

СИМБИОГЕНЕТИКА

А.О. Овцына, И.А. Тихонович

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, г. Пушкин

✿ Почвенные бактерии ризобии вступают в азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями. Взаимное узнавание партнеров и инициация образования симбиотического органа — клубенька происходят путем обмена молекулярными сигналами. В обзоре представлены последние о структурном разнообразии, генетическом контроле синтеза и функциональной роли Nod-факторов ризобий. Обсуждается возможность использования флавоноидов и Nod-факторов в практике сельского хозяйства.

✿ **Ключевые слова:** симбиоз, азотфиксация, клубеньковые бактерии, Nod-факторы, флавоноиды, сигнальные молекулы.

СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И ВОЗМОЖНОСТЬ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ, ИНИЦИИРУЮЩИХ РАЗВИТИЕ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА

ВВЕДЕНИЕ

Почва является средой обитания множества микроорганизмов как полезных, так и вредных для растения. Растения находятся в постоянном общении с почвенной микрофлорой и должны четко распознавать потенциальных «врагов» и «друзей». Процесс взаимного узнавания между микробами и растениями происходит путем обмена так называемыми сигнальными молекулами — специфическими веществами, секретируемыми в среду, действующими в малых концентрациях и способными вызывать каскад ответных реакций у организма-партнера. Наиболее полно сигнальные взаимодействия между микробами и растениями изучены в процессе становления симбиоза между бобовыми растениями и почвенными бактериями, относящимися к семейству *Rhizobiaceae*, так называемыми ризобиями. В результате этого симбиоза на корнях бобовых растений образуются новые органы — клубеньки, в которых видоизмененные ризобии фиксируют атмосферный азот, переводя его в доступную для утилизации растениями форму (см. обзоры [75, 92, 102]). Процесс биологической фиксации азота имеет огромное значение, так как он представляет собой единственную альтернативу химическому производству связанного азота в виде азотных удобрений — дорогостоящих и экологически небезопасных продуктов. Полученные за последние два десятилетия сведения о молекулярных механизмах бобово-ризобияльного симбиоза позволяют воздействовать на этот процесс и уже сейчас практически помогают повысить эффективность симбиотической азотфиксации и увеличить долю биологического азота в сельском хозяйстве.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА РАННИХ СТАДИЯХ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА

Симбиоз между клубеньковыми бактериями и бобовыми растениями начинается с колонизации бактериями корней и прикрепления бактерий к корневым волоскам. Под воздействием бактерий корневые волоски скручиваются и образуют так называемый инфекционный карман, через который ризобии проникают внутрь клетки волоска и образуют тубулярные структуры — инфекционные нити. Одновременно с этим начинают делиться клетки кортекса корня, образуя примордий клубенька. Инфекционные нити растут по направлению к клубеньковому примордию. Достигнув его, они высвобождаются в клетки будущего клубенька и дифференцируются в бактериоиды — специфическую форму, способную фиксировать атмосферный азот [26, 69, 103]. Бобово-ризобияльный симбиоз — это специфический процесс. Ризобии, образующие клубеньки на вике и

горохе, не могут вступить в симбиоз с люцерной, и наоборот. Как оказалось, хозяйская специфичность симбиоза определяется структурой молекул, участвующих во взаимодействии между бактерией и растением, и, в основном, именно структурой сигнальных молекул, действующих на самых ранних этапах этого взаимодействия [50, 103]. Рассмотрим этот процесс в деталях.

**РОЛЬ РАСТИТЕЛЬНЫХ ФЛАВОНОИДОВ
В ИНДУКЦИИ СИМБИОТИЧЕСКОГО
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ**

Инициаторами молекулярного диалога между растением и ризобиями выступают флавоноиды — вещества фенольной природы, выделяемые растениями и обозначающими близкое присутствие потенциального растения-хозяина [34] (рис. 1). Эти вещества выступают как хемоаттрактанты и стимулируют таксис бактерий к растениям. Однако более интересно то, что специфические флавоноиды узнаются бактериальным белком NodD, находящимся в мембране бактерий, и в комплексе с этим белком активируют транскрипцию ряда бактериальных симбиотических генов (*nod*, *nol*, *noe* генов) [34, 75, 92]. Следует отметить, что белок NodD каждого конкретного вида ризобий вызывает индукцию ризобияльных генов только в сочетании с определенными специфическими флавоноидными индукторами. Так, например, лютеолин и кверцитин, содержащиеся в корневых выделениях люцерны, пажитника и донника, взаимодействуют с белком NodD и индуцируют экспрессию *nod*-генов бактерий *Sinorhizobium meliloti* — симбионтов этих растений. Флавоноиды нарингенин и апигенин из корневых выделений гороха и вики максимально активируют *nod*-гены *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* — симбионтов именно этих растений. Изофлавоны генистеин и дайдзеин индуцируют *nod*-гены *Bradyrhizobium japonicum*, симбионта сои, но при этом подавляют экспрессию *nod*-генов у ризобий — симбионтов гороха [32]. С другой стороны, некоторые индукторы из корневых эксудатов вики и го-

роха способны индуцировать *nod*-гены неспецифического хозяина — люцерны, хотя и не до максимального уровня [119], а эксудат клевера способен частично активировать *nod*-гены ризобий — симбионтов гороха и люцерны [98]. Таким образом, хотя взаимодействие каждой аллели гена *nodD* происходит специфически и наиболее эффективно с подходящим растением-хозяином, на этом этапе еще возможна частичная индукция *nod*-генов флавоноидами гетерологичных хозяев. Специфичность взаимодействия повышается, а круг возможных хозяев сужается на следующей стадии становления симбиоза, на которой в процесс включаются бактериальные сигналы — Nod-факторы (от «nodulation» — клубенькообразование) — очередные участники молекулярного диалога, теперь уже со стороны бактерий [26, 75, 103].

**ОТКРЫТИЕ NOD-ФАКТОРОВ
И ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ**

Nod-факторы были впервые описаны в 1990 году, когда удалось сконструировать штамм-суперпродуцент этих молекул, что позволило их выделить в количествах, достаточных для определения структуры [56]. Затем в течение последующих 10 лет стало известно практически все о генетическом контроле синтеза, биологическом разнообразии этих молекул в ризобиях и о реакциях, вызываемых ими в растениях. В чем же состоит функция этих весьма специфичных молекул, и почему они оказались объектом такого активного изучения?

Еще в 1900 году было показано, что водные, очищенные от бактерии фильтраты зрелых клубеньков гороха вызывают на корнях гороха индукцию образования корневых волосков, сопровождающуюся их деформациями. Несколько позже было установлено, что деформирующая активность содержится в фильтратах отдельно выращиваемых ризобий [65]. Эти результаты были подтверждены многими исследователями, но природа вещества долгое время оставалась неизвестной, хотя было ясно, что это не индолилуксусная кислота, а вещество,

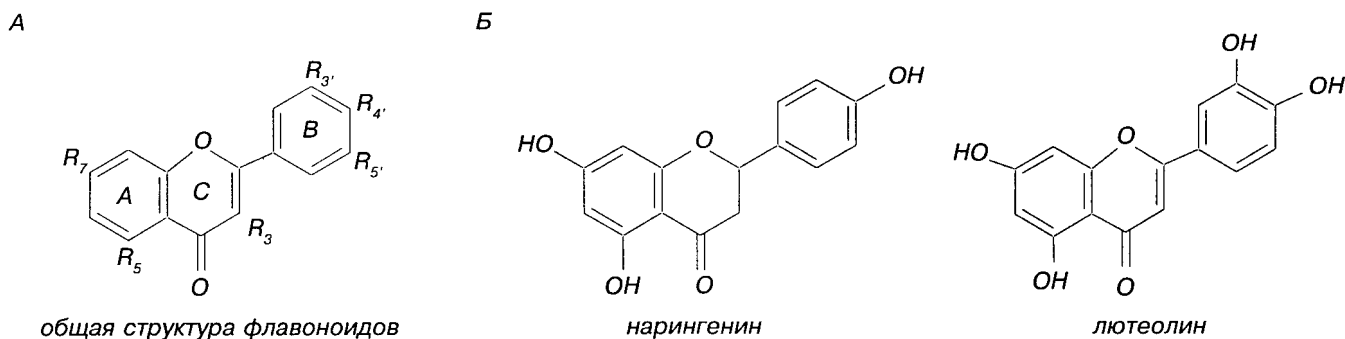


Рис. 1. Структура флавоноидов. А — общая структура флавоноидов. R — варьирующая заместители. Б — нарингенин — индуктор *nod*-генов *R. leguminosarum* *bv. viciae*, лютеолин — индуктор *nod*-генов *S. meliloti*

специфичное для бобово-ризобияльного симбиоза. В начале 80-х годов XX века Van Brussel с соавторами возродили интерес к этой проблеме, показав, что изменение морфологии корней и корневых волосков зависит от присутствия в бактерии так называемой симбиотической плазмиды (pSym) ризобий [110]. Было показано, что стерильные фильтраты бактерий, индуцированных флавоноидами, вызывают деформации корневых волосков, увеличение количества волосков и индукцию меристематических делений в корнях растений-хозяев. Такая биологическая активность фильтратов коррелировала с присутствием у бактерий *nod*-генов, находящихся на Sym-плазмиде. Позже эксперименты с очищенными Nod-факторами позволили детально охарактеризовать их биологическую активность на корнях растений-хозяев.

Было показано, что добавление Nod-факторов к корням растений в концентрации 10^{-8} – 10^{-12} М вызывает массовые деформации корневых волосков и индукцию клеточных делений клеток коры корня [46, 92, 103]. Под воздействием Nod-факторов происходит деполяризация мембран корневых волосков [28, 31], изменение потоков ионов H^+ и Ca^{2+} через мембрану, регулярные осцилляции концентрации внутриклеточного кальция [29, 31], индукция течения цитоплазмы, перестройка цитоскелета и реинициация полярного роста кончика корня [15, 69]. Nod-факторы запускают работу ряда растительных генов, включение которых четко коррелирует с ранними стадиями симбиоза [4, 68], а также основных генов флавоноидного биосинтеза [82, 91]. Роль Nod-факторов в образовании корневых клубеньков была убедительно доказана на многих видах растений. Эти липохито-олигосахариды при воздействии на корни в отсутствие бактерий индуцируют образование примордия клубенька — ткани, где реиницируются клеточные деления и начинается рост клубенька, а в некоторых случаях и образование «пустых» (не содержащих бактерий) клубеньков. [109]. Кроме участия в индукции развития клубенька, митогенные липохитоолигосахариды вызывают образование структур, названных преинфекционными нитями, — цитоплазматических тяжелей, пронизывающих внешнюю кору корня [112]. При этом клетки коры корня вступают в новую фазу клеточного цикла и редиференцируются, образуя ткани клубенька [89]. Действие Nod-факторов, по-видимому, опосредуется растительными гормонами, поскольку псевдоклубеньки на корнях люцерны можно получить путем обработки корней ингибиторами транспорта ауксинов и флавоноидами [47, 48], а в процессе клубенькообразования происходит экспрессия генов, вовлеченных в транспорт ауксина [20]. Возможность индукции клубенькообразования в отсутствие Nod-факторов говорит о том, что программа развития клубенька уже существует в растении, а Nod-факторы играют роль триггеров, ее запускающих. Предполагается, что програм-

ма органогенеза клубенька произошла от более древнего процесса образования боковых корней [49].

СТРУКТУРА NOD-ФАКТОРОВ И ИХ РОЛЬ В ХОЗЯЙСКОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ СИМБИОЗА

Nod-факторы производятся ризобиями в ответ на индукцию растительными флавоноидами. Их синтез контролируется бактериальными *nod*, *nol* и *noe*-генами, которые активируются комплексом NodD белок-флавоноид. Структура Nod-факторов к настоящему времени проанализирована у нескольких десятков таксономически различных ризобий (таблица). Все Nod-факторы имеют сходную общую структуру и представляют собой олигомеры хитина (от трех до шести остатков N-ацетилглюкозамина), несущие на нередуцирующем конце специфическую жирную кислоту и ряд заместителей (ацетил, сульфат, карбамоил, фукозил и некоторые другие) в других позициях углеродного скелета [26, 75, 92, 103] (рис. 2, таблица). Именно химическая структура Nod-факторов определяет способность ризобий заражать растение определенного вида. Так, ризобии — симбионты гороха и вики производят Nod-факторы с полиненасыщенной жирной кислотой C18:4 (18 атомов углерода и четыре двойные связи) и с ацетильной группой на нередуцирующем конце [99]; ризобии — симбионты люцерны синтезируют Nod-факторы с сульфатной группой на редуцирующем конце и с другой специфической жирной кислотой (C16:2) [56]; Nod-факторы ризобий — симбионтов сои несут неспецифическую жирную кислоту C18:1 — наиболее широко распространенный в ризобиях липид- и метилфукозу [16, 88] (рис. 2, таблица). Изменение структуры Nod-факторов путем добавления или удаления этих заместителей приводит к изменению хозяйской специфичности ризобий. Так, удаление сульфатной группы с Nod-факторов симбионтов люцерны приводит к тому, что эти бактерии теряют способность заражать люцерну, но приобретают способность инфицировать вику, природные симбионты которой производят несulfатированные Nod-факторы [86]. Симбионты гороха, получая дополнительную модификацию Nod-факторов в виде фукозы на редуцирующем конце, приобретают способность инфицировать тропическое бобовое растение сиратро [61]. Таким образом, структура Nod-факторов является важнейшей детерминантой хозяйской специфичности симбиоза. Как правило, каждый штамм ризобий производит целый спектр Nod-факторов. Широта этого спектра коррелирует с количеством возможных растений-хозяев бактерии. Так, например, штамм NGR234, производя набор из 18 Nod-метаболитов, способен заражать огромный спектр растений — 112 различных родов [79, 81].

Таблица

Круг растений-хозяев ризобий и структура их Nod-факторов (по [73], модифицировано)

Вид (штамм) бактерии	Трибы инфицируемых растений	Остатки GlcNAc, n	Заместители на коровой структуре ^{a, b}	Ссылки
<i>R. leguminosarum</i>				
bv. <i>viciae</i> RBL5560	Viciaeae	3, 4, 5	R4=Ac, C18:4	[100]
bv. <i>viciae</i> TOM	Viciaeae	3, 4, 5	R4=Ac, R5=Ac, C18:4	[33]
bv. <i>viciae</i> Al	Viciaeae	3, 4, 5	R4=Ac, R5=Ac, C18:4, C18:3	[71]
bv. <i>trifolii</i> ANU843	Trifolieae	3, 4, 5	R4=Ac, R5=Ac, R6=Et, C20:4, C20:3, C18:3	[113]
<i>S. meliloti</i>	Trifolieae	3, 4, 5	R4=Ac, R5=S, C16:2, C16:3, C18-C26(ω-1)OH	[23, 24, 56]
<i>R. galegae</i>	Galegeae	4, 5	R4=Cb, R9=Ac, C18:2, C18:3, C20:2, C20:3	[118]
<i>M. huakuii</i>	Galegeae	3, 4, 5	R5=S, R7=Ac/G, C18:4	[118]
<i>M. loti</i>				
E1R, NZP2235, NZP2238	Loteae, Genisteae	4, 5	R1=Me, R3=Cb, R5=AcFuc	[59]
NZP2037	Loteae, Genisteae	4, 5	R1=Me, R2=Cb, R3=Cb, R5=AcFuc	[60]
NZP2213	Loteae	2, 3, 4, 5	R1=Me, R3=Cb, R5=AcFuc/Fuc, R9=Fuc, C20:1, C20:0, C22:	[70]
<i>B. aspalatii</i> bv. <i>carinosa</i>	Crotalariaeae	3, 4, 5	R1=Me, R3=Cb, R4=Cb	[10]
<i>B. japonicum</i> USDA110	Phaseoleae	5	R5=MeFuc	[88]
<i>B. japonicum</i> USDA135	Phaseoleae	5	R4=Ac, R5=MeFuc	[16]
<i>B. elkanii</i> USDA61	Phaseoleae	4, 5	R1=Me, R4=Ac, R3=Cb, R5=MeFuc/Fuc, R6=Gro	[16]
<i>R. etli</i> CE3, CFN42	Phaseoleae	4, 5	R1=Me, R3=Cb, R5=AcFuc/Fuc	[13, 74, 78]
<i>R. etli</i> KIM5s ^c	Phaseoleae	5, 6	R1=Me	[74]
<i>R. giardinii</i> bv. <i>giardinii</i> H152	Phaseoleae	4, 5	R1=Me, R4=Cb, R5=S/Ac, C20:0	[97]
<i>R. tropici</i>	Phaseoleae, Mimoseae	4, 5	R1=Me, R5=S, R6=Man	[35, 77]
<i>S. fredii</i>	Phaseoleae	3, 4, 5	R5=MeFuc/Fuc	[6, 40]
<i>S. fredii</i> USDA257 ^d	23 tribes	3, 4, 5	R5=MeFuc/Fuc	[40, 79]
<i>R. sp.</i> NGR234	26 tribes	4, 5	R1=Me, R2=Cb, R3=Cb, R4=Cb, R5=MeFuc/AcMeFuc/SmeFuc	[79]
<i>Rhizobium sp.</i> GRH2	Acacieae	4, 5, 6	R1=Me, R5=S	[60]
<i>S. teranga</i> bv. <i>acacieae</i>	Acacieae	5	R1=Me, R3 or R4=Cb, R5=S	[62]
<i>Mesorhizobium</i> ORS1001	Acacieae	5	R1=Me, R3 or R4=Cb, R5=S	[62]
<i>A. caulinodans</i>	Robinieae	4, 5	R1=Me, R4=Cb/H, R5=Fuc, R8=Ara	[67]
<i>S. saheli</i>	Robinieae	4, 5	R1=Me, R3 or R4=Cb, R5=Fuc, R8=Ara	[63]
<i>S. teranga</i> bv. <i>sesbaniae</i>	Robinieae	4, 5	R1=Me, R3 or R4=Cb, R5=Fuc, R8=Ara	[63]

Примечания: ^a как правило, Nod-факторы производятся в виде смеси молекул, часть из которых имеет неполный набор заместителей; в случае отсутствия заместителя на его месте находится атом водорода.

^b указаны только специфические ацильные группы; большинство видов ризобий производят Nod-факторы с распространенными жирными кислотами (C18:0, C18:1, C16:0, C16:1).

^c GlcNAc частично замещен на GlcN. ^d у штаммов *S. fredii* USDA191 и USDA257DH4 GlcNAc частично замещен на глюкозу.

Сокращения: Me, N-метил; Cb, O-карбамоил; Ac, O-ацетил; S, O-сульфат; Fuc, O-фукозил; MeFuc, 2-O-метилфукозил; AcMeFuc, 4-O-ацетилированный 2-O-метилфукозил; SMeFuc O-сульфатированный 2-O-метилфукозил; Et, этил; Gro, глицерид; Man, маннозил; G, N-гликолил.

С другой стороны, известны случаи, когда модификации на скелете Nod-факторов не являются строго необходимыми для заражения растения-хозяина, но оптимизируют процесс клубенькообразования [75].

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СИНТЕЗА NOD-ФАКТОРОВ

К настоящему времени установлены функции белковых продуктов большинства генов, участвующих в синтезе Nod-факторов [75, 92, 102, 103] (рис. 2).

Мономерные предшественники Nod-факторов производятся из фруктозо-6-фосфата под действием глюкозаминсинтазы NodM [2]. Основная структура Nod-факторов синтезируется белками NodA, NodB и NodC. Белок NodC является хитоолигосахаридсинтазой, синтезирующей олигомеры Nod-факторов размером до 5 остатков ацетилглюкозамина [22, 39]. Белок NodB деацетирует терминальный передупорядочивающий ацетилглюкозамин [54], а белок NodA присоединяет жирную кислоту к этому глюкозамину [1, 85].

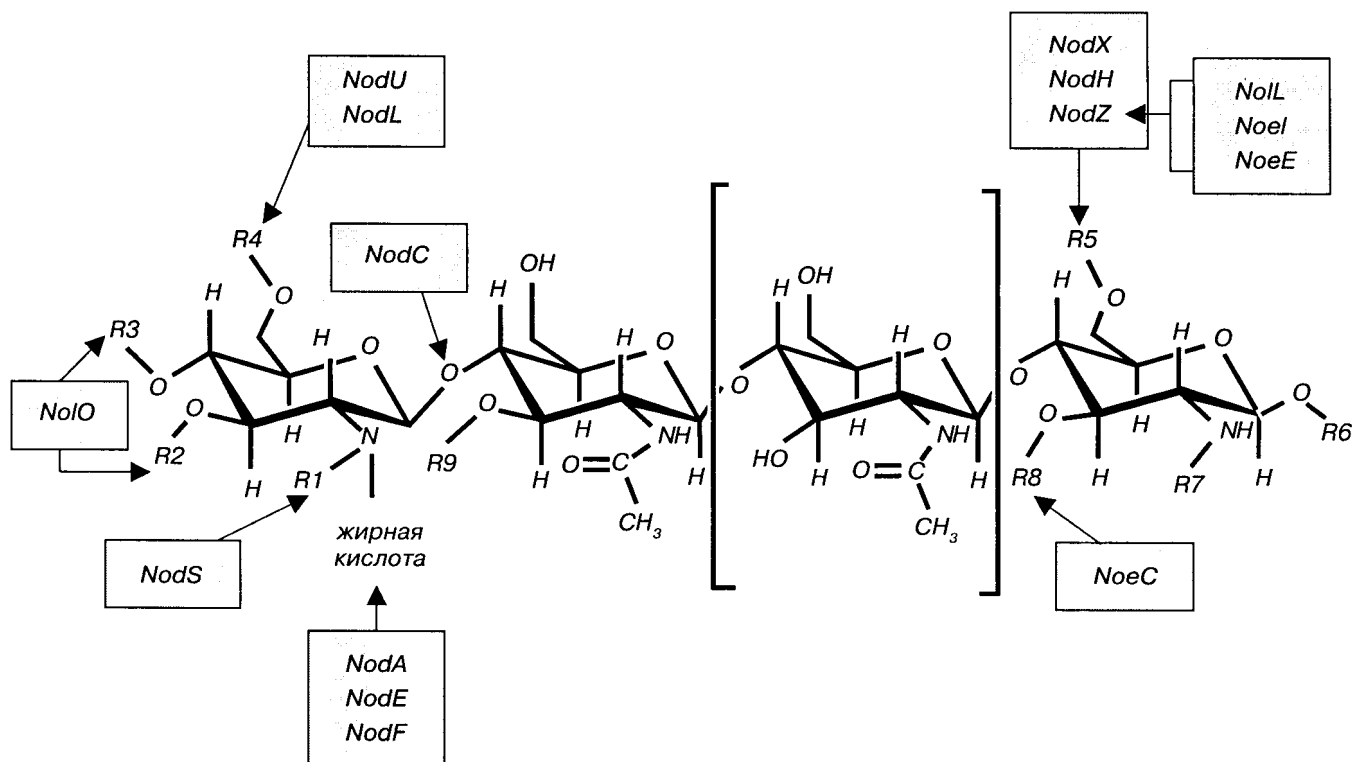


Рис. 2. Общая структура Nod-факторов ризобий и белковые продукты nod-генов, участвующие в их синтезе. R1–R9 — заместители на коревой структуре Nod-факторов; Nod, Noe, Nol — белки, задействованные в синтезе Nod-факторов

Следующая группа белков участвует в специфической модификации олигосахаридного скелета. Белки NodL, NodX, NolL представляют собой O-ацетилтрансферазы, каждая из которых ацетирует Nod-факторы в определенном положении [8, 33, 36]. Сульфотрансфераза NodH переносит сульфатную группу на редуцирующий конец фактора [86]. Донор сульфата — 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат (ФАФС) синтезируется комплексом из белков NodP (АТФ-сульфурилаза) и NodQ (АФС-киназа) [86, 93]. Другая сульфотрансфераза — NoeE специфически сульфатирует фукозный заместитель на Nod-факторе [44]. Метильная группа переносится на нередуцирующий конец Nod-фактора от S-аденозил-метионина (SAM) N-метилтрансферазой NodS [38, 52]. Белок NodZ присоединяет к редуцирующему концу N-глюкозамина остаток 2-O-метилфукозы [61, 66, 104]. Предшественник фукозы — ГДФ-фукоза синтезируется, по-видимому, продуктом гена *nolK*. Добавление D-арабинозы к Nod-факторам осуществляется белком NoeC [66]. Белок NodU присоединяет карбамоильную группу на нередуцирующий конец Nod-фактора [19].

Белки NodE (кетоацилсинтаза) и NodF (ацилтрансфераза) необходимы для синтеза высоконасыщенной ацильной цепи на нередуцирующем конце Nod-фактора [23, 85, 99]. Длина молекулярной цепи и степень

насыщенности жирной кислоты определяет межвидовые и даже внутривидовые различия в хозяйской специфичности ризобий [9, 100]. Различия в структуре ацильной цепи, по-видимому, зависят от субстратной специфичности кетоацилсинтазы NodE [9]. Белок NodG гомологичен редуктазе и может вовлекаться в модификацию жирной кислоты [96].

Синтезированные бактерией Nod-метаболиты накапливаются вначале внутри клеток, а затем секретируются в среду с помощью белков NodI и NodJ [14, 30, 101, 116]. Достигнув растения, Nod-факторы связываются с рецепторами, находящимися в клеточной стенке растений и в растительной мембране и накапливаются там [17, 41–43]. Совсем недавно были клонированы гены, ортологичные для нескольких видов бобовых и кодирующие киназы, сходные с рецепторами. Предполагается, что белковые продукты этих генов участвуют в связывании Nod-факторов и в запуске сигнального каскада, ведущего к развитию инфицированного клубенька (обзоры [18, 55, 57]). Идентификация рецепторов Nod-факторов стала большим прорывом в изучении механизмов растительно-микробных взаимодействий, и в этой области ожидаются новые открытия. Например, поскольку Nod-факторы были обнаружены внутри зрелых клубеньков, остается открытым вопрос об их возможном участии и функциях на поздних стадиях симбиоза [108].

СТРУКТУРНЫЕ АНАЛОГИ NOD-ФАКТОРОВ
КАК ВОЗМОЖНЫЕ ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ
РАЗВИТИЯ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ

В последнее время активно обсуждается вопрос о том, существуют ли молекулы, по структуре сходные с Nod-факторами, в растениях и в животных [102, 114]. Поскольку Nod-факторы по своему действию сходны с действием гормонов и активны на растительных клетках, то можно предположить, что подобные молекулы существуют и в самих растениях. Имеется масса интересных данных, свидетельствующих в пользу этого предположения. Например, введение в растения табака генов, контролирующих ферменты синтеза Nod-факторов, — белков NodB (хитоолигосахаридацетилаза) и NodA (ацилтрансфераза), приводит к серьезным изменениям в развитии и морфологии растения [90]. Добавление Nod-факторов или хитиназы восстанавливают нормальное развитие эмбрионов у температурочувствительных соматических эмбрионных мутантов моркови [21]. Недавно выяснилось, что соматический эмбриогенез у моркови контролируется модифицированными N-ацетилглюкозамин (мономер, из которого состоит скелет Nod-факторов) и глюкозамин-содержащими арабиногалактановыми белками [115]. Добавленные извне Nod-факторы, хитотетраоза или хитиназа способствовали развитию соматических эмбрионов в культуре клеток норвежской ели [27]. Все эти факты говорят об участии эндогенных хитоолигосахаридов, сходных по структуре с Nod-факторами, в эмбриогенезе и развитии растений. Более того, появились данные о том, что подобные молекулы могут содержаться и в тканях позвоночных животных. Так, ризобияльный белок NodC, отвечающий за олигомеризацию углеродного скелета Nod-фактора, имеет большое сходство с белком DG42, активным на определенной стадии раннего эмбриогенеза лягушки, рыб и мыши [87, 95]. Данный белок работает *in vitro* как хитинолигосахаридсинтаза [95]. Хроматографический и ферментативный анализ экстрактов из эмбрионов циприноидных рыб показал, что на стадии поздней гаструляции в организме рыб синтезируются хитоолигосахариды. Микроинъекции антител к белкам DG42, NodZ (фукозилтрансферазы, модифицирующей Nod-факторы), а также хитиназы в оплодотворенные яйца рыб приводят к тяжелым нарушениям в развитии хвоста и туловища эмбрионов рыб [3]. Следовательно, молекулы, структурно сходные с ризобияльными Nod-факторами, играют важную роль в развитии эмбрионов не только растений, но и позвоночных животных.

ВОЗМОЖНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ

1. Флавоноиды

Флавоноиды, синтезируемые через фенилпропаноидный путь биосинтеза, являются сильнейшими стимуляторами ризобияльных генов, необходимых для симбиоза [32, 76, 83]. Многими исследователями было показано, что добавление флавоноидов к среде для культивирования ризобий повышает способность ризобий к клубенькообразованию. Особенно этот эффект проявляется, если растения инокулируются ризобиями в субоптимальных условиях — при пониженной температуре, повышенной кислотности почв и т. п. [7, 120]. Причину этого стимулирования можно объяснить, исходя из нескольких механизмов действия флавоноидов. Во-первых, повышенные концентрации флавоноидов усиливают синтез бактериальных Nod-факторов, которые, в свою очередь, индуцируют еще большую продукцию флавоноидов ризобиями [82, 91, 111]. В результате такой положительной авторегуляции возрастает общее количество сигнальных молекул, необходимых для симбиоза. Во-вторых, флавоноиды оказывают непосредственный эффект на растения — действуют как ингибиторы транспорта ауксинов и участвуют в закладке сайта образования клубенька [11, 47, 53, 64]. Кроме того, флавоноиды усиливают колонизацию корней бобовых микоризными грибами, что приводит к улучшению фосфорного питания растений и способствует клубенькообразованию [117, 120]. Поскольку флавоноиды довольно стабильны и их можно производить в больших масштабах с относительно невысокими затратами, они стали первыми веществами из сигнальных молекул, которые попытались применить в практике сельского хозяйства. Коммерческий продукт «SoyaSignal» поступил на рынок Северной Америки около четырех лет назад. По результатам шестилетних полевых испытаний в Канаде и США оказалось, что он значительно повышает эффективность азотфиксации у сои, давая прибавку в урожае в среднем на 7%. Как и ожидалось, наиболее сильный эффект наблюдался в годы с холодной весной, когда посевные температуры были ниже 17°C (цит. по [12]).

2. Nod-факторы

Добавление очищенных Nod-факторов к бобовым растениям в вегетационных экспериментах также оказывает стимулирующее влияние на симбиоз растений как с ризобиями, так и с микоризой. В некоторых случаях, однако, наблюдается подавление

клубенькообразования в присутствии большего, чем требуется растению, количества Nod-факторов [51]. Тем не менее Nod-факторы абсолютно необходимы для развития симбиоза с ризобиями и их присутствия бывает достаточно для восстановления способности к клубенькообразованию у Nod-мутантов ризобий [84]. Однако в отличие от флавоноидов, производство Nod-факторов пока еще не вышло на промышленный уровень, поскольку их очистка — процесс весьма дорогостоящий. Кроме того, Nod-факторы быстро разрушаются в ризосфере растительными хитиназами и становятся неактивными [46, 72, 105, 106]. Попытки сделать их устойчивыми к хитиназам за счет модификаций углеродного скелета (в частности, путем деацетилирования) зачастую приводят к тому, что они теряют свою биологическую активность. Весьма вероятно, что гидролиз Nod-факторов хитиназами представляет собой регуляторный механизм, необходимый для нормального развития симбиоза, поскольку он позволяет избежать избыточной стимуляции корней этими молекулами и блокирования клубенькообразования из-за слишком высокой концентрации Nod-факторов [51]. С другой стороны, устойчивость Nod-факторов к хитиназам, коррелирующая с более высокой биологической активностью, повышается с увеличением количества заместителей на их углеродном скелете, таких как сульфат, ацетил, фукозил [72, 105, 106]. Получение дополнительно модифицированных молекул стало возможным после установления функций ризобияльных генов, контролирующих синтез Nod-факторов, и очистки ферментов — продуктов этих генов. Так, например, можно выделить Nod-факторы из ризобияльного штамма-суперпродуцента, очистить их, а затем модифицировать *in vitro* с помощью бактериальных белков, например, добавить ацетильную группу с помощью белка NodL или фукозильную группу с помощью белка NodZ [8, 61, 72]. Однако как уже отмечалось, такие эксперименты слишком дорогостоящи и проводятся пока лишь в лабораторных масштабах, и поэтому на сегодняшний день представляется маловероятным производство и модификация природных Nod-факторов для масштабной обработки ими семян.

Другой способ получения Nod-факторов — химический синтез их аналогов — осуществлен уже несколькими лабораториями [24, 37, 107]. Сейчас синтетические липохитоолигосахариды (в том числе меченые флюоресцентными и радиоактивными метками) используются в основном в научных целях — для поиска рецепторов Nod-факторов у растений, для изучения путей передачи сигнала от Nod-факторов к растительным генам [17, 37, 41–43]. Тем не менее по-

явились первые сведения об успешном применении синтетических Nod-факторов в сельском хозяйстве. Достаточно «простые» синтетические аналоги Nod-факторов — тетрамеры хитина с ненасыщенной жирной кислотой и несколькими заместителями — показали эффект стимуляции азотфиксации и клубенькообразования при применении в полевых условиях на сое, выращиваемой в Бразилии (W.J. Broughton, личное сообщение). Эффект таких молекул, скорее всего, неспецифичен и имеет больше сходства с позитивным действием хитина и хитозана, которые индуцируют иммунитет растений, приводя к повышению их устойчивости к патогенам [45]. Кроме того, недавно было обнаружено, что добавление Nod-факторов *Bradyrhizobium japonicum* усиливало прорастание семян, причем не только у бобовых (соя, фасоль), но и у небобовых растений, принадлежащих к различным семействам (кукурузы, риса, свеклы), в лабораторных и полевых условиях [80]. Интересно, что корневые экстракты небобовых растений были способны активировать продукцию Nod-факторов *B. japonicum* [58]. Эти факты говорят о том, что Nod-факторы и их синтетические аналоги могут быть использованы для повышения урожайности как у бобовых, так и у небобовых культур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование молекулярных механизмов взаимодействия между растениями и клубеньковыми бактериями привело к открытию сигнальных молекул, производимых обоими организмами и контролирующими ранние этапы становления бобово-ризобияльного симбиоза. Растительные флавоноиды, помимо участия в симбиозе, имеют массу других функций. Липохитоолигосахаридные Nod-факторы описаны пока только у ризобий и имеют специфическую функцию — инициируют образование клубенька. Однако представляется весьма вероятным, что сходные по структуре с Nod-факторами хитоолигосахариды присутствуют также в растениях и в животных, где они участвуют в регуляции развития организма и в запуске защитных реакций в ответ на присутствие патогенов. Постоянно увеличивается количество данных о влиянии молекул, структурно схожих с Nod-факторами, на митотический цикл и эмбриогенез, и все большие усилия исследователей направлены на поиск сходных эндогенных регуляторов в разнообразных организмах: от растений до позвоночных животных. Как флавоноиды, так и Nod-факторы обладают большим потенциалом для практического использования. Мы полагаем, что в будущем они найдут применение

ние в практике сельского хозяйства и будут способствовать развитию экологически чистого земледелия. Возможно, что Nod-факторподобные молекулы будут использоваться в медицине и в биотехнологии, в качестве новых регуляторов роста и морфогенеза.

Работа финансировалась ГНУ ВНИИСХМ РАСХН и поддержана грантами Президента РФ (НШ-1103.2003.04), Министерства Науки и Технологий и CRDF ST-012-0.

Литература

1. Atkinson E.M., Palcic M.M., Hindsgaul O., Long S.R. Biosynthesis of Rhizobium meliloti lipooligosaccharide Nod factors: NodA is required for an N-acyltransferase activity // Proc Natl Acad Sci USA. — 1994. — Vol. 91, N 18. — P. 8418–22.
2. Baev N., Endre G., Petrovics G. et al. Six nodulation genes of nod box locus 4 in Rhizobium meliloti are involved in nodulation signal production: nodM codes for D-glucosamine synthetase // Mol. Gen. Genet. — 1992. — Vol. 228. — P. 113–124.
3. Bakkars J., Semino C.E., Stroband H. et al. An important developmental role for oligosaccharides during early embryogenesis of cyprinid fish // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — Vol. 94, P. 7982–7986.
4. Bauer P., Ratet P., Crespi M.D. et al. Nod factors and cytokinins induce similar cortical cell division, amyloplast deposition and MsENOD12A expression patterns in alfalfa roots // Plant Journal. — 1996. — Vol. 10. — P. 91–105.
5. Bec-Ferte M.P., Krishnan H.B., Prome D. Structures of nodulation factors from the nitrogen-fixing soybean symbiont Rhizobium fredii USDA257 // Biochemistry. — 1994. — Vol. 33. — P. 11782–11788.
6. Bec-Ferte M.P., Krishnan H.B., Savagnac A. et al. Rhizobium fredii synthesizes an array of lipooligosaccharides, including a novel compound with glucose inserted into the backbone of the molecule // FEBS Lett. — 1996. — Vol. 393. — P. 273–79.
7. Begum A.A., Leibovitch S., Migner P., Zhang F. Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of Rhizobium leguminosarum increased pea (Pisum sativum L.) and lentil (Lens culinaris L.) nodulation in controlled growth chamber environments. J. Experimental Botany. — 2001. — Vol. 52, N 360. — P. 1537–1543.
8. Bloemberg G.V., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J.J. et al. Nodulation protein NodL of Rhizobium leguminosarum O-acetylates lipo-oligosaccharides, chitin fragments and N-acetylglucosamine in vitro // Mol. Microbiol. — 1994. — Vol. 11, N 4. — P. 793–804.
9. Bloemberg G.V., Kamst E., Harteveld M. et al. A central domain of Rhizobium NodE protein mediates host specificity by determining the hydrophobicity of fatty acyl moieties of nodulation factors // Mol. Microbiol. — 1995. — Vol. 16, N 6. — P. 1123–1136.
10. Boone C.M., Olsthoorn M.M.A., Dakora F.D. et al. Structural characterisation of lipo-chitin oligosaccharides isolated from Bradyrhizobium aspalati, microsymbionts of commercially important South African legumes // Carbohydr. Res. — 1999. — Vol. 317. — P. 55–63.
11. Boot K.J.M., van Brussel A.A.N., Tak T. et al. Lipochitin oligosaccharides from Rhizobium leguminosarum bv. viciae reduce auxin transport capacity in Vicia sativa subsp. nigra roots // Mol. Plant-Microbe Interact. — 1999. — Vol. 12. — P. 839–844.
12. Broughton W.J., Zhang F., Staehelin C. 2002. Signals exchanged between legumes and Rhizobium: agricultural uses and perspectives // Plant and Soil. — Vol. 252. — P. 129–137.
13. Cardenas L., Dominguez J., Quinto C. et al. Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from Rhizobium etli. // Plant Mol. Biol. — 1995. — Vol. 29. — P. 453–464.
14. Cardenas L., Dominguez J., Santana J., Quinto C. Role of the nodI and nodJ genes in the transport of Nod metabolites in Rhizobium etli // Gene 1996. — Vol. 173. — P. 183–87.
15. Cardenas L., Holdaway-Clarke T.L., Sanchez F. et al. Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors // Plant Physiology. — 2000. — Vol. 123. — P. 443–451.
16. Carlson R.W., Sanjuan J., Bhat U.V. et al. The structures and biological activities of the lipooligosaccharide nodulation signals produced by type-I and type-II strains of Bradyrhizobium japonicum // J. Biol. Chem. — 1993. — Vol. 268. — P. 8372–381.
17. Cullimore J.V., Ranjeva R., Bono J.-J. Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes // Trends Plant Sci. — 2001. — Vol. 6, N 1. — P. 24–30.
18. Cullimore J., Denarie J. Plant sciences. How legumes select their sweet talking symbionts // Science. — 2003. — Vol. 302, N 5645. — P. 575–578.
19. D'Haese W., Van-Montagu M., Prome J.-C., Holsters M. Carbamylation of azorhizobial Nod factors is mediated by NodU // Mol. Plant-Microbe Interact. — 1999. — Vol. 12. — P. 68–73.
20. De Billy F., Grosjean C., May S. et al. Expression studies on AUX1-like genes in Medicago truncatula suggest that auxin is required at two steps in early nodule development // Mol. Plant - Microbe Interact. — 2001. — Vol. 14. — P. 267–277.
21. De Jong A.J., Heidstra R., Spaink H.P. et al. Rhizobium lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant // The Plant Cell. — 1992. — Vol. 5. — P. 615–620.
22. Debelle F., Rosenberg C., Denarie J. The Rhizobium, Bradyrhizobium, and Azorhizobium NodC proteins are homologous to yeast chitin synthases // Mol. Plant-Microbe Interact. — 1992. — Vol. 5. — P. 443–446.
23. Demont N., Debelle F., Aurelle H. et al. Role of the Rhizobium meliloti nodF and nodE genes in the biosynthesis of lipooligosaccharidic nodulation factors // J. Biol. Chem. — 1993. — Vol. 268. — P. 20134–42.
24. Demont N., Ardourel M., Mailet F. et al. The Rhizobium meliloti regulatory nodD3 and syrM genes control the synthesis of a particular class of nodulation factors N-acylated by (omega-1)-hydroxylated fatty acids // EMBO J. — 1994. — Vol. 13, N 9. — P. 2139–49.
25. Demont-Caulet N., Mailet F., Tailler D. et al. Nodule - inducing activity of synthetic Sinorhizobium meliloti nodulation factors and related lipo — chitooligosaccharides on alfalfa. Importance of the acyl chain structure // Plant Physiology. — 1999. — Vol. 120. — P. 83–92.
26. Denarie J., Debelle F., Prome J.C. Rhizobium lipochitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis // Ann. Rev. Biochem. — 1996. — Vol. 65. — P. 531–535.
27. Dyachok J.V., Wiweger M., Kenne L., von Arnold S. Endogenous Nod-Factor-Like Signal Molecules Promote Early Somatic Embryo Development in Norway Spruce // Plant Physiology. — 2002. — Vol. 128. — P. 523–533.
28. Ehrhardt D.W., Atkinson E.M., Long S.R. Depolarisation of alfalfa root hair membrane potential by Rhizobium meliloti Nod factors // Science. — 1992. — Vol. 256. — P. 998–1000.
29. Ehrhardt D.W., Wais R., Long S.R. Calcium spiking in plant root hairs responding to Rhizobium nodulation signals // Cell. — 1996. — Vol. 85, N 5. — P. 673–681.
30. Evans I.J., Downie J.A. The nodI product of Rhizobium leguminosarum is closely related to ATP-binding bacterial transport proteins: nucleotide sequence of the nodI and nodJ genes // Gene. — 1986. — Vol. 43. — P. 95–101.
31. Felle H.H., Kondorosi E., Kondorosi A., Schultze M. Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of lipochitooligosaccharide // Plant J. — 1995. — Vol. 7. — P. 939–947.
32. Firmin J.L., Wilson K.E., Rossen L., Johnston A.W.B. 1986. Flavonoid activation of nodulation genes in Rhizobium reversed

- by other compounds present in plants // *Nature*. — Vol. 324. — P. 90–92.
33. *Firmin J.L., Wilson K.E., Carlson R.W. et al.* Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by nodX which mediates an O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipooligosaccharide nodulation factor // *Mol. Microbiol.* — 1993. — Vol. 10, N 2. — P. 351–360.
 34. *Fisher R.F., Long S.R.* *Rhizobium* - plant signal exchange // *Nature*. — 1992. — Vol. 357. — P. 655–660.
 35. *Folch-Mallol J.L., Marroqui S., Sousa S. et al.* Characterization of *Rhizobium tropicii* CIAT899 nodulation factors: the role of nodH and nodPQ genes in their sulphation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* — 1996. — Vol. 9. — P. 151–63.
 36. *Frieberg C., Fellay R., Bairoch A. et al.* Molecular basis for symbiosis between *Rhizobium* and legumes // *Nature*. — 1997. — Vol. 387. — P. 394–401.
 37. *Gadella T.W. Jr., Vereb G.Jr., Hadri A.E. et al.* Microspectroscopic imaging of nodulation factor-binding sites on living *Vicia sativa* roots using a novel bioactive fluorescent nodulation factor // *Biophys. J.* — 1997. — Vol. 72. — P. 1986–1996.
 38. *Geelen D., Mergaert P., Geremia R.A. et al.* Identification of nodSUIJ genes in Nod locus 1 of Azorhizobium caulinodans: Evidence that nodS encodes a methyltransferase involved in Nod factor modification // *Mol. Microbiol.* — 1993. — Vol. 9. — P. 145–154.
 39. *Geremia R.A., Mergaert P., Geelen D. et al.* The NodC protein of Azorhizobium caulinodans is an N-acetylglucosaminotransferase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1994. — Vol. 91. — P. 2669–73.
 40. *Gil-Serrano A.M., Franco-Rodriguez G., Tejero-Mateo P. et al.* Structural determination of the lipo-oligosaccharide nodulation signals produced by *Rhizobium fredii* HH103. *Carbohydr. Res.* — 1997. — Vol. 303. — P. 435–43.
 41. *Goedhart J., Rohrig H., Hink M.A. et al.* Nod factors integrate spontaneously in biomembranes and transfer rapidly between membranes and to root hairs, but transbilayer flip-flop does not occur // *Biochemistry*. — 1999. — Vol. 38, N 33. — P. 10898–907.
 42. *Goedhart J., Hink M.A., Visser A.J.* In vivo fluorescence correlation microscopy (FCM) reveals accumulation and immobilization of Nod factors in root hair cell walls // *Plant J.* — 2000. — Vol. 21, N 1. — P. 109–19.
 43. *Goedhart J., Bono J.J., Bisseling T., Gadella T.W. Jr.* Identical accumulation and immobilization of sulfated and nonsulfated Nod factors in host and nonhost root hair cell walls // *Mol. Plant-Microbe Interact.* — 2003. — Vol. 16, N 10. — P. 884–92.
 44. *Hanin M., Jabbouri S., Quesada-Vincens D. et al.* Sulphation of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod factors is dependent on noeE, a new host-specificity gene // *Mol. Microbiol.* — 1997. — Vol. 24. — P. 1119–29.
 45. *Hadwiger L.A.* Host-parasite interactions: elicitation of defense responses in plants with chitosan // *EXS*. — 1999. — Vol. 87. — P. 185–200.
 46. *Heidstra R., Geurts R., Franssen H. et al.* Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa* // *Plant Physiol.* — 1994. — Vol. 105. — P. 787–797.
 47. *Hirsch A.M., Bhuvanewari T.V., Torrey J.G., Bisseling T.* Early noduline genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1989. — Vol. 86. — P. 1244–1248.
 48. *Hirsch A.M., Fang Y.* Plant hormones and nodulation: what's the connection // *Plant Molecular Biology*. — 1994. — Vol. 26. — P. 5–9.
 49. *Hirsch A.M., LaRue T.A.* Is the legume nodule a modified root or stem or an organ sui generis? // *Crit Rev Plant Sci.* — 1998. — Vol. 16. — P. 361–392.
 50. *Hirsch A.M., Lum M.R. and Downie J.A.* What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special? // *Plant Physiol.* — 2001. — Vol. 127. — P. 1484–1492.
 51. *Hogg B., Davies A.E., Wilson K.E. et al.* Competitive nodulation blocking of cv. Afghanistan pea is related to high levels of nodulation factors made by some strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. 2002. *Mol. Plant-Microbe Interact.* — Vol. 15, N 1. — P. 60–68.
 52. *Jabbouri S., Fellay R., Talmont F. et al.* Involvement of nodS in N-methylation and nodU in 6-O-carbamoylation of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod factors // *J. Biol. Chem.* — 1995. — Vol. 270, N 39. — P. 22968–22973.
 53. *Jacobs M., Rubery P.H.* Naturally occurring auxin transport regulators // *Science*. — 1988. — Vol. 241. — P. 346–349.
 54. *John M., Rohrig H., Schmidt J. et al.* *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitoooligosaccharide deacetylase // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1993. — Vol. 90. — P. 625–629.
 55. *Kistner C., Parniske M.* Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis // *Trends Plant Sci.* — 2002. — Vol. 7, N 11. — P. 511–518.
 56. *Lerouge P., Roche P., Faucher C. et al.* Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulfated and acylated glucosamine oligosaccharide // *Nature*. — 1990. — Vol. 344. — P. 781–784.
 57. *Limpens E., Bisseling T.* Signaling in symbiosis // *Curr Opin Plant Biol.* — 2003. — Vol. 6, N 4. — P. 343–50.
 58. *Lian B., Souleimanov A., Zhou X., Smith D.L.* In vitro induction of lipo-chitoooligosaccharide production in *Bradyrhizobium japonicum* cultures by root extracts from non-leguminous plants // *Microbiol Res.* — 2002. — Vol. 157, N 3. — P. 157–60.
 59. *Lopez-Lara I.M., van den Berg J.D.J., Thomas-Oates J.E.* Structural identification of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals of *Rhizobium loti* // *Mol. Microbiol.* — 1995a. — Vol. 15. — P. 627–38.
 60. *Lopez-Lara I.M., van der Drift K.M.G.M., van Brussel A.A.N. et al.* Induction of nodule primordia on *Phaseolus* and *Acacia* by lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from broad-host-range *Rhizobium* strain GRH2 // *Plant Mol. Biol.* — 1995b. — Vol. 29. — P. 465–477.
 61. *Lopez-Lara I.M., Blok-Tip L., Quinto C. et al.* NodZ of *Bradyrhizobium* extends the nodulation host range of *Rhizobium* by adding a fucosyl residue to nodulation signals // *Mol. Microbiol.* — 1996. — Vol. 21, N 2. — P. 397–408.
 62. *Lorquin J., Lortet G., Ferro M. et al.* *Sinorhizobium teranga* bv. *acaciae* ORS1073 and *Rhizobium* sp. strain ORS1001, two distantly related *Acacia*-nodulating strains, produce similar Nod factors that are O-carbamoylated, N-methylated, and mainly sulphated // *J. Bacteriol.* — 1997a. — Vol. 179. — P. 3079–83.
 63. *Lorquin J., Lortet G., Ferro M. et al.* Nod factors from *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* bv. *sesbaniae* are both arabinosylated and fucosylated, a structural feature specific to *Sesbania rostrata* symbionts // *Mol. Plant-Microbe Interact.* — 1997b. — Vol. 10. — P. 879–90.
 64. *Mathesius U., Schlaman H.R.M., Spaink H.P. et al.* Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides // *Plant J.* — 1998. — Vol. 14. — P. 23–34.
 65. *McCoy E.* Infection by *Bact. Radicicola* in relation to the microchemistry of the host's cell walls // *Proc. R. Soc. (London) Ser. B*. — 1932. — Vol. 110. — P. 514–533.
 66. *Mergaert P., D'Haese W., Fernandez-Lopez M. et al.* Fucosylation and arabinosylation of Nod factors in *Azorhizobium caulinodans*: involvement of nolK, nodZ, as well as noeC and/or downstream genes // *Mol. Microbiol.* — 1996. — Vol. 21, N 2. — P. 409–419.
 67. *Mergaert P., Van Montagu M., Holsters M.* Molecular mechanisms of Nod factor diversity // *Mol. Microbiol.* — 1997. — Vol. 25. — P. 811–17.
 68. *Minami E., Kouchi H., Cohn J.R., Ogawa T., Stacey G.* Expression of the early nodulin, ENOD40, in soybean roots in response to various lipo-chitin signal molecules // *Plant Journal*. — 1996. — Vol. 10. — P. 23–32.
 69. *Oldroyd G.E.D.* Dissecting Symbiosis: Developments in Nod Factor Signal Transduction // *Annals of Botany*. — 2001. — Vol. 87. — P. 709–718.
 70. *Olsthoorn M.M.A., Lopez-Lara I.M., Petersen B.O. et al.* Novel branched Nod factor structure results from α -(1-3) fucosyl transferase activity: the major lipo-chitin oligosaccharides from

- Mesorhizobium loti strain NZP2213 bear an β -(1-3) fucosyl substituent on a non-terminal backbone residue // *Biochemistry*. — 1998. — Vol. 37. — P. 9024–32.
71. Ovtysna A.O., Rademaker G.-J., Esser E. et al. Comparison of characteristics of the nodX genes from various Rhizobium leguminosarum strains // *Mol. Plant - Microbe Interact.*, Vol. 12, N 3. — P. 252–258.
 72. Ovtysna A.O., Schultze M., Tikhonovich I.A. et al. 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.* — 2000. — Vol. 13, N 8. — P. 799–807.
 73. Ovtysna A.O. and Staehelin C. Bacterial signals required for the Rhizobium-legume symbiosis. In: «Recent Research Developments in Microbiology». Керала, Индия: Transworld Research Network, подано в печать.
 74. Pacios-Bras C., van der Burgt Y.E.M., Deelder A.M. et al. Novel lipochitin oligosaccharide structures produced by Rhizobium etli KIM5s // *Carbohydrate Research*. — 2002. — Vol. 337. — P. 1193–1202.
 75. Perret X., Staehelin C., Broughton W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2000. — Vol. 64. — P. 180–201.
 76. Peters N.K., Frost J.W., Long S.R. A plant flavone, luteolin, induces expression of Rhizobium meliloti genes // *Science*. — 1986. — Vol. 233. — P. 977–980.
 77. Poupot R., Martinez-Romero E., Prome J.-C. Nodulation factors from Rhizobium tropici are sulfated or nonsulfated chitopentasaccharides containing an N-methyl-N-acylglucosaminyl terminus // *Biochemistry*. — 1993. — Vol. 32. — P. 10430–35.
 78. Poupot R., Martinez-Romero E., Gautier N., Prome J.-C. Wild-type Rhizobium etli, a bean symbiont, produces acetyl-fucosylated, N-methylated, and carbamoylated nodulation factors // *J. Biol. Chem.* — 1995. — Vol. 270. — P. 6050–55.
 79. Price N.P.J., Relic B., Taimont F. et al. Broad-host-range Rhizobium species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are O-acetylated or sulphated // *Mol. Microbiol.* — 1992. — Vol. 6. — P. 3575–84.
 80. Prithiviraj B., Zhou X., Souleimanov A., Kahn W.M., Smith D.L. A host-specific bacteria-to-plant signal molecule (Nod factor) enhances germination and early growth of diverse crop plants // *Planta*. — 2003. — Vol. 216, N 3. — P. 437–45.
 81. Pueppke S.G., Broughton W.J. Rhizobium sp. strain NGR234 and R. fredii USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges // *Mol. Plant-Microbe Interact.* — 1999. — Vol. 12. — P. 293–318.
 82. Recourt K., Schripsema J., Kijne J.W. et al. Inoculation of Vicia sativa subsp. nigra roots with Rhizobium leguminosarum bv. viciae results in release of nod gene activating flavanones and chalcones // *Plant Mol. Biol.* — 1991. — Vol. 16. — P. 841–852.
 83. Redmond J.W., Batley M., Djorjevic M.A. et al. Flavones induce expression of nodulation genes in Rhizobium // *Nature*. — 1986. — Vol. 323. — P. 632–635.
 84. Relic B., Perret X., Estrada-Garcia M.T. et al. Nod factors of Rhizobium are a key to the legume door // *Mol. Microbiol.* — 1994. — Vol. 13, N 1. — P. 171–178.
 85. Ritsema T., Wijffelman A.H.M., Lugtenberg B.J.J., Spaink H.P. Rhizobium nodulation protein NodA is a host-specific determinant of the transfer of fatty acids in Nod factor biosynthesis // *Mol. Gen. Genet.* — 1996. — Vol. 251. — P. 44–51.
 86. Roche P., Debelle F., Mailett F. et al. Molecular basis of symbiotic host specificity in Rhizobium meliloti: nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipooligosaccharide signals // *Cell*. — 1991. — Vol. 67. — P. 1131–1143.
 87. Rosa F., Sargent T.D., Rebert M.L. et al. Accumulation and decay of DG42 gene product follow a gradient pattern during Xenopus embryogenesis // *Developmental Biology*. — 1988. — Vol. 129. — P. 114–23.
 88. Sanjuan J., Carlson R.W., Spaink H.P. et al. A 2-O-methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of Bradyrhizobium japonicum // *Proc. Natl. Acad. Sci. — USA*. — 1992. — Vol. 89. — P. 8789–93.
 89. Savoure A., Magyar Z., Pierre M. et al. Activation of the cell cycle machinery and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active Rhizobium meliloti Nod signal molecules in Medicago microcallus suspensions // *EMBO J.* — 1994. — Vol. 13. — P. 1093–1102.
 90. Schmidt J., Rohrig H., John M. et al. Alteration of plant growth and development by Rhizobium nodA and nodB genes involved in the synthesis of oligosaccharide signal molecules // *The Plant J.* — 1993. — Vol. 4, N 4. — P. 651–658.
 91. Schmidt P.E., Broughton W.J., Werner D. Nod factors of Bradyrhizobium japonicum and Rhizobium sp. NGR234 induce flavonoid accumulation in soybean root exudates // *MPMI*. — 1994. — Vol. 7, N 3. — P. 384–390.
 92. Schultze M., Kondrosi A. Regulation of symbiotic root nodule development // *Ann. Rev. Genet.* — 1998. — Vol. 32. — P. 33–57.
 93. Schwedock J., Long S.R. ATP sulphurylase activity of the nodP and nodQ gene products of Rhizobium meliloti // *Nature*. — 1990. — Vol. 348. — P. 644–647.
 94. Shearman C.A., Rossen L., Johnston A.W.B., Downie J.A. The Rhizobium leguminosarum nodulation gene nodF encodes a polypeptide similar to acyl-carrier protein and is regulated by nodD plus a factor in pea root exudate // *The EMBO J.* — 1986. — Vol. 5, N 4. — P. 647–652.
 95. Semino C.E., Specht C.A., Raimondi A., Robbins P.W. Homologs of Xenopus development gene DG42 are present in zebrafish and mouse and are involved in the synthesis of Nod-like chitin oligosaccharides during early embryogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1996. — Vol. 93. — P. 4548–4553.
 96. Slabas A.R., Chase D., Nishida I. et al. Molecular cloning of higher-plant 3-oxoacyl- (acyl carrier protein) reductase - Sequence identities with the nodG-gene product of the nitrogen-fixing soil bacterium Rhizobium meliloti // *Biochem. J.* — 1992. — Vol. 283. — P. 321–326.
 97. Soria-Diaz M.E., Tejero-Mateo P., Espartero J.L. et al. Structural determination of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals produced by Rhizobium giardinii bv. giardinii H152 // *Carbohydrate Research*. — 2003. — Vol. 338. — P. 237–250.
 98. Spaink H.P., Wijffelman C.A., Pees E. et al. Rhizobium nodulation gene nodD as a determinant of host specificity // *Nature*. — 1987. — Vol. 328. — P. 337–340.
 99. Spaink H.P., Sheeley D.M., van Brussel A.A.N. et al. A novel, highly unsaturated, fatty acid moiety of lipooligosaccharide signals determines host specificity of Rhizobium leguminosarum // *Nature*. — 1991. — Vol. 354. — P. 125–130.
 100. Spaink H.P., Bloemberg G.V., Van Brussel A.A.N. et al. Host specificity of Rhizobium leguminosarum is determined by the hydrophobicity of highly unsaturated fatty acyl moieties of the nodulation factors // *Mol. Plant-Microbe Interact.* — 1995a. — Vol. 8. — P. 155–164.
 101. Spaink H.P., Wijffes A.H.M., Lugtenberg B.J.J. Rhizobium NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides // *J. Bacteriol.* — 1995b. — Vol. 177. — P. 6276–6281.
 102. Spaink H.P. Regulation of plant morphogenesis by lipo-chitin oligosaccharides // *Crit. Rev. Plant Sci.* — 1996. — Vol. 15. — P. 559–582.
 103. Spaink H.P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria // *Annual Review of Microbiology*. — 2000. — Vol. 54. — P. 257–288.
 104. Stacey G., Luka S., Sanjuan J. et al. NodZ, a unique host-specific nodulation gene, is involved in the fucosylation of the lipooligosaccharide nodulation signal of Bradyrhizobium japonicum // *J. Bacteriol.* — 1994. — Vol. 176. — P. 620–633.

105. *Stahelin C., Schultze M., Kondorosi E. et al.* Structural modifications in *Rhizobium meliloti* Nod factors influence their stability against hydrolysis by root chitinases // *The Plant J.* — 1994. — Vol. 5. — N 3. — P. 319–330.
106. *Stahelin C., Schultze M., Kondorosi E., Kondorosi A.* Lipochitooligosaccharide Nodulation Signals from *Rhizobium meliloti* Induce Their Rapid Degradation by the Host Plant Alfalfa // *Plant Physiol.* — 1995. — Vol. 108. — P. 1607–1614.
107. *Stokkermans T.J.W., Ikeshita S., Cohn J. et al.* Structural requirements of synthetic and natural product lipo-chitin oligosaccharides for induction of nodule primordia on *Glycine soja* // *Plant Physiol.* — 1995. — Vol. 108. — P. 1587–1595
108. *Timmers A.C.J., Auriac M.-C., de Billy F., Truchet G.* Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa // *Development.* — 1998. — Vol. 125. — P. 339–349.
109. *Truchet G., Roche P., Lerouge P. et al.* Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa // *Nature.* — 1991. — Vol. 351. — P. 670–673.
110. *Van Brussel A.A.N., Zaat S.A.J., Canter Cremers H.C.J. et al.* Role of plant root exudate and Sym plasmid- localised nodulation genes in the synthesis by *Rhizobium leguminosarum* of Tsr factor, which causes thick and short roots on common vetch // *J. Bacteriol.* — 1986. — Vol. 165. — P. 517–522.
111. *Van Brussel A.A.N., Recourt K., Pees E. et al.* A biovar — specific signal of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* induces increased nodulation gene — inducing activity in root exudates of *Vicia sativa* subsp. *nigra* // *J. Bacteriol.* — 1990. — Vol. 172. — P. 5394–5401.
112. *Van Brussel A.A.N., Bakhuizen R., van Spronsen P.C. et al.* Induction of pre - infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipooligosaccharides of *Rhizobium* // *Science.* — 1992. — Vol. 257. — P. 70–72.
113. *van der Drift K.M.G.M., Spaink H.P., Bloemberg G.V. et al.* *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* produces lipochitin oligosaccharides with nodE-dependent highly unsaturated fatty acyl moieties: an electrospray ionisation and collision induced dissociation tandem mass spectrometric study // *J. Biol. Chem.* — 1996. — Vol. 271. — P. 22563–69.
114. *van der Holst P.P.G., Schlaman H.R.M. and Spaink H.P.* Proteins involved in the production and perception of oligosaccharides in relation to plant and animal development // *Current Opinion in Structural Biology.* — 2001. — Vol. 11. — P. 608–616.
115. *van Hengel A.J., Tadesse Z., Immerzeel P. et al.* N-Acetylglucosamine and Glucosamine-Containing Arabinogalactan Proteins Control Somatic Embryogenesis // *Plant Physiology.* — 2001. — Vol. 125. — P. 1880–1890.
116. *Vazquez M., Santana O., Quinto C.* The NodI and NodJ proteins from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains are similar to capsular polysaccharide secretion protein from Gram- negative bacteria // *Mol. Microbiol.* — 1993. — Vol. 8, N 1. — P. 369–377.
117. *Xie Z.-P., Stahelin C., Vierheilig H. et al.* 1995. Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans // *Plant Physiol.* — Vol. 108. — P. 1519–1525.
118. *Yang G.-P., Debelle F., Savagnac A. et al.* 1999. Structure of the *Mesorhizobium huakuii* and *Rhizobium galegae* Nod factors: a cluster of phylogenetically related legumes are nodulated by rhizobia producing Nod factors with a, b-unsaturated N-acyl substitutions // *Mol. Microbiol.* — Vol. 34. — P. 227–37.
119. *Zaat S.A.J., Wijffelman C.A., Mulders H.M. et al.* Root exudates of various host plant of *Rhizobium leguminosarum* contain different sets of inducers of *Rhizobium* nodulation genes // *Plant Physiol.* — 1988. — Vol. 86. — P. 1298–1303.
120. *Zhang F. and Smith D.L.* Preincubation of *Bradyrhizobium japonicum* with genistein accelerates nodule development of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] at suboptimal root zone temperatures // *Plant Physiol.* — 1995. — Vol. 108. — P. 961–968.

Structure, functions and perspectives of practical application of the signal molecules inducing development of rhizobia-legume symbiosis

A.O. Ovtyna, I.A. Tikhonovich

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

✿ **SUMMARY:** Soil bacteria rhizobia establish nitrogen-fixing symbiosis with legume plants. Mutual recognition of symbiotic partners and initiation of nodule formation occur via exchange by molecular signals secreted both by plant and bacteria. This review summarizes recent data about structural diversity, genetic control of biosynthesis and functional role of Nod-factors. The possibilities of practical application of flavonoids and Nod-factors in agriculture are discussed.

✿ **KEY WORDS:** symbiosis, nitrogen fixation, nodule bacteria, Nod-factors, flavonoids, signal molecules.