическими микроорганизмами может способствовать созданию новых сортов бобовых растений, вступающих в симбиоз только с определенными штаммами клубеньковых бактерий.

Развитие молекулярно-генетических методов позволило найти ответы на многие вопросы, возникающие при детальном изучении бобово-ризобиального симбиоза. Ввиду быстрого накопления данных в этой области представляется важным обобщить новые сведения (в том числе полученные авторами) о генетическом контроле специфичности взаимодействия бобовых растений с клубеньковыми бактериями.

### СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Специфичность характерна для многих форм биологического взаимодействия, причем наиболее ярко выражена она тогда, когда взаимодействие оказывает четкое влияние на выживаемость партнеров. Этот признак настолько важен и универсален, что следует говорить о специфичности как об обязательном условии установления адаптивно значимого симбиоза. Специфичность является необходимым условием для создания надорганизменных систем, основанных на интеграции генетических систем партнеров. Партнеры, содержащие необходимые части генетического материала, должны найти друг друга среди многих, часто сходных организмов и в сложных условиях окружающей среды. Таким образом, под **специфичностью** следует понимать **способность неродственных организмов опознавать партнеров по симбиозу, способных обеспечить запуск программы взаимодействия, не функционирующей в отсутствие адекватного партнера.**

Среди известных на сегодняшний день симбиозов специфичность наиболее полно охарактеризована для бобово-ризобиального симбиоза, и молекулярные механизмы, лежащие в ее основе и представляющие собой обмен сигналами между партнерами, в общем виде уже расшифрованы. Подавляющее большинство генов клубеньковых бактерий, принимающих участие в клубенькообразовании, и, главным образом, в синтезе сигнальных молекул, к настоящему моменту детально изучены (MacLean et al., 2007). Известно, что они объединены в единый оперон и находятся под общим

регуляторным промотором — нод-боксом (англ. Nod-box, от nodulation — клубенькообразование). Данные гены не экспрессируются в отсутствие растения-хозяина, единственным исключением является ген *nodD*, белковый продукт которого является транскрипционным фактором, проявляющим свою активность, по всей видимости, лишь после получения сигнала от растений (Denarie et al., 1996). Таким сигналом служит молекула-индуктор флавоноидной природы: присоединение специфической для данного бобового сигнальной молекулы к рецепторному белку, вероятно, меняет его конформацию, что инициирует экспрессию генов клубенькообразования. Результатом их работы является синтез Nod-фактора, сигнальной молекулы хитиновой природы (рис. 1), способного в нано- и пиколярных концентрациях запустить программу развития клубеньков у растения путем активации специфического сигнального каскада.

Уникальность структуры химического соединения, выделяемого бактериями, необходима, но не достаточна для функционирования его в роли сигнальной молекулы. Возникновение элементарного сигнального пути в микробно-растительных взаимодействиях происходит при двух дополнительных условиях: (1) наличии выраженного межорганизменного взаимодействия, которое делает опознавание партнера жизненно важным; (2) наличии у растения-хозяина системы рецепции, опознающей сигнальную молекулу микросимбионта. Очевидно, структура сигнальной молекулы должна быть стабильна и достаточно специфична для того, чтобы естественный отбор мог обеспечить закрепление у партнера соответствующей рецепторной функции (при этом природа сигнальной молекулы может вообще не быть связана с функционированием симбиоза или механизмом воздействия на партнера). В свою очередь, наличие специфического рецептора, распознающего структуру сигнальной молекулы бактерий, является ключевым свойством растения, способного к созданию симбиоза. К настоящему моменту известно, что такими рецепторами являются продукты растительных генов, контролирующих способность хозяина к симбиотическому взаимодействию.

### СИМБИОТИЧЕСКИЕ ГЕНЫ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ

Для развития генетики бобово-ризобиального симбиоза важным оказался тот факт, что специфичность является для обоих партнеров стабильным, а значит, генетически детерминированным признаком. Все описанные к настоящему моменту изменения специфичности симбиоза вызваны мутациями в геноме хотя бы одного из партнеров, при этом мутации в геноме макросимбионта могут быть супрессированы со стороны микросимбионта. Другая важная генетическая особенность бобово-ризобиального симбиоза заключает-

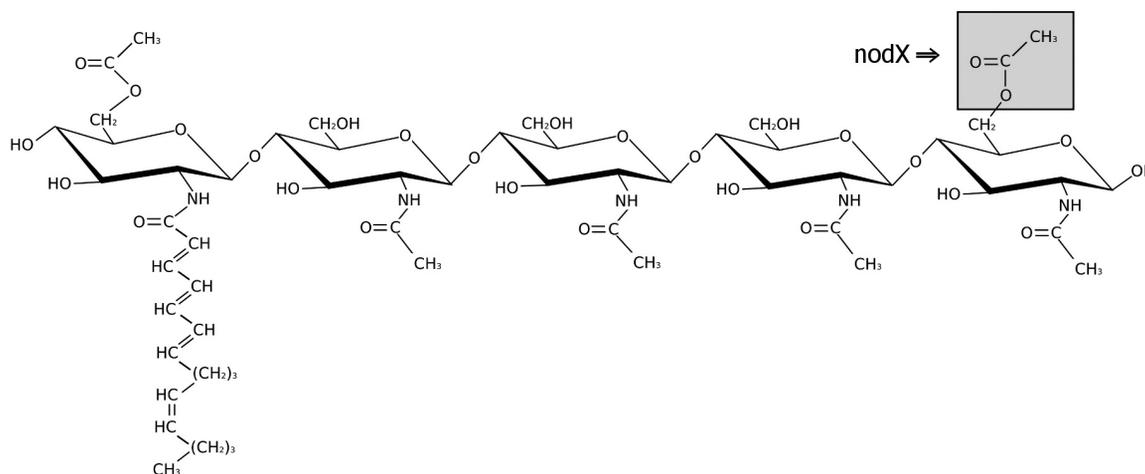


Рис. 1. Структура Nod-фактора, продуцируемого штаммами *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, несущими ген *nodX* (Albrecht et al., 1999)

Выделена ацетильная группа на редуцирующем конце молекулы

ся в том, что существенное варьирование по признаку специфичности может наблюдаться даже в пределах одного вида бобовых. Впервые такую изменчивость описали отечественные исследователи Л. И. Говоров и З. Г. Разумовская около 80 лет тому назад, показавшие, что примитивные формы гороха, происходящие из Афганистана, не способны к заражению большинством штаммов *Rhizobium leguminosarum* европейского происхождения (Разумовская, 1937). Впоследствии, более 30 лет назад, генетический детерминант, отвечающий за проявление этого признака, был обозначен символом *Sym2* (Lie, 1978).

Одна из аллелей *Sym2* определяет устойчивость линий гороха из Афганистана к взаимодействию с европейскими штаммами *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, но позволяет им образовывать симбиоз с некоторыми штаммами из почв Средней Азии (Lie, 1984), а также Северо-Западного региона России (Четкова, Тихонович, 1986). Иными словами, «афганские» линии гороха демонстрируют сужение специфичности внутри вида *P. sativum*. На уровне сигнальных взаимодействий это проявляется в том, что для инокуляции «афганских» линий гороха необходим специфический Nod-фактор, который отличается от обычного «горохового» наличием второй ацетильной группировки на редуцирующем конце хитинового скелета (Goetz et al., 1985) (рис. 1). Такое декорирование осуществляется за счет наличия в геноме клубеньковых бактерий гена *nodX*, кодирующего ацетилтрансферазу, осуществляющую ферментативное ацетилирование Nod-фактора. В свою очередь, штаммы из европейских почв, синтезирующие Nod-фактор без данного заместителя, оказываются неспособны к индукции клубенькообразования у «афганских» генетических линий гороха, несущих «афганскую» аллель гена *Sym2<sup>A</sup>* (A — Afghanistan) (Ovtsyana et al., 2000). Эта ситуация

иллюстрирует пример «ген-на-ген»-взаимодействий, когда конкретный ген микроорганизма (*nodX*, кодирующий ацетилтрансферазу) определяет взаимодействие с конкретным геном растения-макросимбионта (*Sym2<sup>A</sup>*, вероятно, кодирующим рецептор Nod-фактора).

Спонтанные мутации, нарушающие нормальное развитие бобово-ризобияльного симбиоза, встречаются в природных популяциях бобовых растений довольно редко, и, хотя некоторые из них оказались очень полезными для изучения симбиогенеза, только с помощью индуцированного мутагенеза удалось дать полную характеристику генов растений, контролирующих симбиотические свойства. Использование различных методов мутационного анализа позволило выявить несколько сотен мутаций, затрагивающих симбиогенез (соответствующие гены получили обозначение *Sym*, от англ. symbiosis). Наиболее богатые коллекции симбиотических мутантов описаны для модельных бобовых растений — лядвенца японского (*Lotus japonicus* (Regel.) Larsen) и диплоидной люцерны (*Medicago truncatula* Gaertn.), а также для гороха посевного (*Pisum sativum* L.). У этих объектов число групп комплементации симбиотических мутаций приближается к 50, и за последние годы мутаций в новых *Sym*-генах у данных растений описать не удалось (Борисов и др., 2007). Данный факт позволяет утверждать, что у бобовых растений известен практически полный набор генов, контролирующих процесс образования клубеньков, и характер мутаций и количество генов, ответственных за развитие симбиоза, у разных видов бобовых оказываются сходными.

*Sym*-гены, представленные единичными копиями в геноме растения, играют регуляторную роль в реализации симбиотических программ. Согласно последним данным, они обеспечивают рецепцию сигнальных молекул микросимбионта, активацию сигнального каскада и

регуляцию транскрипции в кортексе корня и развивающихся клубеньках (Oldroyd, Downie, 2008). Значительное количество *Sym*-генов клонировано у модельных и сельскохозяйственно ценных бобовых, и для различных видов бобовых показано структурное и функциональное сходство гомологичных *Sym*-генов. Среди клонированных *Sym*-генов лядвенца, люцерны и гороха выявлены гены, кодирующие рецепторные молекулы. Исследования их структуры и функций показали, что механизмы восприятия Nod-фактора различаются у бобовых с детерминированными клубеньками (лядвенец) и недетерминированными клубеньками (горох, диплоидная люцерна).

### РЕЦЕПТОРНЫЕ КИНАЗЫ, ВОСПРИНИМАЮЩИЕ NOD-ФАКТОР

Исследования, проведенные в последние 5 лет на лядвенце японском, диплоидной люцерне и горохе посевном с применением современного арсенала методов молекулярной генетики и геномики, показали наличие в геноме этих видов как минимум двух различных генов, кодирующих рецепторные молекулы, распознающие структуру Nod-фактора. Согласно современным представлениям, у лядвенца японского рецептором Nod-фактора является гетеродимер, состоящий из продуктов генов *NFR1* и *NFR5* (Radutoiu et al., 2003) (см. рис. 2). Доменная структура этих белков соответствует их рецепторной функции: они имеют трансмембранный домен (что необходимо для проведения сигнала из внешней среды внутрь клетки), обладают киназными доменами (однако лишь у одного из них, *NFR1*, есть необходимый компонент киназного пути — активационная петля, что и дало основание считать, что рецептор является гетеродимером) и, наконец, их экстраклеточные участки содержат LysM-мотивы, характерные для белков, способных разрушать хитиноподобные структуры (то есть потенциально способные связывать Nod-фактор). Согласно предполагаемой схеме (рис. 2), рецепторный комплекс связывает Nod-фактор, а киназные домены осуществляют передачу сигнала, фосфорилируя белки, являющиеся последующими компонентами сигнального каскада. Активация сигнального каскада приводит к развитию инфекционной нити (особой структуры, по которой бактерии проникают в клетки корня), а также к формированию нового органа растения — клубенька. Следует подчеркнуть, что, несмотря на логичность данной схемы, она не может считаться доказанной, поскольку механизмы захвата (называемого «докингом», от английского docking — причаливание) рецепторной киназой Nod-фактора не изучены. Кроме того, данная схема не может быть экстраполирована на другие виды бобовых ввиду того, что у лядвенца мутации в обоих из указанных генов рецепторных киназ вызывают полную неспособность растений к восприятию Nod-фактора, а

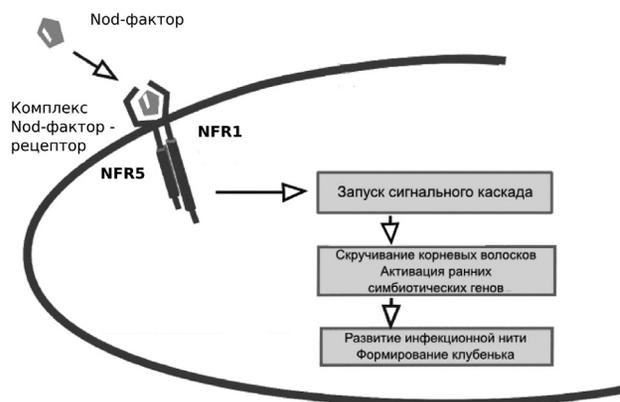


Рис. 2. Восприятие Nod-фактора у лядвенца японского (Radutoiu et al., 2003, модифицировано)

у гороха и диплоидной люцерны мутации в гомологичных генах приводят к блоку проникновения бактерий в корень на более поздней стадии.

Для установления структуры генов рецепторных белков у гороха посевного, а также для выяснения вопроса о природе гена *Sym2*, первого из выявленных генов бобовых, вовлеченного в определение специфичности взаимодействия, было проведено клонирование генов рецепторных киназ, гомологичных *NFR1* и *NFR5* лядвенца японского. Было выяснено, что в геноме гороха присутствует один ген, гомологичный *NFR5* (*Sym10*) (Madsen et al., 2003), и два гена, гомологичных *NFR1* (*Sym37* и *K1*) (Zhukov et al., 2008). Важно отметить, что оба этих гена, *Sym37* и *K1*, были локализованы в том же районе I группы сцепления гороха, что и *Sym2*, и потому являлись кандидатами на то, чтобы определять характерный фенотип «афганских» генетических линий гороха.

В соответствии с общей схемой развития симбиоза, рецепция Nod-фактора должна происходить на самом раннем этапе микробно-растительных взаимодействий, и мутации в генах, кодирующих рецепторы, должны блокировать развитие всех морфофизиологических изменений, связанных с инициацией инфекции. Действительно, мутации в гене *sym10* приводят к полному отсутствию реакции на присутствие ризобий или их Nod-факторов в ризосфере (Sagan et al., 1994; Madsen et al., 2003). Напротив, «афганские» генетические линии при взаимодействии с «европейскими» штаммами, продуцирующими недекорированный Nod-фактор, блокируют проникновение ризобий в корневые волоски, однако характеризуются морфофизиологическими реакциями, соответствующими ранним стадиям сигнальных взаимодействий (деформации и скручиванию корневых волосков в ответ на присутствие ризобий в ризосфере) (Lie, 1984; Kozik et al., 1995).

Этот факт отчасти противоречит данным о том, что функция гена *Sym2* связана с определением структуры

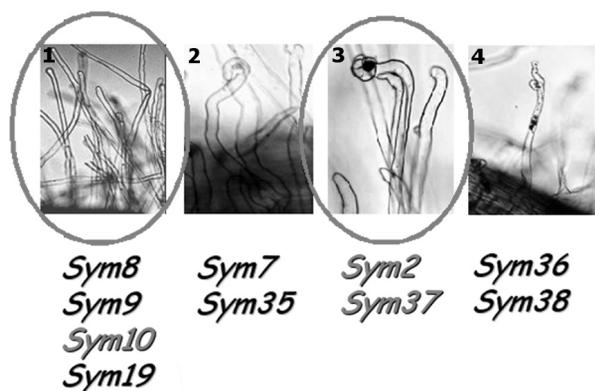


Рис. 3. Рецепция Nod-фактора у гороха посевного на двух этапах развития инфекции (выделены овалами)

Показана последовательность стадий развития инфекции и приведены названия *Sym*-генов, ответственных за протекание этих стадий: 1 — инициация инфекции (первичный обмен сигналами); 2 — скручивание корневого волоска с захватом бактериальных клеток, находящихся на его поверхности; 3 — формирование микроколонии ризобий в «кармане», образованном скручиванием корневого волоска (распознавание тонкой структуры Nod-фактора, выделяемого бактериями); 4 — рост инфекционной нити в корневом волоске

Nod-фактора, поскольку опознание Nod-фактора, очевидно, происходит на более ранней стадии. Противоречие, однако, было разрешено путем предположения, что рецепция Nod-фактора происходит по крайней мере на двух этапах взаимодействия бактерий и растения (Albrecht et al., 1999). Вначале так называемый «рецептор узнавания» (signaling receptor) осуществляет первичное распознавание структуры Nod-фактора, а затем «рецептор проникновения» (entry receptor) определяет тонкую структуру Nod-фактора, разрешая в случае успешного распознавания вхождение ризобий в корневого волосок и ткани корня (чего не происходит у «афганских» линий гороха, взаимодействующих с «европейскими» штаммами ризобий) (рис. 3). Следует отметить также, что распознавание Nod-фактора должно иметь место и на более поздних стадиях, при развитии клубеньков и в самих клубеньках, чтобы блокировать развитие защитных реакций растения на наличие чужеродных микроорганизмов внутри собственных тканей. Подтверждением тому являются данные об активности генов, отвечающих за развитие ранних стадий симбиоза (и в частности, за передачу сигнала после рецепции Nod-фактора), в азотфиксирующих клубеньках (Limpen et al., 2005).

Блок развития инфекции на стадии проникновения бактерий в корневого волосок наблюдается также у мутантов гороха по гену *Sym37*, гомологичному *NFR1* лядвенца японского. Более того, проявление мутации, приводящей к аминокислотной замене в рецепторном домене *Sym37* (L77 → F), может быть супрессировано

штаммом ризобий A1, способным производить дважды ацетилированный Nod-фактор (рис. 1) (Zhukov et al., 2008). Данный факт доказывает, что продукт гена *Sym37* принимает участие в распознавании бактериального сигнала, а также что ген *Sym37* взаимодействует с ризобиальным геном *nodX*, определяющим ацетилирование Nod-фактора. Этот результат явился одним из первых описаний системы «ген-на-ген» в мутуалистическом симбиозе с известными первичными последовательностями обоих взаимодействующих генов, а также стал подтверждением важности аминокислоты L77 в первом LysM-доме рецепторной киназы для распознавания бактериальной сигнальной молекулы.

Таким образом, роль продукта гена *Sym37* соответствует роли «рецептора проникновения», а фенотип мутантов по гену *Sym37* имеет сходство с характерным фенотипом «афганских» линий гороха. Однако проведенный анализ аминокислотной последовательности белка, соответствующего гену *Sym37*, у серии «афганских» и «европейских» линий гороха не выявил замен в рецепторной части, специфических только для «афганских» генетических линий (Zhukov et al., 2008). Поэтому мы вынуждены констатировать, что *Sym37* является функциональным аналогом гена *Sym2*, не определяя, однако, характерный фенотип «афганских» линий гороха.

Не исключено, что ключевую роль в проявлении фенотипа «афганских» линий гороха играет другой кандидат — ген *K1*, гомологичный *Sym37*, продукт которого, вероятно, способен выполнять функцию сменной субъединицы рецепторного комплекса. Уровень экспрессии данного гена повышен в корнях и клубеньках по сравнению с другими тканями растения, что позволяет считать его симбиотическим геном. Аминокислотная последовательность рецепторной части белка, соответствующего гену *K1*, является уникальной для «афганских» линий гороха, в то время как все остальные аллели, описанные нами для 8 европейских генотипов гороха, несут на уровне белка аминокислотные замены (Zhukov et al., 2008). Это является отражением эволюции генотипов данных линий: возможно, имела место некоторая регрессия избирательности системы распознавания Nod-факторов, предположительно связанная с изменением уникальной структуры рецепторной молекулы, при расширении ареала вида *P. sativum* L. в северном направлении. Тем не менее для подтверждения симбиотической роли гена *K1*, а также идентичности генов *Sym2* и *K1* необходимо проведение дополнительных экспериментов.

В геноме диплоидной люцерны также были выявлены два гена, предположительно кодирующие компоненты рецепторного комплекса, воспринимающего Nod-фактор, — *NFP* и *LYK3* (Limpen et al., 2003; Arrighi et al., 2006). Ген *LYK3* (от англ. LysM kinase) находится в области хромосомы, содержащей не менее 10 гомо-

логичных генов рецепторных киназ, близких по структуре (Limpens et al., 2003). Очевидно, в этом районе могут возникать новые варианты рецепторных молекул, например, за счет нерцепроной рекомбинации (Michelmore, Meyers, 1998). В подтверждение этому предположению один из генов этого района, *LYK4*, имеет высокую гомологию с соседними генами *LYK3* и *LYK5*, причем его рецепторная часть гомологична рецепторной части *LYK3*, а киназная — киназной части *LYK5*. Среди указанных генов, вероятно, только *LYK3* участвует во взаимодействии с ризобиями, поскольку только он экспрессируется специфично в корнях и клубеньках (Limpens et al., 2003). Предположительно, роль *LysM*-рецепторных киназ, кодируемых остальными генами данного региона генома, сводится к распознаванию хитиновых элиситоров, подобных молекуле Nod-фактора по структуре.

Белок *LYK3* содержит все необходимые признаки рецепторной молекулы, включая и *LysM*-мотивы. Описана мутация в гене *LYK3*, приводящая к фенотипу, проявление которого зависит от структуры Nod-фактора, выделяемого штаммом ризобий (подобно фенотипу «афганских» линий гороха при инокуляции «европейскими» штаммами *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) (Smit et al., 2007). Кроме того, *LYK3* люцерны и *Sym2* гороха находятся в гомологичных районах хромосом (Gualtieri et al., 2002). Эти факты дают основание предполагать, что *LYK3* играет роль, подобную роли *Sym2* у гороха в распознавании структуры бактериального сигнала (и кодирует «рецептор проникновения», в то время как *NFP* кодирует «рецептор узнавания»). Однако экспериментальное снижение уровня экспрессии как гена *LYK3*, так и *NFP*, приводит к блоку развития инфекции лишь на стадии проникновения ризобий в корневую волосок (Limpens et al., 2003; Arrighi et al., 2006). Возможно, это связано с тем, что даже сниженный уровень экспрессии генов, кодирующих рецепторный комплекс, позволяет успешно реагировать на присутствие Nod-фактора на ранней стадии взаимодействий. В то же время для более точного распознавания структуры Nod-фактора при проникновении ризобий в корневые волоски необходимо наличие большого количества рецепторов, представляющих собой гетеродимеры *LYK3* + *NFP*, причем отсутствие любого из компонентов приводит к блоку развития инфекции.

Таким образом, у гороха и диплоидной люцерны «рецептор узнавания», осуществляющий первичное восприятие Nod-фактора, и «рецептор проникновения», ответственный за распознавание структуры Nod-фактора, вероятно, представляют собой один и тот же гетеродимерный комплекс гомологичных рецепторных киназ. Следует отметить также, что район локализации гена *LYK3* диплоидной люцерны и соответствующий ему район генома гороха, содержащий гены *Sym37* и *K1*,

очевидно, содержат и другие гомологичные гены, продукты которых также потенциально способны к связыванию липохито-олигосахаридных молекул и определению структуры Nod-фактора. Адаптивная роль функционирования *LysM*-содержащих киназ в качестве сменных субъединиц рецепторного комплекса при восприятии сигнальной молекулы микросимбионта также может быть объяснена необходимостью взаимодействия со штаммами ризобий, для которых характерна высокая вариабельность, в том числе по структуре продуцируемых Nod-факторов.

У лядвенца японского, более эволюционно удаленного от гороха и люцерны, мутации в любом из генов рецепторных киназ *NFR1* и *NFR5* приводят к отсутствию каких-либо реакций на наличие Nod-фактора в ризосфере. Этот факт указывает на различия в механизмах рецепции сигнальной молекулы у лядвенца по сравнению с горохом и диплоидной люцерной, несмотря на высокую гомологию генов, ответственных за определение специфичности взаимодействия с микросимбионтом.

Восприятие структуры бактериального Nod-фактора не является единственным механизмом контроля специфичности взаимодействия при развитии бобово-ризобиального симбиоза. Возможно, некоторую роль в определении специфичности играют выделяемые корнями бобовых растений флавоноиды (Maxwell, Phillips, 1989), а также некоторые другие низкомолекулярные соединения, вызывающие поляризацию клеток клубеньковых бактерий (A. Downie, личное сообщение). В контроле специфичности участвуют также растительные лектины, связывающиеся с полисахаридами, находящимися на поверхности бактериальных клеток, по типу «антиген-антитело» (Jones et al., 2008).

Недавно были описаны примеры клубенькообразования, индуцируемого штаммами *Bradyrhizobium* sp., которые не имеют генов синтеза Nod-фактора и поэтому не способны выделять эти сигнальные молекулы (Giraud et al., 2007). Эти штаммы были изолированы из клубеньков, образуемых водными бобовыми растениями *Aeschynomene sensitiva* (из Африки) и *A. indica* (из Северной Америки) на месте разрывов коры корня, которые заселяются ризобиями. Предполагается, что у *Aeschynomene* sp. экспрессия генов развития клубеньков активируется альтернативным путем, без участия сигнального каскада, начинающегося с рецепции Nod-фактора. Приведенный пример, впрочем, является исключением, подтверждающим необходимость (но не достаточность!) успешного распознавания структуры Nod-фактора растительными рецепторными киназами. В целом же система взаимного узнавания симбионтами друг друга представляется все более комплексной и вариабельной по мере накопления знаний о ее функционировании.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ключевым свойством симбиотических взаимоотношений микроорганизмов и растений следует считать тесную генетическую интеграцию партнеров, вследствие которой в результате функциональной интеграции генетических факторов происходит становление надорганизменной системы. Механизмы, лежащие в основе специфичности взаимодействия различных видов бобовых с клубеньковыми бактериями, имеют свои особенности, характерные для каждого вида бобовых растений. Причина возникновения этих особенностей — необходимость взаимной адаптации симбионтов друг к другу на фоне высокой вариабельности генетического материала микроорганизмов. Основой такой адаптации со стороны бобовых растений является появление новых рецепторов, осуществляющих более тонкое распознавание структуры сигнальных молекул бактерий путем возникновения новых комбинаций доменов рецепторных белков, дубликации генов рецепторов или появления новых функций у генов защитных систем растения.

Результат взаимной адаптации симбионтов друг к другу проявляется в возникновении взаимодействующих пар генов. Одним из примеров этого является взаимная супрессия мутаций, возникающих у одного из партнеров: данное явление было описано Флором и получило название «ген-на-ген»-взаимодействий (цит. по Дьяков, 1996). Развитие молекулярной генетики бобово-ризобиального симбиоза позволило очень точно описать суть событий, когда в определении специфичности взаимодействия микроорганизмов и растений реализуется схема «ген-на-ген».

Конечной целью исследования генетики бобово-ризобиального симбиоза является использование полученных знаний о симбиотических свойствах и признаках хозяйственно-ценных бобовых растений в современном адаптивном растениеводстве. Накопленные знания о механизмах контроля специфичности взаимодействия бобовых растений с клубеньковыми бактериями можно использовать для создания наиболее эффективных пар симбионтов в естественных условиях, например, комбинируя комплементарные друг другу аллели взаимодействующих генов в определенных сортах и штаммах макро- и микросимбионта.

## Благодарности

Научная деятельность авторов статьи поддержана грантами РФФИ (06-04-89000, 07-04-01171, 07-04-01558, 07-04-13566, 09-04-91054, 09-04-91293), грантом Президента РФ (НП-5399.2008.4), Государственным контрактом (02.512.11.2254) и грантом NWO 047.018.001. Особую благодарность авторы выражают Татьяне Кудрявцевой, Ольге и Анастасии Борисовым, а также Джерри Моргуласу.

## Литература

1. Борисов А. Ю., Васильчиков А. Г., Ворошилова В. А. и др., 2007. Регуляторные гены гороха посевного (*Pisum sativum* L.), контролирующие развитие азотфиксирующих клубеньков и арбускулярной микоризы: фундаментальные и прикладные аспекты // Прикладная биохимия и микробиология. Т. 43. № 3. С. 265–271.
2. Дьяков Ю. Т., 1996. Пятьдесят лет теории «ген-на-ген» // Успехи совр. биол. Т. 116. № 3. С. 293–305.
3. Проворов Н. А., Борисов А. Ю., Тихонович И. А., 2002. Сравнительная генетика и эволюционная морфология симбиозов растений с микробами-азотфиксаторами и эндомикоризными грибами // Журн. общ. биол. Т. 63. № 6. С. 451–472.
4. Разумовская З. Г., 1937. Образование клубеньков у различных сортов гороха // Микробиология. Т. 6. № 3. С. 321–328.
5. Тихонович И. А., Борисов А. Ю., Цыганов В. Е. и др., 2005. Интеграция генетических систем растений и микроорганизмов при симбиозе // Успехи совр. биол. Т. 125. № 3. С. 227–238.
6. Четкова С. А., Тихонович И. А., 1986. Выделение и исследование штаммов *Rhizobium leguminosarum*, эффективных на горохах афганского происхождения // Микробиология. Т. 55. С. 143–147.
7. Штарк О. Ю., Данилова Т. Н., Наумкина Т. С. и др., 2006. Анализ исходного материала гороха посевного (*Pisum sativum* L.) для селекции сортов с высоким симбиотическим потенциалом и выбор параметров для его оценки // Экол. генетика. Т. 4. № 2. С. 22–28.
8. Albrecht C., Geurts R., Bisseling T., 1999. Legume nodulation and mycorrhizal formation; two extremes in host specificity meet // The EMBO Journal. Vol. 18. N 2. P. 281–288.
9. Arrighi J. F., Barre A., Ben Amor B. et al., 2006. The *Medicago truncatula* lysin motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes // Plant Physiol. Vol. 142. N 1. P. 265–279.
10. Celik I., Ortas I., Kilic S., 2004. Effects of compost, mycorrhiza, manure and fertilizer on some physical properties of a Chromoxerert soil // Soil and Tillage Research. Vol. 78. P. 59–67.
11. Denarie J., Debelle F., Prome J. C., 1996. Rhizobium Lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis // Annu. Rev. Biochem. Vol. 65. P. 503–535.
12. Geurts R., Heidstra R., Hadri A.-E. et al., 1997. *Sym2* of *Pisum sativum* is involved in Nod factor perception mechanism that controls the infection process in the epidermis // Plant Physiol. Vol. 115. N 2. P. 351–359.
13. Giraud E., Moulin L., Vallenet D. et al., 2007. Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia // Science. Vol. 316. N 5829. P. 1307–1312.

14. Goetz R., Evans I. J., Downie J. A., Johnston A. W. B., 1985. Identification of the host-range DNA which allows *Rhizobium leguminosarum* strain TOM to nodulate cv. Afghanistan peas // Mol. Gen. Genet. Vol. 201. N 2. P. 296–300.
15. Gualtieri G., Kulikova O., Limpens E. et al., 2002. Microsynteny between pea and *Medicago truncatula* in the SYM2 region // Plant Mol. Biol. Vol. 50. N 2. P. 225–235.
16. Jones K. M., Sharopova N., Lohar D. P. et al., 2008. Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 105. N 2. P. 704–709.
17. Kozik A. V., Heidstra R., Horvath B. et al., 1995. Pea lines carrying sym1 or sym2 can be nodulated by *Rhizobium* strains containing *nodX*; *sym-1* and *sym-2* are allelic // Plant Sci. Vol. 108. P. 41–49.
18. Lie T. A., 1978. Symbiotic specialization in pea plants: the requirement of specific *Rhizobium* strains for peas from Afghanistan // Ann. Appl. Biol. Vol. 88. P. 462–465.
19. Lie T. A., 1984. Host genes in *Pisum sativum* L. conferring resistance to European *Rhizobium leguminosarum* strains // Plant Soil. Vol. 82. P. 415–425.
20. Limpens E., Franken C., Smit P., et al., 2003. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection // Science. Vol. 302. N 5645. P. 630–633.
21. Limpens E., Mirabella R., Fedorova E. et al., 2005. Formation of organelle-like N<sub>2</sub>-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2 // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Vol. 102. N 29. P. 10375–10380.
22. MacLean A. M., Finan T. M., Sadowsky M. J., 2007. Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes // Plant Physiol. Vol. 144. N 2. P. 615–622.
23. Madsen E. B., Madsen L. H., Radutoiu S. et al., 2003. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals // Nature. Vol. 425. N 6958. P. 637–640.
24. Maxwell C., Phillips D. A., 1989. A chalcon and two related flavonoids release from alfalfa roots induce *nod* gene of *Rhizobium meliloti* // Plant Physiol. Vol. 91. P. 842–847.
25. Micheltore R. W., Meyers B. C., 1998. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process // Genome Res. Vol. 8. N 11. P. 1113–1130.
26. Oldroyd G. E., Downie J. A., 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes // Annu. Rev. Plant Biol. Vol. 59. P. 519–546.
27. Ovtstyna A. O., Schultze M., Tikhonovich I. A. et al., 2000. Nod factors of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and their fucosylated derivatives stimulate a nod factor cleaving activity in pea roots and are hydrolyzed in vitro by plant chitinases at different rates // Mol. Plant Microbe Interact. Vol. 13. N 8. P. 799–807.
28. Parniske M., 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses // Nat. Rev. Microbiol. Vol. 6. N 10. P. 763–775.
29. Radutoiu S., Madsen L. H., Madsen E. B. et al., 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases // Nature. Vol. 425. N 6958. P. 585–592.
30. Radutoiu S., Madsen L. H., Madsen E. B. et al., 2007. LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and *Nfr* genes extend the symbiotic host range // EMBO J. Vol. 26. N 17. P. 3923–3935.
31. Sagan M., Huguet T., Duc G., 1994. Phenotypic characterization and classification of nodulation mutants of pea (*Pisum sativum* L.) // Plant Sci. Vol. 100. N 1. P. 59–70.
32. Smit P., Limpens E., Geurts R. et al., 2007. *Medicago LYK3*, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling // Plant Physiol. Vol. 145. N 1. P. 183–191.
33. Zhukov V., Radutoiu S., Madsen L. H. et al., 2008. The pea *Sym37* receptor kinase gene controls infection thread initiation and nodule development // Mol. Plant Microbe Interact. Vol. 21. N 12. P. 1600–1608.

#### The genetic control of specificity of interactions between legume plants and nodule bacteria

Zhukov V. A., Rychagova T. S., Shtark O. Y., Borisov A. Y., Tikhonovich I. A.

✿ **SUMMARY:** The genetic control of signal interactions between partners during formation legume-rhizobial symbiosis is examined. The ability of legumes to perceive the signal molecules (Nod-factors) excreting by nodule bacteria appears to be the base of these interactions. The diversity of receptor kinases in legume plants reflects the specificity of interactions with diverse strains of nodule bacteria.

✿ **KEY WORDS:** legume-rhizobial symbiosis, specificity of signal interactions, Nod-factor, receptor kinases, *Pisum sativum*.

#### Информация об авторах:

Жуков Владимир Александрович, младший научный сотрудник. E-mail: zhukoff01@yahoo.com.

Рычагова Тамара Сергеевна, стажер-исследователь. E-mail: rytotia@googlemail.com.

Штарк Оксана Юрьевна, старший научный сотрудник. E-mail: oshtark@yandex.ru.

Борисов Алексей Юрьевич, заведующий лабораторией генетики растительно-микробных взаимодействий. E-mail: ayborisov@yandex.ru.

Тихонович Игорь Анатольевич, академик РАСХН, директор. E-mail: arriam@arriam.spb.ru.

Общая информация: ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, 196608, Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш. Подбельского, 3.