

**Обзоры, проблемы**

УДК 631.461.52:574.2:575.1/2

doi: 10.15389/agrobiology.2014.3.3rus

**ЗАЩИТНЫЕ РЕАКЦИИ В БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОМ СИМБИОЗЕ:  
ИНДУКЦИЯ И СУПРЕССИЯ\***

(обзор)

К.А. ИВАНОВА, В.Е. ЦЫГАНОВ

Развитие патогенной инфекции и бобово-ризобиального симбиоза, при котором бактерии заражают клетки бобовых растений, имеет много общих черт. Сигнальные молекулы, которыми обмениваются симбиотические партнеры, имеют сходство с фитоалексинами и элиситорами, продуцируемыми при патогенной инфекции. Оба процесса сопровождаются индукцией защитных реакций со стороны растения-хозяина, однако в случае бобово-ризобиального симбиоза такая индукция строго регулируется, что позволяет сформировать симбиотический клубенек. При этом контролируется и количество клубеньков, поскольку их формирование — энергозатратный процесс, и в большинстве случаев инфекция прерывается на ранних стадиях. Исследования молекулярно-генетических механизмов развития бобово-ризобиального симбиоза и патогенной инфекции выявили, что в ходе эволюции бобовые растения адаптировали для установления симбиоза с ризобиями рецепторы, приспособленные изначально для восприятия микоризной инфекции, причем схожие рецепторы участвуют в распознавании патогенов и индукции защитного ответа. Было выявлено, что ризобии используют системы секреции III и IV типа (T3SS и T4SS), которые у патогенных бактерий служат для доставки вирулентных факторов в клетки хозяев. При этом было показано, что T3SS способна к независимой от Nod-фактора активации сигнальной трансдукции, приводящей к развитию клубенька. Различные поверхностные полисахариды (экзополисахариды, липополисахариды и циклические  $\beta$ -глюканы) используются как ризобиями, так и патогенными бактериями для супрессии защитных реакций растений. Под действием антимикробных NCR пептидов (цистеин-богатые пептиды) бактерии необратимо дифференцируются в бактероиды в клубеньках некоторых бобовых растений.

**Ключевые слова:** клубенькообразование, защитные реакции, Nod-факторы, хитиновые олигосахариды, поверхностные полисахариды, дифференцировка бактерий, NCR пептиды, BasA, системы секреции T3SS и T4SS, патогены.

Взаимодействие с клубеньковыми бактериями играет исключительно важную роль в жизни бобовых растений. Специфика этих взаимодействий заключается в возникновении у симбиотических партнеров новых признаков, которых нет у их свободноживущих форм и которые обеспечивают качественное изменение адаптивного потенциала партнеров. Благодаря этим взаимодействиям растения способны выживать на бедных азотом почвах.

Основой для функционирования бобово-ризобиального симбиоза служат имеющиеся у ризобий гены азотфиксации (*nod*, *nol* и *noe*) (1), на обеспечение активной работы которых прямо или косвенно направлено функционирование всех остальных компонентов симбиотической системы. В симбиозе между бобовыми растениями и клубеньковыми бактериями достигается сопряжение двух глобальных биохимических процессов — азотфиксации и фотосинтеза, благодаря чему нормализуется азотно-углеродный баланс растительного организма.

Симбиоз бобовых растений с клубеньковыми бактериями — одна из наиболее эффективных систем биологической азотфиксации, имеющая огромное экологическое и практическое значение. Высокая эффективность основана на сложной структуре клубеньков, образующихся в результате совместной реализации партнерами специфических для симбиоза программ развития. Клубеньки выполняют комплекс взаимосвязанных функций, обес-

\* Работа финансово поддержана Министерством образования и науки (Государственный контракт 16.552.11.7085, соглашение 8109), грантом Президента РФ (НШ-4603.2014.4), Российским фондом фундаментальных исследований (14-04-00383).

печивающих экологическую нишу для размещения ризобий, структурную основу для обмена партнерами метаболитами, а также для контроля над численностью и физиологической активностью бактерий.

Формирование бобово-ризобиального симбиоза представляет собой многоступенчатый процесс, в котором бактериальная инфекция строго контролируется растением-хозяином. Детали этого процесса были рассмотрены достаточно подробно со стороны как макро- (2-5), так и микросимбионта (6-8).

Однако недостаточно изученным остается вопрос, касающийся границы между мутуалистическими и антагонистическими отношениями при формировании бобово-ризобиального симбиоза. Эти отношения представляют собой систему мультифункциональных возможностей, и даже небольшие изменения баланса внутри указанных процессов приводят к взаимному переходу. Совместимость между растением и микроорганизмом в симбиозе обеспечивается благодаря непрерывному обмену специфическими сигнальными молекулами. Причем растение выступает здесь доминирующим партнером, выбирая лишь выгодных себе на текущий момент симбионтов, что резко контрастирует с патогенными взаимодействиями, где микроорганизм провоцирует реакцию растения.

В последние годы значительные успехи в исследованиях молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе развития бобово-ризобиального симбиоза, показали, что в ходе эволюции как растения, так и ризобии использовали элементы молекулярной «машины», обеспечивающей взаимодействие растений с патогенами для формирования мутуалистического симбиоза. Так, было показано, что ризобии используют для индукции инфекции Nod-факторы, имеющие сходство с хитиновыми олигосахаридами (ХО), а у растения, в свою очередь, в узнавание Nod-факторов вовлечены рецепторы, обладающие большим сходством с рецептором, распознающим хитин (9), хотя следует заметить, что в последнее время появились данные о том, что рецепторы к Nod-факторам эволюционировали на основе рецептора к микоризным ХО, а не рецептора к патогенам (10). У бобовых растений, принадлежащие к кладе IRLC (Inverted Repeat-Lacking Clade), в необратимой дифференцировке бактерий в бактериоиды участвуют антимикробные пептиды, причем со стороны ризобий важную роль в их восприятии играет белок *basA* (11). Еще одним примером может быть использование ризобиями систем секреции III и IV типа (T3SS и T4SS), которые у патогенных бактерий служат для доставки в клетки хозяев вирулентных факторов (12) при активации инфекции (13). В успешном развитии ризобиальной инфекции, как и при развитии патогенной, важную роль играют различные поверхностные полисахариды (8).

Тем не менее, несмотря на различные механизмы, которые ризобии применяют для супрессии защитных реакций со стороны бобовых растений, последние способны воспринимать ризобий в качестве патогенов, поскольку даже при формировании эффективного симбиоза между бобовыми растениями и ризобиями дикого типа отмечается прерывание большинства инициированных инфекций, и лишь их незначительная часть завершается формированием эффективных клубеньков. Наблюдаемый феномен известен как авторегуляция клубенькообразования (14) и сходен с проявлениями реакции гиперчувствительности, развивающейся при патогенной атаке (15). Исследования многочисленных мутантов бобовых растений, заблокированных на разных стадиях развития клубенька, показало, что даже единичная мутация в геноме бобового растения может приводить к индукции защитных реакций со стороны растения (16, 17). Это свиде-

тельствует о том, что растение строго контролирует развитие инфекции и нарушение в работе системы регуляции приводит к прекращению развития полноценного клубенька.

**Nod-факторы и хитиновые олигосахариды.** Некоторые аналогии между развитием симбиоза и патогенеза прослеживаются уже на самых ранних стадиях, когда растения активируют *nod*-гены ризобий сигналами, сходными с флавоноидными фитоалексинами (например, глицеолин сои *Glycine max* L., пизатин гороха *Pisum sativum* L.). Выделяющиеся при этом липохитоолигосахариды, называемые Nod-факторами, имеют структурное сходство с элиситорами — ХО, производными клеточных стенок грибов, вызывающими активацию защитных реакций во многих растениях. ХО служат примером патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, приводящих к включению защитных реакций в ответ на проникновение патогенов (18, 19). Тем не менее, в то время как симбиотические факторы, как правило, включают четыре или пять остатков N-ацетилглюкозамина, наиболее активные элиситоры хитина имеют большую степень полимеризации. Так, исследования на рисе (*Oryza sativa* L.) и *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh показали, что ХО с шестью-восемью остатками N-ацетилглюкозамина более активно влияют на экспрессию генов и другие ответы, чем те ХО, что имеют от трех до пяти остатков (20, 21). Кроме того, существуют значительные различия в активных концентрациях этих молекул. Nod-факторы могут быть активны при концентрации до  $10^{-13}$  М, тогда как во многих исследованиях ответных реакций на действие ХО применяют концентрацию от  $10^{-9}$  до  $10^{-6}$  М (22).

В восприятие растением этих структурно сходных гликанов вовлечены рецептор-подобные киназы с LysM-мотивами во внеклеточных доменах. LysM-мотивы, как полагают, представляют собой участки для связывания веществ, содержащих N-ацетилглюкозамин. В ходе эволюции растений ХО, очевидно, служили иммуногенными паттернами, активирующими белковый LysM рецептор, вызывая тем самым у растения иммунный ответ и остановку инфекции. Биохимический потенциал растительного белка LysM с тех пор, вероятно, благоприятствовал эволюции рецептора, воспринимающего уже не ХО, а Nod-факторы и содействующего ризобийной инфекции при симбиозе (23).

Недавно с использованием химерных генов *AtCERK1* (кодирует рецептор к хитину у *A. thaliana*) и *LjNFR1* (кодирует один из рецепторов к Nod-фактору у *Lotus japonicus* (Regel.) K. Larsen было показано, что несколько аминокислотных замен в киназном домене рецептора хитина *AtCERK1* запускают сигнальный каскад, приводящий к формированию симбиотических клубеньков у мутанта *nfr1*, несущего мутацию в одном из компонентов рецептора к Nod-фактору (9).

В то же время Nod-факторы сами могут активировать защитные сигнальные каскады, такие как *LjNFR1*-зависимая экспрессия некоторых защитных генов в *L. japonicus* (9) и гибель клеток в листьях *Nicotiana benthamiana* Domin в ответ на сверхэкспрессию пары рецепторов к Nod-факторам (24). Тем не менее, индукция Nod-факторами большинства генов, связанных с активацией защитных реакций, во время симбиоза носит временный характер или совсем отсутствует (9, 25-27).

На основании полученных данных была выдвинута гипотеза, что в процессе эволюции для формирования симбиотических отношений с бобовыми растениями ризобии использовали их способность посредством рецептора, содержащего LysM-мотивы, распознавать микроорганизмы через восприятие ХО, модифицировав последние в Nod-факторы, структура ко-

торых (наличие разнообразных заместителей) позволила обеспечить высокую специфичность взаимодействия. Однако недавно проведенный фило-генетический анализ генов, кодирующих рецепторы к ХО и Nod-фак-торам, показал, что гены рецепторов к последним у бобовых растений эволюционировали не из гена предкового рецептора к ХО, а из предково-го рецептора к микоризным хитоолигосахаридам (10).

Nod-факторы инициируют начальные этапы формирования сим-биотического клубенька: деформации и скручивание корневых волосков, а также индукцию клеточных делений в коре корня. Для появления полно-ценного клубенька необходимо дальнейшее продвижение ризобий вглубь корня благодаря образованию инфекционной нити, а затем их высвобождение в цитоплазму растительных клеток с последующей дифференциров-кой в бактериоиды и формированием симбиосом. Очевидно, что на всех описанных выше этапах ризобии подвергаются угрозе быть воспринятыми растением в качестве патогенов, поэтому неудивительно, что в ходе эво-люции бактерии создали эффективные системы, позволяющие им избегать защитных реакций растения. К таким системам можно отнести синтез раз-нообразных поверхностных полисахаридов, системы секреции и т.п.

Поверхностные компоненты ризобий. К поверхностным компонентам ризобий, которые принимают активное участие в модифи-кации и супрессии защитных реакций у бобовых растений, принято отно-сить различные полисахариды, такие как экзополисахариды, липополиса-хариды, капсулярные полисахариды, циклические глюканы, наличие кото-рых характерно для грамотрицательных бактерий (8). Из поверхностных компонентов ризобий наиболее изучен кислый экзополисахарид (ЭПС I), или сукциноглюкан (28). У ризобий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) синтез ЭПС I контролируется более чем 20 *exo*-генами, расположенными на бóльшей мегаплазмиде. Было показано, что мутант *exoY*, у которого не продуцируется сукциноглюкан, характеризуется неспособностью инициии-ровать формирование инфекционных нитей. Мутант *exoZ*, продуцирую-щий неацетилованный сукциноглюкан, формировал азотфиксирующие клубеньки, но в ходе развития этих клубеньков наблюдалась задержка инициации и роста инфекционных нитей. Для мутанта *exoH*, продуци-рующего нефункциональный высокомолекулярный сукциноглюкан без сукцинила, характерна абортация инфекционных нитей в корневых во-лосках. В то же время сверхпродукция сукциноглюкана приводила к поте-ре способности ризобий колонизировать скрученные волоски. Очевидно, что сукциноглюкан играет важную роль в подавлении защитных реакций растения, вызываемых ризобиальной инфекцией (29).

В экспериментах К.М. Jones с соавт. (30) при инокуляции растений *Medicago truncatula* Gaertn. мутантным штаммом *exoY* (*S. meliloti*) наблю-дался повышенный уровень экспрессии генов, активирующихся при раз-витии защитных реакций, по сравнению с контрольным штаммом. Наибо-лее активно экспрессировались гены, кодирующие белок SH20 и эндо-1,4-β-глюканазу, предупреждающие инфицирование патогенными грибами, а также белок, препятствующий клеточной гибели.

Липополисахариды ризобий также могут подавлять защитные ре-акции (например, синтез активных форм кислорода в растениях) (31-33), а липополисахаридные мутанты часто не способны вступать в сим-биоз (34-37).

Растение может влиять на состав липополисахаридов, вызывая их модификации. У *Rhizobium* sp. NGR234 (штамм с широкой хозяйской спе-цифичностью, способный формировать клубеньки у большого круга бобо-

вых) флавоноиды вызывают изменения в рамнозном О-антигене, одновременно индуцируя экспрессию генов клубенькообразования (38, 39).

Важными для развития симбиоза компонентами поверхности ризобий, вовлеченными в диалог с защитными системами растений, оказались также циклические  $\beta$ -глюканы, которые могут составлять до 20 % сухой массы клеток (40). Они играют важную роль в адаптации бактериоидов к новым физиологическим условиям, повышая осмотическую стабильность клеток (41). Нарушение синтеза этих глюканов, как и ЭПС I, вызываемое мутациями в генах *ndv*, приводит к формированию псевдоклубеньков (42, 43).

**Системы секреции.** Многие бактериальные патогены животных и растений используют систему секреции III типа (T3SS), образовавшуюся в ходе эволюции из жгутиковой системы бактерий (44), для доставки различных белков (часто называемых эффекторами) в своих хозяев (45). Такие системы секреции, очевидно, могут играть важную роль и в становлении симбиоза у определенных видов ризобий. Синтез компонентов T3SS и эффекторов, которые она выделяет, регулируется флавоноидами и транскрипционным активатором NodD. T3SS была детально охарактеризована у штамма USDA110 *Bradyrhizobium japonicum*, штамма MAFF303099 *Mesorhizobium loti*, штамма CNPAF512 *Rhizobium etli*, *Rhizobium* sp. NGR234, штаммов HH103 и USDA257 *Sinorhizobium fredii* (12).

Недавно было показано (13), что штамм дикого типа *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 формирует клубеньки не только на растениях сорта *G. max* дикого типа, но и на образце En1282, который несет мутацию по гену *nfr1*, кодирующему один из компонентов рецептора к Nod-фактору. В то же время мутант с дефектом по генам, кодирующим компоненты T3SS, не был способен образовывать клубеньки на мутантных растениях. Мутантный штамм BEnodC, неспособный продуцировать Nod-факторы, также формировал клубеньки на мутантных растениях. Было показано, что в отсутствие инициации сигнальной трансдукции Nod-фактором, ведущей к формированию симбиотического клубенька, активация происходит на этапе функционирования генов растений *ENOD40* и *NIN*. Это свидетельствует о том, что T3SS способна к независимой от Nod-фактора активации сигнальной трансдукции, приводящей к развитию клубенька, хотя точный механизм пока остается неизвестным (13).

Определенную роль в развитии симбиотических клубеньков играет и так называемая система секреции IV типа (T4SS), которая эволюционировала на основе системы конъюгации (46). T4SS тоже активируется при взаимодействии флавоноидов с транскрипционным активатором NodD, однако в отличие от T3SS в дальнейшей регуляции задействована двухкомпонентная (VirA и VirG) система (12).

Таким образом, для доставки эффекторов, которые способствуют развитию симбиотических отношений, некоторые ризобии в ходе эволюции научились использовать системы секреции, обеспечивающие у патогенных бактерий передачу факторов вирулентности в клетки хозяев.

**Контроль со стороны растения за развитием инфекции.** Растение контролирует число участков инфекции, направление ее распространения и количество образующихся в результате этого клубеньков потому, что их формирование и функционирование — достаточно энергозатратный процесс. Хотя ризобии хорошо адаптированы к действию защитных систем хозяина, только небольшая доля бактерий способна обеспечить инфицирование с последующим появлением клубеньков, так как большинство инфекционных нитей abortируется в эпидермисе или коре. В случае симбиоза *Rhizobium meliloti*—люцерна *Medicago sativa* L. бы-

ли выявлены участки инфекции, в которых наблюдается полный некроз бактериальных и растительных клеток (15). Иными словами, растение-хозяин ограничивает развитие значительной части инфекционных нитей за счет ответов, сходных с реакцией гиперчувствительности.

Косвенным доказательством возможной роли активных форм кислорода в регуляции развития инфекционной нити служит идентификация клеточных пероксидаз (47, 48) и локализация липоксигеназного антигена в матриксе инфекционной нити (49). Кроме того, диаминооксидаза, которая может генерировать перекись водорода и вызывать перекрестное связывание белков в межклеточном матриксе, идентифицирована в клубеньках гороха (*P. sativum*) и, очевидно, присутствует в матриксе инфекционных нитей (50).

Дифференцировка бактерий в бактериоиды. Для бобовых растений, принадлежащих к кладе IRLC (Inverted Repeat-Lacking Clade), таких как горох (*P. sativum*), люцерна (*M. truncatula*), вика (*Vicia sativa* L.), характерны ярко выраженные морфологические изменения ризобий при их дифференцировке в бактериоиды, которая необратима. Недавно было показано, что клубенек-специфичные цистеин-богатые пептиды (NCR пептиды) служат факторами, индуцирующими необратимую дифференцировку бактериоидов (51). NCR пептиды бобовых растений (52) сходны с группой антимикробных пептидов — эффекторов врожденного иммунитета как у растений, так и у животных (53). Со стороны ризобий в необратимой дифференцировке бактериоидов важную роль играет белок VasA, который, вероятно, участвует в изменении состава симбиосомной мембраны, обеспечивая слияние секреторных везикул, содержащих NCR пептиды, с симбиосомами либо модифицирует клеточную оболочку, меняя восприимчивость бактерий к NCR пептидам (11). Примечательно, что VasA консервативен для многих бактерий и необходим для поддержания хронических инфекций, вызываемых, например, *Brucella abortis* и *Mycobacterium tuberculosis* (11). Это поразительный пример того, как элементы, обеспечивающие механизм инфицирования у бактерий, и системы защиты растения в ходе эволюции вовлекались в развитие симбиотических отношений, в результате чего появилась необратимая дифференцировка бактериоидов, имеющая, вероятно, эволюционное преимущество, поскольку было показано, что она возникала в эволюции неоднократно (54).

Итак, очевидно, что в процессе эволюции ризобии использовали элементы патогенеза, а бобовые растения — элементы иммунной системы для установления взаимовыгодных отношений, приводящих к формированию симбиотических клубеньков в результате супрессии защитных реакций растения. При этом развитие симбиоза находится под строгим контролем со стороны растения и нарушения, вызываемые единичными мутациями как у растения, так и у ризобий, способны приводить к индукции защитных реакций со стороны растения.

ГНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной  
микробиологии Россельхозакадемии,  
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,  
e-mail: tsyganov@arriam.spb.ru

Поступила в редакцию  
19 марта 2014 года

*Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2014, № 3, pp. 3–12

DEFENSE RESPONSES DURING THE LEGUME—  
*Rhizobium* SYMBIOSIS: INDUCTION AND SUPPRESSION

(review)

K.A. Ivanova, V.E. Tsyganov

#### Abstract

Development of the legume-*Rhizobium* symbiosis when bacteria infect cells of legume plants has many similarities with pathogenic infection development. Symbiotic partners exchange with signal molecules, which have similarities with phytoalexins and elicitors, producing during pathogenic infection. Both processes are accompanied by the induction of defense reactions of the host plant; however, induction of these reactions during symbiosis is under strong regulation that allows forming a symbiotic nodule. Number of nodules is also under control, due to the fact that their formation is energy-intensive process and the most infections are aborted in the early stages. Studies of molecular-genetic mechanisms of development of the legume-*Rhizobium* symbiosis and pathogenic infection revealed that during evolution the legumes adapted receptors accommodated originally for mycorrhizal infection perception to establish symbiosis with rhizobia, and similar receptors are used for perception of pathogens and induction of defense response. It was also shown that bacteria ex-ploit III and IV types of secretion systems (T3SS and T4SS), which pathogenic bacteria use for delivery of virulent factors in host cells. It was demonstrated, that T3SS is able to activation of signal transduction pathway, leading to nodule development, independently from Nod-factor. Different surface polysaccharides (exopolysaccharides, lipopolysaccharides and cyclic  $\beta$ -glucans) are used by rhizobia as well as pathogenic bacteria for suppression of plant defense reactions. In nodules of some legume plants bacteria undergo terminated differentiation into bacteroids under action of antimicrobial NCR peptides.

Keywords: nodulation, defense response, Nod-factors, chitin oligosaccharides, surface polysaccharides, bacterial differentiation, NCR peptides, BacA, secretion systems T3SS and T4SS, pathogens.

#### REFERENCES

1. Downie J.A. Functions of rhizobial nodulation genes. In: *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria* /H.P. Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 1998: 387-402 (ISBN: 978-94-011-5060-6).
2. Gage D.J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2004, 68: 280-300 (doi: 10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004).
3. Oldroyd G.E.D., Downie J.M. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2008, 59: 519-546 (doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839).
4. Kouchi H., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M., Hakoyama T., Nakagawa T., Umehara Y., Suganuma N., Kawaguchi M. How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant Cell Physiol.*, 2010, 51: 1381-1397 (doi: 10.1093/pcp/pcq107).
5. Tsyganova A.V., Kitaeva A.B., Brewin N.J., Tsyganov V.E. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2011, 3: 34-40.
6. Downie J.A. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2010, 34(2): 150-170 (doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00205.x).
7. Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E., Walker G.C. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2007, 5: 619-633 (doi: 10.1038/nrmicro1705).
8. Tsyganova V.A., Tsyganov V.E. *Uspekhi sovremennoi biologii*, 2012, 132(2): 211-222.
9. Nakagawa T., Kaku H., Shimoda Y., Sugiyama A., Shimamura M., Takahashi K., Yazaki K., Aoki T., Shibuya N., Kouchi H. From defense to symbiosis: Limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant J.*, 2011, 65: 169-180 (doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04411.x).
10. De Mita S., Streng A., Bisseling T., Geurts R. Evolution of a symbiotic receptor through gene duplications in the legume-rhizobium mutualism. *New Phytol.*, 2014, 201(3): 961-972 (doi: 10.1111/nph.12549).
11. Kereszt A., Mergaert P., Maryti G., Kondorosi É. Innate immunity effectors and virulence factors in symbiosis. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2011, 14(1): 76-81 (doi: 10.1016/j.mib.2010.12.002).
12. Deakin W.J., Broughton W.J. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, 7: 312-320 (doi: 10.1038/nrmicro2091).

13. Okazaki S., Kaneko T., Sato S., Saeki K. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *PNAS USA*, 2013, 110(42): 17131-17136 (doi: 10.1073/pnas.1302360110).
14. Osipova M.A., Mortier V., Demchenko K.N., Tsyganov V.E., Tikhonovich I.A., Lutova L.A., Dolgikh E.A., Goormachtig S. *Wuschel-Related Homeobox5* gene expression and interaction of CLE peptides with components of the systemic control add two pieces to the puzzle of autoregulation of nodulation. *Plant Physiol.*, 2012, 158(3): 1329-1341 (doi: 10.1104/pp.111.188078).
15. Vasse J., De Billy F., Truchet G. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*–alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant J.*, 1993, 4: 555-566 (doi: 10.1046/j.1365-313X.1993.04030555.x).
16. Tsyganov V.E., Morzhina E.V., Stefanov S.Y., Borisov A.Y., Lebsky V.K., Tikhonovich I.A. The pea (*Pisum sativum* L.) genes *sym33* and *sym40* control infection thread formation and root nodule function. *Mol. Gen. Genet.*, 1998, 256: 491-503 (doi: 10.1007/s004380050840).
17. Morzhina E.V., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Lebsky V.K., Tikhonovich I.A. Four developmental stages identified by genetic dissection of pea (*Pisum sativum* L.) root nodule morphogenesis. *Plant Sci.*, 2000, 155: 75-83 (doi: 10.1016/S0168-9452(00)00207-7).
18. Boller T., Felix G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2009, 60: 379-406 (doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346).
19. Hamel L.P., Beaudoin N. Chitoooligosaccharide sensing and downstream signaling: contrasted outcomes in pathogenic and beneficial plant–microbe interactions. *Planta*, 2010, 232: 787-806 (doi: 10.1007/s00425-010-1215-9).
20. Shibuya N., Minami E. Oligosaccharide signaling for defense responses in plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 2001, 59: 223-233 (doi: 10.1006/pmpp.2001.0364).
21. Zhang B., Ramonell K., Somerville S., Stacey G. Characterization of early, chitin-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2002, 15(9): 963-970 (doi: 10.1094/MPMI.2002.15.9.963).
22. Gough C., Cullimore J. Lipo-chitoooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant–microbe interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2011, 24(8): 867-878 (doi: 10.1094/MPMI-01-11-0019).
23. Gust A.A., Willmann R., Desaki Y., Grabherr H.M., Nürnberger T. Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends Plant Sci.*, 2012, 17(8): 495-502 (doi: 10.1016/j.tplants.2012.04.003).
24. Madsen E.B., Antolin-Llovera M., Grossmann C., Ye J., Vieweg S., Broghammer A., Krusell L., Radutoiu S., Jensen O.N., Stougaard J., Parniske M. Autophosphorylation is essential for in vivo function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signaling in cooperation with Nod factor receptor 5. *Plant J.*, 2011, 65: 404-417 (doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04431.x).
25. El Yahyaoui F., Kuster H., Ben Amor B., Hohnjec N., Puhler A., Becker A., Gouzy J., Vernie T., Gough C., Niebel A., Godiard L., Gamas P. Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program. *Plant Physiol.*, 2004, 136(2): 3159-3176 (doi: 10.1104/pp.104.043612).
26. Hogslund N., Radutoiu S., Krusell L., Voroshilova V., Hannah M.A., Goffard N., Sanchez D.H., Lippold F., Ott T., Sato S., Tabata S., Liboriussen P., Lohmann G.V., Schauser L., Weiller G.F., Udvardi M.K., Stougaard J. Dissection of symbiosis and organ development by integrated transcriptome analysis of *Lotus japonicus* mutant and wild-type plants. *PLoS ONE*, 2009, 4(8): 1-14 (doi: 10.1371/journal.pone.0006556).
27. Lohar D.P., Sharopova N., Endre G., Penuela S., Samac D., Town C., Silverstein K.A., VandenBosch K.A. Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.*, 2006, 140(1): 221-234 (doi: 10.1104/pp.105.070326).
28. Becker A., Pühler A. Production of exopolysaccharides. In: *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria* /H.P. Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 1998: 97-118 (ISBN: 978-94-011-5060-6).
29. Cheng H.P., Walker G.C. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 1998, 180(19): 5183-5191.
30. Jones K.M., Sharopova N., Lohar D.P., Zhang J.Q., VandenBosch K.A., Walker G.C. Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant. *PNAS USA*, 2008, 105(2): 704-709 (doi: 10.1073/pnas.0709338105).
31. Albus U., Baier R., Holst O., Puhler A., Niehaus K. Suppression of an elicitor-



- induced oxidative burst reaction in *Medicago sativa* cell cultures by *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides. *New Phytol.*, 2001, 151(3): 597-606 (doi: 10.1046/j.0028-646x.2001.00214.x).
32. Frayssé N., Couderc F., Poinso V. Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*–legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.*, 2003, 270(7): 1365-1380 (doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03492.x).
  33. Scheidle H., Gross A., Niehaus K. The lipid A substructure of the *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides is sufficient to suppress the oxidative burst in host plants. *New Phytol.*, 2005, 165(2): 559-565 (doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01214.x).
  34. Lerouge I., Vanderleyden J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant–microbe interactions. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2002, 26(1): 17-47 (doi: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00597.x).
  35. Campbell G.R.O., Sharypova L.A., Scheidle H., Jones K.M., Niehaus K., Becker A., Walker G.C. Striking complexity of lipopolysaccharide defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* mutants. *J. Bacteriol.*, 2003, 185(13): 3853-3862 (doi: 10.1128/JB.185.13.3853-3862.2003).
  36. D’Haeze W., Glushka J., De Rycke R., Holsters M., Carlson R.W. Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. *Mol. Microbiol.*, 2004, 52: 485-500 (doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.03989.x).
  37. Beck S., Marlow V.L., Woodall K., Doerrler W.T., James E.K., Ferguson G.P. The *Sinorhizobium meliloti* MsbA2 protein is essential for the legume symbiosis. *Microbiology*, 2008, 154: 1258-1270 (doi: 10.1099/mic.0.2007/014894-0).
  38. Theunis M., Kobayashi H., Broughton W.J., Prinsen E. Flavonoids, NodD1, NodD2, and Nod-box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2004, 17(10): 1153-1161 (doi:10.1094/MPMI.2004.17.10.1153).
  39. Broughton W.J., Hanin M., Relic B., Kopcicka J., Golinowski W., Simsek S., Ojanen-Reuhs T., Reuhs B., Marie C., Kobayashi H., Bordogna B., Le Quéré A., Jabbouri S., Fellay R., Perret X., Deakin W.J. Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp strain NGR234-legume symbioses. *J. Bacteriol.*, 2006, 188(10): 3654-3663 (doi: 10.1128/JB.188.10.3654-3663.2006).
  40. Breedveld M.W., Miller K.J. Cyclic beta-glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiol. Rev.*, 1994, 58(2): 145-161.
  41. Dunlap J., Minami E., Bhagwat A., Keister D.L., Stacey G. Nodule development induced by mutants of *Bradyrhizobium japonicum* defective in cyclic  $\beta$ -glucan. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 1996, 9(7): 546-555 (doi: 10.1094/MPMI-9-0546).
  42. Chen R., Bhagwat A.A., Yaklich R., Keister D.L. Characterization of *ndvD*, the third gene involved in the synthesis of cyclic beta-(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucans in *Bradyrhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.*, 2002, 48(11): 1008 (doi: 10.1139/w02-099).
  43. D’Antuono A.L., Casabuono A., Couto A., Ugalde R.A., Lepek V.C. Nodule development induced by *Mesorhizobium loti* mutant strains affected in polysaccharide synthesis. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2005, 18(5): 446-457 (doi: 10.1094/MPMI-18-0446).
  44. Saier M.H. Evolution of bacterial type III protein secretion systems. *Trends Microbiol.*, 2004, 12: 113-115 (doi: 10.1016/j.tim.2004.01.003).
  45. Hueck C.J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, 62: 379-433.
  46. Caskales E., Christie P.J. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2003, 1: 137-149 (doi:10.1038/nrmicro753).
  47. Salzwedel J.L., Dazzo F.B. pSym *nod* gene influence on elicitation of peroxidase activity from white clover and pea roots by rhizobia and their cell-free supernatants. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 1993, 6(1): 127-134 (doi: 10.1094/MPMI-6-127).
  48. Cook D., Dreyer D., Bonnet D., Howell M., Nony E., VandenBosch K. Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell*, 1995, 7(1): 43-55 (doi: 10.1105/tpc.7.1.43).
  49. Gardner C.D., Sherrier D.J., Kardailsky I.V., Brewin N.J. Localization of lipoxygenase proteins and mRNA in pea nodules: identification of lipoxygenase in the lumen of infection threads. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 1996, 9(4): 282-289 (doi: 10.1094/MPMI-9-0282).
  50. Wisniewski J.P., Rathbun E.A., Knox J.P., Brewin N.J. Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: implications for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2000, 13(4): 413-420 (doi: 10.1094/MPMI.2000.13.4.413).
  51. Van de Velde W., Zehirov G., Szatmari A., Debreczeny M., Ishihara H., Kevei Z., Farkas A., Mikulass K., Nagy A., Tiricz H., Satiat-Jeune-maotre B., Alunni B., Bourgel M., Kucho K., Abe M., Kereszt A., Maroti G., Uchiumi T., Kondorosi E., Mergaert P. Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science*, 2010, 327(5969): 1122-1126 (doi:

- 10.1126/science.1184057).
52. Mergaert P., Nikovics K., Kelemen Z., Maunoury N., Vaubert D., Kondorosi A., Kondorosi E. A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol.*, 2003, 132(1): 161-173 (doi: 10.1104/pp.102.018192).
  53. Brogden K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Rev. Microbiol.*, 2005, 3: 238-250 (doi: 10.1038/nrmicro1098).
  54. Oono R., Schmitt I., Sprent J.I., Denison R.F. Multiple evolutionary origins of legume traits leading to extreme rhizobial differentiation. *New Phytol.*, 2010, 187(2): 508-520 (doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03261.x).