

УДК 579.26:575.1:57.05

ГЕНЕТИКА СИСТЕМНОГО КОНТРОЛЯ МИКРОБНО-РАСТИТЕЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

© 2013 г. **И.А. Тихонович**

ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН,
Санкт-Петербургский государственный университет, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: contact@arriam.spb.ru

Поступила в редакцию 10 мая 2013 г. Принята к публикации 19 августа 2013 г.

ВВЕДЕНИЕ

Системный контроль является одним из фундаментальных свойств многоклеточных организмов, от которых в решающей степени зависит адаптация к меняющимся условиям среды. Л. фон Бергаланфи определил систему как «комплекс взаимодействующих компонентов» или как «совокупность элементов, находящихся в определенных отношениях друг с другом и со средой». Эти понятия до сих пор лежат в основе использования понятий «системы» (цит. по: Карпин, 2005). Простота данного определения позволяет распространять его на многие объекты окружающего мира, и в первую очередь на живые организмы, для которых системность проявляется в скоординированном изменении элементов в интересах выживания многоклеточного организма как целого.

Среди биологических исследований весьма многочисленны примеры изучения влияния системных факторов на рост и развитие организмов.

М.Е. Лобашеву (1967) принадлежит приоритет в развертывании исследований по влиянию системных факторов на протекание генетических процессов, в том числе мутагенеза. Им были предсказаны некоторые новые свойства в реализации генетической информации, например ее зависимость от систем организма. Он писал о том, что поведение контролирует последствия в организме, вызванные действием окружающей среды, в том числе и генетические. Далее он продолжает: «... таким образом организм пре-

дохраняет себя от того, что элементы системы, в данном случае клетки, начинают вести себя так, что нарушают гомеостаз всего организма». М.Е. Лобашев впервые высказал предположение о генетическом контроле системных процессов.

У животных нервная система, как и другие системы, наиболее полно осуществляет поддержание гомеостаза в организме. Однако системность сама по себе должна была эволюционно возникнуть гораздо раньше и проявить свой адаптационный потенциал, что и вызвало необходимость появления специализированных, интегрирующих организм систем. Без обеспечения функционирования элементов в интересах всей системы невозможно представить себе многоклеточный организм вообще. Трудно найти процессы, которые проходили бы вне системного контроля, поэтому расшифровка молекулярно-генетических механизмов системности является неременным условием понимания механизмов поддержания гомеостаза.

Изучение системности как генетического признака требует моделей, где могут проявляться мутации, в результате которых отдельная клетка или их сообщество выходят из-под контроля организма и начинают, например, бесконтрольно размножаться. Если это затрагивает регулярные признаки организма, то такие мутации, скорее всего, окажутся летальными. Гораздо лучше подходят в качестве модели те случаи, когда развитие организма может протекать поливариантно, в зависимости от условий среды.

Системность в данном случае проявляется в том, что организм оценивает изменение состояния окружающей среды и обеспечивает выработку адекватной адаптации. В результате мутации системная реакция организма нарушается, он выходит из гомеостаза, однако поддержать развитие мутантной особи можно в таких условиях, когда в развитии адаптации нет необходимости.

На наш взгляд, симбиоз растений с микроорганизмами обеспечивает именно такую возможность. Это связано с тем, что в процессе своего роста и развития растения должны реагировать на изменение двух важнейших характеристик окружающей среды – доступности питательных элементов и наличия фитопатогенов. Оба эти свойства носят экологически облигатный характер. Если почва содержит доступные соединения азота, то растения не нуждаются в развитии дополнительных адаптаций симбиотического происхождения. Это было показано еще в 1916 г. (Streeter, 1988). Но если азота для развития всего растения не достаточно, то необходимо обеспечить его мобилизацию из недоступных «одиноким» растениям источников. В этом уже заложена необходимость системного контроля, но она не очевидна. Теоретически возможна ситуация, когда все клетки организма испытывают дефицит питательных элементов, и те из них, которые находятся ближе к источнику, например клетки корней, начнут усваивать необходимые им элементы за счет локального развития необходимых адаптаций. Вторая возможность – это то, что организм как целое «определяет» наличие питательных элементов и в соответствии с этим перестраивает весь свой метаболизм.

Снабжение бобовых растений важнейшим питательным элементом – азотом – обеспечивается за счет их специфического взаимодействия с почвенными бактериями, в результате чего на корнях появляются образования симбиотического генезиса – клубеньки, в которых происходит фиксация молекулярного азота до доступной растениям формы, и таким образом данная микробно-растительная система (МРС) становится независимой от минерального азота почвы. Понятие МРС предполагает, что в результате функциональной интеграции генетических систем про- и эукариот возникает

новый суперорганизм, у которого появляются признаки, которыми не обладали партнеры до объединения. Клубеньковый симбиоз, особенно его недетерминированные варианты, полностью отвечает такому определению.

Развитие клубеньков подчиняется ряду требований, среди которых главными являются специфичность взаимодействия (рис. 1) и его экологическая облигатность. Первый признак подтверждает неслучайность образования надвидовой системы, но только в случае комплементарности генов узнавания партнеров. Второе требование связано с оптимизацией питания растений. Поскольку получение и применение азотных удобрений являются очень энергозатратными (не менее половины всей энергии, используемой в сельскохозяйственном производстве), то расшифровка молекулярных механизмов системных реакций по отношению к азотному статусу растений позволит разработать эффективные способы энергосбережения. Возможность проведения генетического анализа этих свойств появилась после получения мутаций по признаку, который можно определить следующим образом: способность растений определять доступность питательных элементов и контролировать степень развития симбиоза в соответствии со своими энергетическими возможностями и потребностями в элементах питания.

СИСТЕМНЫЕ МУТАЦИИ КЛУБЕНЬКООБРАЗОВАНИЯ

Данный признак в ходе генетического анализа был обозначен как авторегуляция клубенькообразования – АРК (в английской транскрипции AON – autoregulation of nodulation). Обеспечивая поступление азота, клубеньки выступают как один из важнейших потребителей углерода. Мутации, приводящие к сверхоптимальному развитию симбиотического аппарата, вызывают замедление роста корней и побегов, хотя азотфиксация при этом не повышается. Это наблюдение было сделано еще в 50-е годы прошлого столетия одним из классиков земледелия P.S. Nutman (1946, 1984). В процессе изучения изменчивости клубенькообразования многие селекционеры приходили к выводу, что для каждого генотипа растений характерен

свой показатель массы клубеньковой ткани. При недостаточной азотфиксации (например, при использовании для инокуляции неэффективных штаммов) количество клубеньков увеличивается, но их размер уменьшается. При нерегулярной инокуляции редкие на растении клубеньки превышают по размеру обычные, сохраняя стабильность массы симбиотического аппарата.

Необходимость балансировки процессов фотосинтеза и азотфиксации хорошо иллюстрируют эксперименты автора этой статьи и его коллег В.И. Романова и С.А. Четковой, выполненные в 90-х годах прошлого столетия, по изучению хлорофилльных мутантов гороха, полученных С.А. Гостимским в МГУ (Тихонович и др., 1987). Такие мутанты содержали 2 и 42 % (R-2 и R-42) от нормального количества хлорофилла и вследствие этого были остродефицитны по углероду. Изучение параметров симбиотической азотфиксации у таких мутантов показало, что активность нитрогеназы у них или не возникает вообще у 2 % мутантов, или резко снижена (42 % хлорофилла). Тем не менее процентное содержание азота в массе R-42 растений превышает таковое у нормальных горохов. У мутанта наблюдается повышенное количество транспортных форм аминокислот, которые накапливаются в клубеньках, поскольку у растений, вероятно, не достаточно углерода для связывания вновь фиксированного азота. Эти эксперименты показали, что в условиях недостаточного питания клубеньки начинают проявлять элементы паразитизма. Таким образом, должен существовать механизм, уравнивающий потребности в азоте и возможности растения по получению фотосинтатов. Знание этого механизма (или механизмов) позволит внести значительный вклад в экономию азотных удобрений при одновременном сохранении высоких урожаев.

Наследование числа клубеньков у разных генотипов было описано известным шведским генетиком гороха S. Blixt (Gelin, Blixt, 1964). Эти различия не выходят за рамки изменения числа клубеньков в 1,5–2 раза у изученных генотипов. Количество клубеньков может даже служить селекционным признаком на повышение эффективности симбиотической азотфиксации. Здесь уместно отметить работы К.К. Сидоровой (Сидорова и др., 2006).

Количественный характер спонтанных различий по числу клубеньков не позволяет прямо исследовать генетический контроль АРК, эта возможность появилась после получения суперклубеньковых мутантов.

Первые такие мутации были получены в 80-х годах прошлого столетия. Начало их подробного изучения было положено P. Gresshoff и его коллегами на сое (*Glycine max*) (Reid *et al.*, 2011). Фенотип таких мутантов характеризовался резким увеличением числа клубеньков – не менее чем на порядок по сравнению с диким типом (рис. 2), а также намного превышал границы спонтанной изменчивости по клубенькообразованию. Кроме количественной разницы, существует и качественный признак системных мутаций – образование клубеньков происходит независимо от количества азота в почве. Такие мутации были обозначены для сои как *nts* (nitrogen-tolerant symbiosis), затем по мере развития знаний по молекулярному механизму системной регуляции они были переименованы в *nark* (nodule autoregulation receptor kinase). Суперклубенькообразование описано у нескольких бобовых, и выявлены соответствующие гены, например *Lotus japonicus* (*HARI*), *Pisum sativum* (*SYM29*), *Medicago truncatula* (*SUNN: SUPER NUMERIC NODULES*) и т. д.

Изменчивость числа клубеньков свидетельствует о том, что существуют по крайней мере два уровня регуляции: один проявляется в изменчивости клубенькообразования дикого типа, в зависимости, вероятно, от механизмов, работающих на корнях; второй уровень – это общее разрешение на клубенькообразование, которое связано с азотным статусом почвы и осуществляется путем передачи сигналов на дальние расстояния. Последнее стало известным в связи с наиболее интригующим свойством мутаций суперклубенькообразования: мутантный фенотип определяется верхней частью растения. Это следовало из экспериментов по реципрокным прививкам побегов мутантных растений на корни дикого типа и наоборот (рис. 3). При этом суперклубенькообразование всегда возникало на растении, несущем мутантные побеги, независимо от генотипа корневой системы. Следующим подтверждением системности реакции АРК стали эксперименты по «расщепленному корню» (рис. 4). Суть их состоит в том, что две

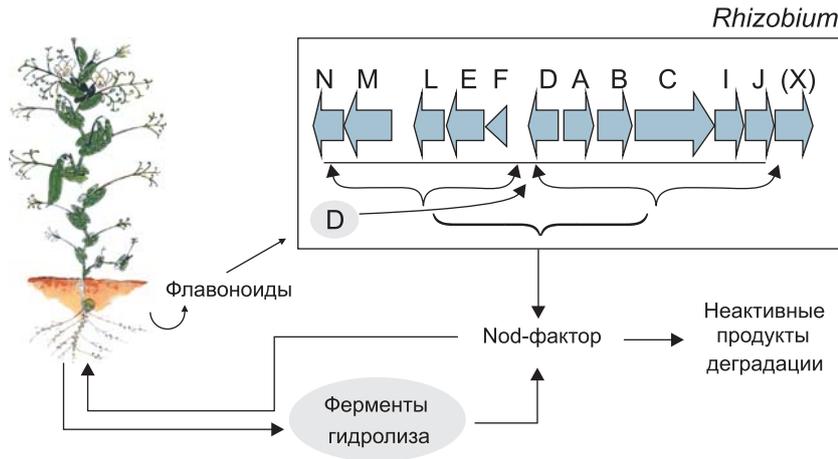


Рис. 1. Молекулярные механизмы сигналлинга в симбиозе *Rhizobium* и бобовых, определяющие специфичность.

Сигнал в виде специфических флавоноидов, производимый в корнях бобовых, воспринимается белком podD, что вызывает экспрессию генов клубенькообразования, синтезирующих pod-фактор, структура которого отвечает особенностям рецепторной молекулы совместимого бобового растения.

части корневой системы бобового растения помещают в различные пробирки, что исключает их физический контакт. Инокуляция одной из частей вызывает образование на ней клубеньков, тогда как вторая часть остается свободной от клубенькообразования. Если теперь спустя несколько дней нанести бактерии на вторую часть, то в норме новые клубеньки не возникнут вообще или их число будет резко снижено. Но в случае мутаций суперклубенькообразования такая отстроченная инокуляция может вообще не повлиять на образование клубеньков или это влияние будет значительно ослаблено.

Отсроченное клубенькообразование является независимым от присутствия живых бактерий, оно наблюдается даже при добавлении очищенного pod-фактора, сигнального соединения, синтезируемого бактериями, структура которого определяет специфичность взаимодействия (рис. 5).

В системе расщепленного корня pod-фактор подавляет образование клубеньков на вторичных корнях, однако только его наличия недостаточно для полного проявления АКК.

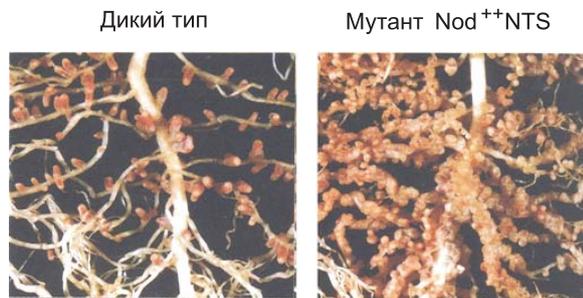


Рис. 2. Нарушение системной регуляции числа клубеньков у гороха.

Мутации по признакам системности вызывают суперклубенькообразование у гороха. NTS (nitrate tolerant symbiosis) – устойчивость клубенькообразования к высокому содержанию азота в среде.

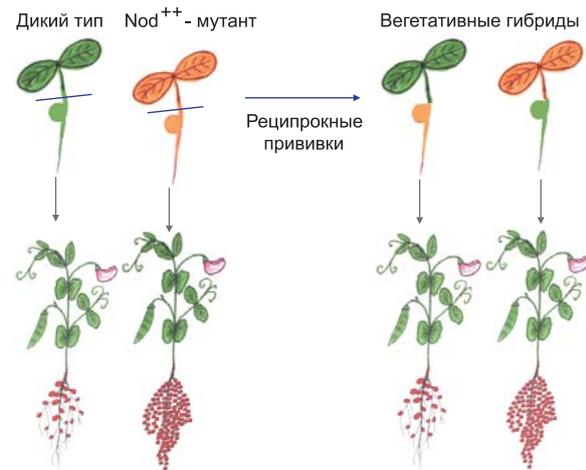


Рис. 3. Локализация сигнала, контролирующего число клубеньков.

Признак суперклубенькообразования следует за верхней частью растения в эксперименте по прививкам.

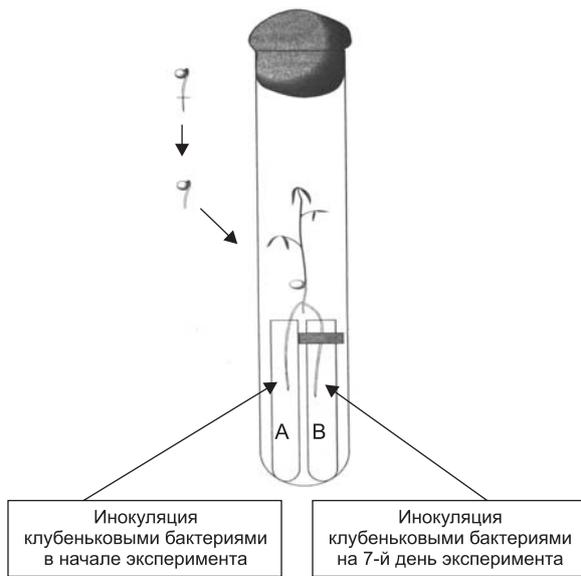


Рис. 4. Система «расщепленный корень» (Kosslak, Bohloul, 1984. P. 125–130).

У мутанта на корне В формируется большее количество клубеньков вследствие нарушенной авторегуляции.

ОБЩАЯ СХЕМА СИСТЕМНОГО СИГНАЛИНГА

Описанные выше эксперименты свидетельствовали о том, что сигнал, разрешающий клубенькообразование, генерируется в верхней части растения, а затем поступает в корневую систему, что кажется логичным, поскольку именно в верхней части происходит процесс фотосинтеза, от эффективности которого за-

висят потребность растений в азоте и их энергетический статус. Однако такое объяснение представляется очень формальным, требующим расшифровки более конкретных механизмов, тем более, что дефолиация вызывает увеличение образования клубеньков на корнях мутантов по сравнению с диким типом. Следовательно, механизм АРК нельзя трактовать как простую зависимость от количества фотосинтатов.

Наиболее логичным казалось объяснение, предложенное Р. Gresshoff, предполагавшим, что в процессе развития клубеньковых примордиев генерируется сигнал, который транспортируется в верхнюю часть растения, где обрабатывается и вследствие этого рождается побеговый сигнал, который, попадая в корневую систему, подавляет дальнейшее клубенькообразование. Для расшифровки этого механизма, следовательно, надо было обнаружить оба сигнальных соединения, которых могло быть и больше, а также их рецепторы в верхушечной части и в корнях растения. Эта логика совпадает с ранее высказанным М.Е. Лобашевым положением о том, что клетка не должна выходить из-под контроля организма, что особенно актуально для такого признака, как деление. Процесс образования клубеньков как раз и представляет из себя дедифференцировку клеток кортекса с появлением вторичных меристем и новообразований.

Феномен симбиотической азотфиксации, таким образом, является интересной моделью

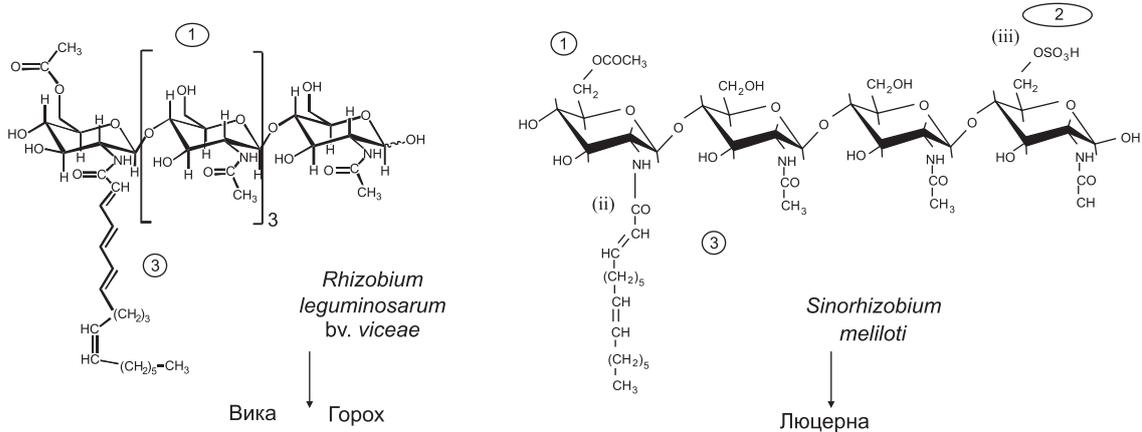


Рис. 5. Nod-факторы, определяющие специфичность к разным растениям.

Различия в структуре pod-фактора определяют специфичность взаимодействия. При наличии сходной части молекулы – хитоолигосахарида (1), в зависимости от наличия заместителя – сульфогруппы (2) и разных остатков жирных кислот (3) pod-фактор вызывает клубенькообразование у гороха или люцерны.

для изучения скоординированной реализации комплекса факторов, от которых зависит переход растений на новый источник питания путем системного регулирования.

Итак, процесс клубенькообразования запускается посредством *pod*-фактора, находится под контролем растения и зависит от условий окружающей среды. При этом происходят два процесса – проникновение бактерий в растение посредством образования инфекционных нитей и образование вторичных меристем внутри корня. Эти два процесса обеспечиваются сходными генами, работающими в различных программах. (рис. 6). Данный процесс активно контролируется в растении преимущественно за счет отрицательных связей, что подробно рассмотрено Н.А. Проворовым и Н.И. Воробьевым (2012). При этом подавляется избыточное образование инфекционных нитей и зачатков клубеньков. Последние образуются только в очень ограниченной зоне корня, сразу за корневой точкой роста (Более подробно описано в (D’Haeseleer *et al.*, 2010)).

Феномен АРК, таким образом, является примером регуляции на дальнем расстоянии. Наиболее вероятным было полагать, что такой механизм основан на контроле процесса деления клеток как части более общего процесса регуляции роста и развития растений. В дальнейшем эти предположения подтвердились при выявлении рецепторов сигнала, поступающего из корней.

Плейотропное действие мутантов по АРК сказывается на развитии корневой системы. Корнеобразование является комплексным процессом, который характеризуется большой пластичностью в ответ на изменяющиеся условия среды, обеспечивая выживание организма.

Исследователи АРК – F. de Bruijn и K. Szczygłowski – обратили внимание на мутант *Lotus japonicus*, который характеризовался нарушением в развитии корней и одновременно проявлял суперклубенькообразование (Krusell *et al.*, 2002). Были описаны несколько аллелей данного гена, которые получили название *har1-1-3*. Инокуляция такого мутанта *Mesorhizobium loti* вела к почти полному подавлению роста растения и суперклубенькообразованию, при котором клубеньки практически покрывали

весь корень. Исследование процесса проникновения бактерий в корень показало, что процесс образования инфекционных нитей практически не отличается от процесса у дикого типа, однако если у нормальных растений из этих нитей образуется только 9–15 клубеньков, то у мутанта развитие большинства инфекционных нитей приводит к формированию многочисленных зон с митозами, которые затем формировали клубеньковые примордии, что вело к суперклубенькообразованию с характерной для данного мутанта устойчивостью к повышенной концентрации нитратов в среде. Неинокулированный мутант *har1* характеризовался также значительно укороченной корневой системой. При этом положение вторичных корней как у мутанта, так и у нормальных растений не различалось, однако частота вторичных корней была значительно выше у мутанта. Митотическая активность у мутанта также значительно превышала таковую у дикого типа. Было также отмечено почти двукратное укорочение корней и снижение надземной массы, что выявлялось даже без инокуляции. Подавление развития растений, связанное с инокуляцией, характерно, хотя и не в такой степени, и для других мутантов по клубенькообразованию, т. е. нарушение регуляции приводит к усилению паразитических свойств симбиотических систем. Следует предположить, что сходные гены могут быть вовлечены как в симбиотические, так и несимбиотические процессы. Графтинг (прививки) выявил, что корневые признаки также контролируются верхней частью. Значит, ген *Har-1* является элементом контроля корнеобразования на длительном расстоянии.

Это можно объяснить по-разному. Поскольку мутантный фенотип проявляется в отсутствие ризобий, то первичная роль гена *Har*, вероятно, должна быть связана с контролем корнеобразования, а дефект клубенькообразования вызван конфликтом программ, в которые вовлечен данный ген. Альтернативно продукт этого гена напрямую контролирует клубенькообразование, представляя, таким образом, один из элементов общего пути регуляции развития корней и клубеньков, связанный, кроме того, и с чувствительностью к азотному статусу почвы.

СТРУКТУРА ГЕНОВ АРК И ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА

Решающий прорыв в изучении молекулярно-генетического контроля системности был достигнут тогда, когда к уже упомянутым F. de Bruijn и K. Szczykloowski присоединился J. Stougaard, который к тому времени сумел наладить секвенирование симбиотических генов, в частности впервые расшифровал структуру гена *nin*. В результате позиционного клонирования удалось идентифицировать контиг, содержащий локус, последовательность нуклеотидов которого была изменена у мутанов по гену *har* (Krusell *et al.*, 2002). В состав этого гена входит один интрон, открытая рамка считывания включает 2 958 нуклеотидов. Соответствующий белок насчитывает 986 аминокислот. Данный белок относится к трансмембранным белкам с обогащенными лейцином участками (LRR), расположенными сразу за сигнальным пептидом и имеющими следующий мотив: XfXXNXLS/TGXfPXXfXXfXXLXXL (где f и X обозначают гидрофобные и варьирующие аминокислоты). Данный мотив повторяется более 20 раз. Внутриклеточная часть белка характерна для серин/треониновых киназ. Таким образом, он обладает всеми признаками рецепторного белка. Его возможная функция, как и индуктор, были вычислены на основании имеющейся базы данных. Этот ген на 53,2 % сходен со структурой гена *CLAVATA1*, включая и экзон-интронную структуру (рис. 7). Структура гена *HAR1* также на 74,8–91,5 % совпадала с генами, выявленными у сои. Подробно была изучена также структура гена гороха *SYM29*, мутации по которому имели фенотип суперклубенькообразования, сходный с мутантами у сои и лотуса. Мутанты по данному гену несли различные отклонения в его структуре как в экстрацеллюлярном, так и во внутриклеточном, киназном, доменах. Косегрегационный анализ подтвердил гипотезу о гомологичности генов *PsSYM29* и *HAR1*.

Выяснилось, что все 4 гена у разных бобовых, *har1*, *sym29*, *nark* и *sunn*, являются киназами, обогащенными лейциновыми повторами в экстрацеллюлярном домене (LRR) и могли рассматриваться как вероятные кандидаты на роль рецепторов корневого сигнала. Анализ экспрессии данных генов у гороха и лотуса

показал, что их транскрипты широко представлены в различных частях растения, а экспрессия не зависит от ризобий и наличия минерального азота. Этого и следовало ожидать, если мы предполагаем, что белки *PsSYM29* и *HAR1* являются рецепторами, однако должны были существовать сигналы, связанные как с азотным статусом почвы, так и с присутствием бактерий.

Наиболее вероятной казалась связь АРК и системы регуляции, сходной с регуляцией генов типа *CLAVATA*, где индукторы уже были известны.

CLAVATA1, описанный ранее у арабидопсиса, функционирует как рецептор, узнающий сигнал в виде небольшого белка *CLAVATA3* (*CLV3*). Ранее было известно, что данный сигнал генерируется делящимися побеговыми клетками и на коротком расстоянии ингибирует деление стеблевых меристем, стимулируя переход к дифференцировке и поддерживая таким образом необходимый баланс между наличием функционирующих меристем и формированием новых органов растения. Такой же регуляторный комплекс был обнаружен и у других растений, в частности у риса, где было отмечено, что рецептор, сходный с *HAR1*, связывается белками *CLE* семейства. Это семейство вызывает большой интерес как универсальный регуляторный механизм у растений (см. обзор Додуевой и др. (2012)).

Поэтому наиболее вероятной гипотезой было то, что данный механизм функционирует и в симбиозе. Эту гипотезу одним из первых проверили исследователи из Токийского университета (Okamoto *et al.*, 2009) под руководством M. Kawaguchi. Данные были опубликованы в 2009 г. В ходе работы в геноме лотуса было выявлено до 4 десятков пептидов, обладающих сходством с *CLV3*. Из всего числа возможных кандидатов в клубеньках экспрессия трех из них усиливалась почти в 100 раз. Эти гены были помещены под сильный 35S промотор и такой конструкцией были трансформированы корни лотуса посредством *Agrobacterium*. Отобранные по наличию маркерных признаков трансформированные растения были проинокулированы. Независимый от *CLE* пептидов маркер трансформации, включенный в состав конструкции, позволял различить трансформированные и интактные корни. Сравнительный анализ таких корней

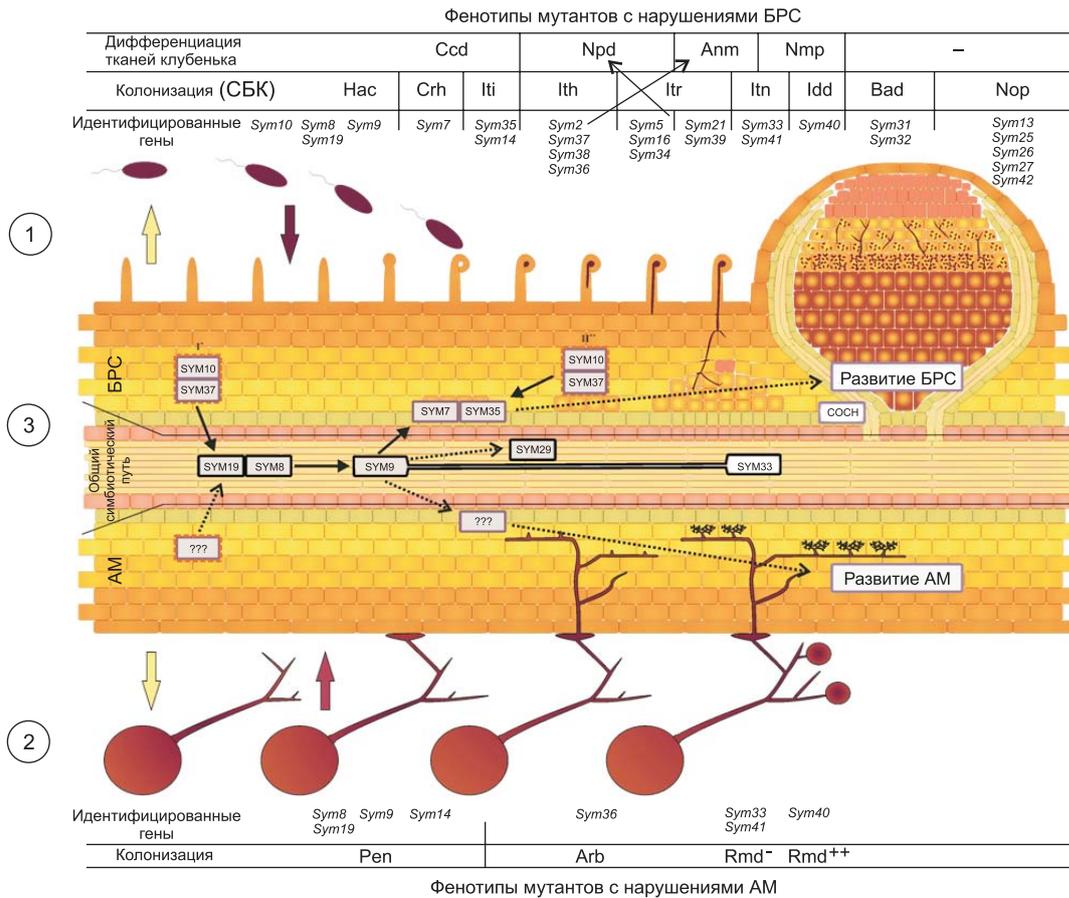


Рис. 6. Функционирование симбиотических генов гороха (*Pisum sativum* L.).

В процессе развития симбиогенеза реализуются три генетические программы: размещение в растении бактериальной клетки (1), образование в корнях микоризных структур (2) и закладка и образование вторичных меристем (3). Многие общие *Sym*-гены контролируют все три процесса, участвуя в разных программах, но в различной очередности, что отражено с помощью перекрещивающихся стрелок.

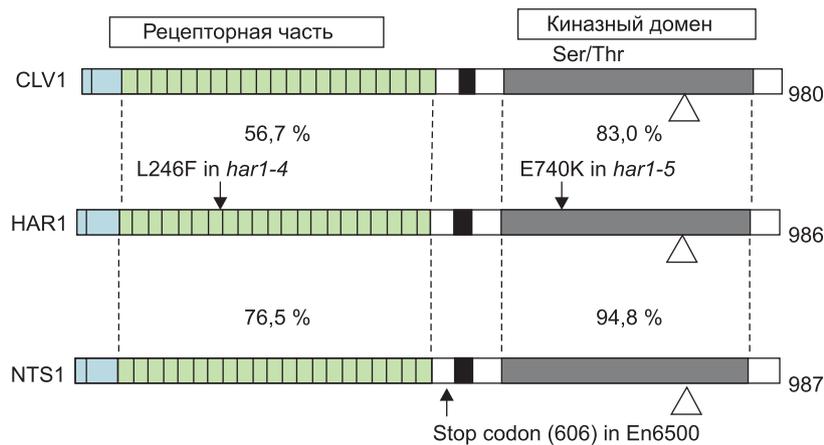


Рис. 7. Структура рецепторных киназ, контролирующих системные признаки.

Признак системности клубенькообразования контролируется геном *Har* у лотуса, *NTS1* – у сои, которые сходны между собой, а также имеют высокий процент гомологии с геном *CLAVATA1*. Треугольники и стрелки обозначают мутантные локусы. Рецепторная часть (зеленый цвет) представлена LRR повторами. Киназный домен (серый цвет) гораздо более консервативен по сравнению с рецепторной частью.

показал, что сверхэкспрессия двух из трех *LjCLE* генов достоверно ингибировала образование клубеньков на растениях дикого типа. Интересно, что угнетение клубенькообразования наблюдалось даже в нетрансформированной части корней одного и того же растения. Вероятно, ингибирующий эффект распространялся по растению системно. Для того чтобы проверить возможную связь *LjCLE* белков с *HAR1*, этими же конструкциями были трансформированы мутанты *har1*. На мутантных растениях с признаками суперклубенькообразования угнетения отмечено не было, что говорит о том, что *har1* эпистатирует над действием *LjCLE* и доказывает их связь.

Синтез *LjCLE* белков наступал в течение 3 ч после инокуляции одновременно с ранними нодулинами, что также подтвердило их связь с клубенькообразованием. Штаммы ризобий, не вырабатывающие *nod*-фактора вследствие мутации по *nodA*, были не способны запустить повышенную экспрессию *CLE* генов в клубеньках, что показало важную роль бактериальных сигналов в развитии системных реакций. Наличие большого количества мутаций по генам клубенькообразования позволило вычислить примерное время работы генов АРК. Оказалось, что у мутантов *CASTOR* и *LjCCaMK* повышенной экспрессии *LjCLE* генов не наблюдается. Однако она регистрировалась у мутанта по гену *LjNSP2*, что указывало на действие гена уже после разделения генетических программ на клубеньковую и микоризную, что также подчеркивает важность элементов пути распространения бактериального сигнала для системной регуляции.

LjCLE пептиды оказались участниками регуляции клубенькообразования через азотный статус почвы. Мутанты по суперклубенькообразованию, как уже подчеркивалось, устойчивы по отношению к наличию повышенных концентраций азотных соединений в почве. Экспрессия одного из трех генов, специфических для клубеньков (*LjCLE-RS2*), оказалась зависимой от нитрата калия в почве, причем она усиливалась с увеличением концентрации минерального азота при одновременном подавлении образования клубеньков. Эффект зависимости экспрессии *LjCLE-RS2* сохранялся и на растениях, мутантных по генам *CASTOR*, *LjCCaMK* и некоторым

другим, что подчеркивает независимость путей нитратного ингибирования от сигнального пути *nod*-фактора.

Рассматривая в целом роль данных генов, следует отметить, что они сходны с таковыми у других растений, которые регулируют процесс деления клеток, но имеются и серьезные отличия «клубеньковых» *CLE* пептидов. Прежде всего, следует указать на то, что они появлялись в ответ на внешние воздействия, что и должно было быть, если рассматривать их как сигналы изменений в окружающей среде. Однако до сих пор не удается прямо показать транспорт таких белков из корней к верхней части растения. Это может быть связано с тем, что они претерпевают посттрансляционные изменения и, вероятно, могут быть редуцированы до 12-членных пептидов, включающих гидроксипролиновые остатки. Такие остатки (RLSPGGPDPQHN) являются высококонсервативными, а потому, вероятно, весьма функционально значимыми. Однако такие природные или синтетические укороченные пептиды были не способны повлиять на клубенькообразование. Симбиотические пептиды имеют некоторые специфические участки, состоящие из 4 или 5 аминокислот на N'- и C'-концах соответственно. Таким образом, часть свойств *CLE* пептидов укладывается в их сигнальную специфическую роль в симбиозе, однако прямые доказательства отсутствуют. Одним из объяснений, касающихся потери чувствительности к нитратам, может быть гипотеза о том, что мутации по сигнальным молекулам нарушают их связь с рецептором, что и снимает ингибирующий эффект (Okamoto *et al.*, 2009).

Данная работа японских авторов значительно расширила наше понимание развития АРК, однако оставалось неясным, как связаны клубеньковые факторы типа *CLAVATA* с функционированием регулярных меристем организма.

Ранее было известно, что *CLV3*, *CLV1/CLV2* сигнальный путь служит для негативного контроля активности гена *WUS*, и таким образом поддерживается размер клеточной популяции в верхушечной меристеме растения. В корневой системе в покоящемся центре функционирует связанный с геном *WUS* гомеобокс 5 (*WOX5*). Под его контролем клетки, находящиеся в покоящемся центре, по мере необходимости выходят

из данного состояния в митотический цикл, что позволяет поддерживать баланс между делящимися и дифференцирующимися популяциями. Гены *WUS* и *WOX* являются функционально идентичными, и их регуляция опосредована CLE пептидами. Отсюда следовало, что механизм АРК также может обеспечиваться по сходному пути. Нам удалось проанализировать, каким образом АРК и синтез CLE пептидов сказываются на активности генов, контролирующей развитие меристем (Osipova *et al.*, 2012). В работе были использованы неаллельные мутанты гороха по клубенькообразованию, *Pssym28*, *Pssym29*, и *Psnod3*, и проведено их сравнение с данными, полученными при изучении модельного объекта *Medicago truncatula* (рис. 8).

Ранее было обнаружено, что *WOX5* является одним из генов, активность которого индуцируется в процессе клубенькообразования, его структура а также профиль активности сходны при клубенькообразовании у различных объектов (рис. 9). Активность экспрессии *WOX5* зависела от экзогенного ауксина. Локализация активности данного гена в пределах корневой зоны показала, что она сосредоточена в пределах покоящегося центра, а также приурочена к местам развития боковых корней (рис. 10). На 3–4-й день после инокуляции в корнях люцерны активность *WOX5* была видима в районе деля-

щихся клеток перидермы, эндодермы и кортекса напротив ксилемной поры, что соответствует образованию клубеньковых примордиев. Затем активность смещалась на периферию клубеньков. В общем, эти данные свидетельствовали о возможной связи *WOX5* с процессом клубенькообразования. Профиль его экспрессии также соответствовал процессу развития клубеньков (рис. 11), а у растений, неспособных образовывать клубеньки, активности *WOX5* не наблюдается. У *M. truncatula* (мутация *sun-4*) и у гороха, мутантного по генам *Sym29* и *Sym28*, профили экспрессии четко показали ее увеличение у мутантов, что свидетельствовало о связи АРК побегового комплекса и функционирования корневого гена *WOX5*. Различия в экспрессии носили также тканеспецифичный характер, экспрессия генов у АРК мутантов была выражена по всей меристематической ткани, тогда как у дикого типа она носила гораздо более ограниченный характер.

Если мутации по АРК связаны с дефектами докинга (стыковки) CLV и CLE пептидов, то изменение концентрации последних должно влиять на развитие клубеньков (подавлять) и не оказывать действия на суперклубенькообразование. Для проверки этого 4-дневные проростки были трансформированы штаммами *Agrobacterium rhizogenes*, несущими в

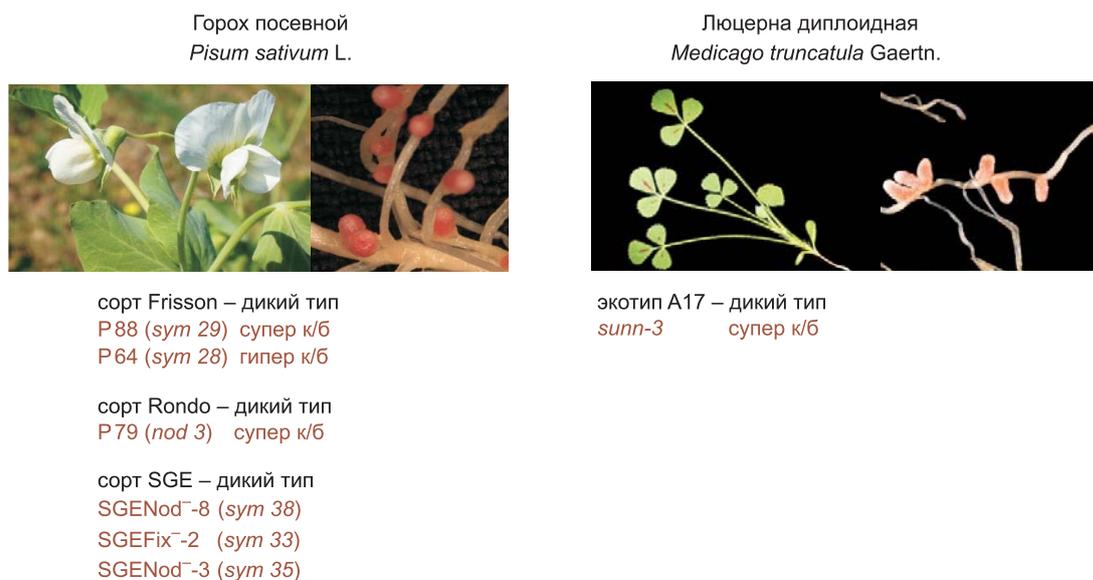


Рис. 8. Объекты изучения системности клубенькообразования.

Мутанты гороха *sym28*, *29*, *nod3* имеют нарушения в системном контроле, однако различаются по степени проявления признака (супер- и гиперклубенькообразование) и месту проявления мутации (корни или побеги).

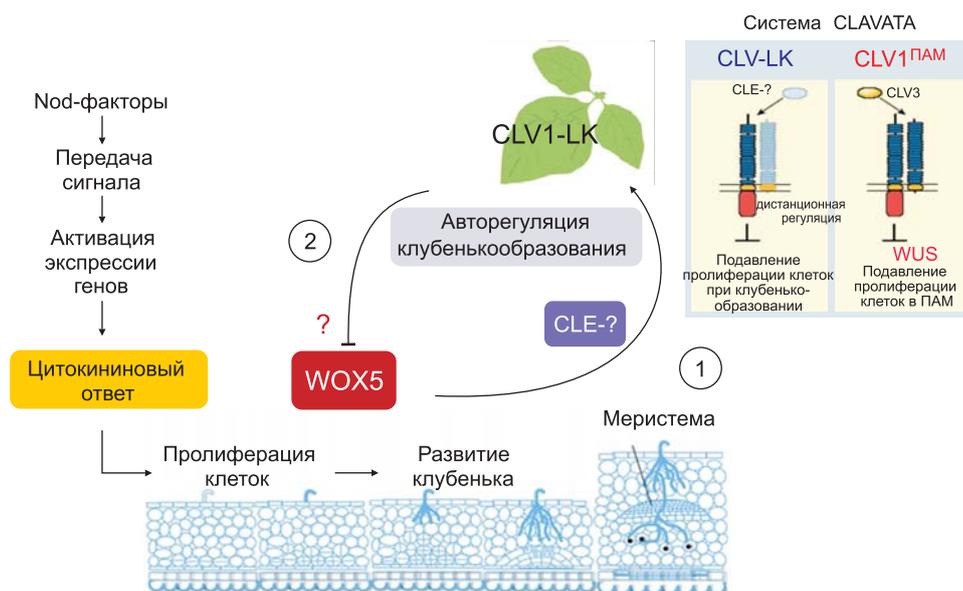


Рис. 9. Регуляция пролиферации клеток при развитии симбиотического клубенька.

В процессе экспрессии *WOX5* индуцируется корневой сигнал (1), который, перемещаясь в побеговую часть, связывается с рецептором типа CLAVATA1. В ответ происходит выработка сигнала, подавляющего клубенькообразование (2).

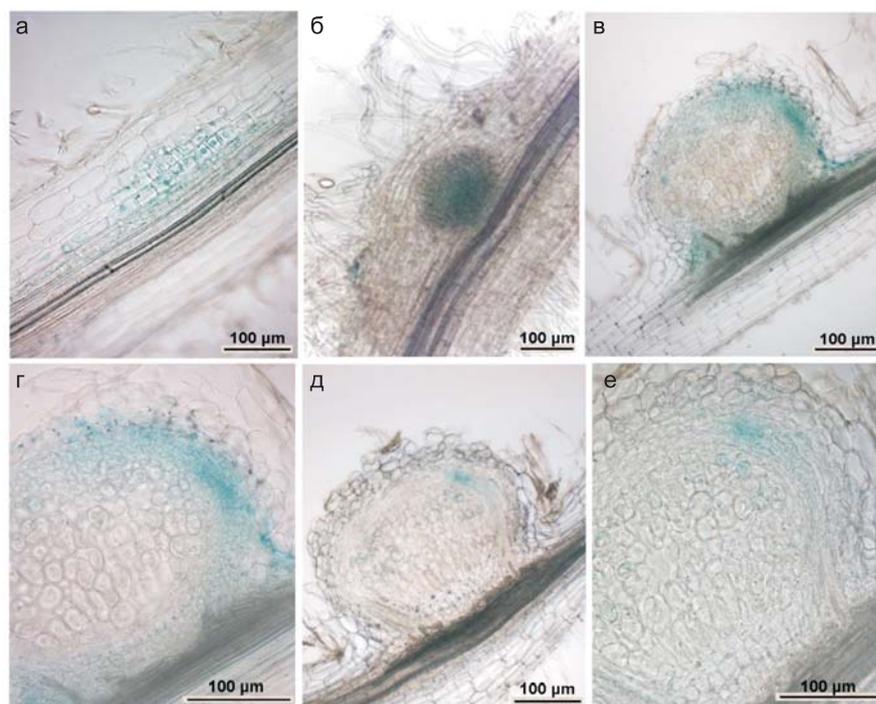


Рис. 10. Локализация экспрессии гена *WOX5* (*pMtWOX5::GUS*) на различных этапах развития клубенька.

Экспрессия *WOX5* (синяя окраска) при клубенькообразовании совпадает с закладкой митотических тканей и следует за развитием меристем аналогично с процессами, происходящими при образовании вторичных корней.

качестве контроля следующие конструкции: *35S::MtCLE13* или *35S::GUS*. Увеличение числа и экспрессии генов *MtCLE13* вызвало резкое подавление клубенькообразования у растений

дикого типа, а у мутантов такого действия не наблюдалось (рис. 12, 13).

Таким образом, нам удалось показать, что экспрессия *WOX5* в клубеньках подавляется

CLV комплексом, который контролирует АРК. Поэтому консервативная регуляторная система WUS/WOX-CLV задействована в контроле не только регулярных, но и клубеньковых, вторичных меристем. На примере АРК мы видим, что для образования экологически облигатных признаков, в частности при симбиотической

азотфиксации, используются уже существующие пути, регулирующие деление клеток. Путем подбора специфических для симбиоза компонентов сигнального пути вырабатывается механизм развития дополнительных функций в зависимости от требований окружающей среды. Важно отметить, что профиль экспрессии

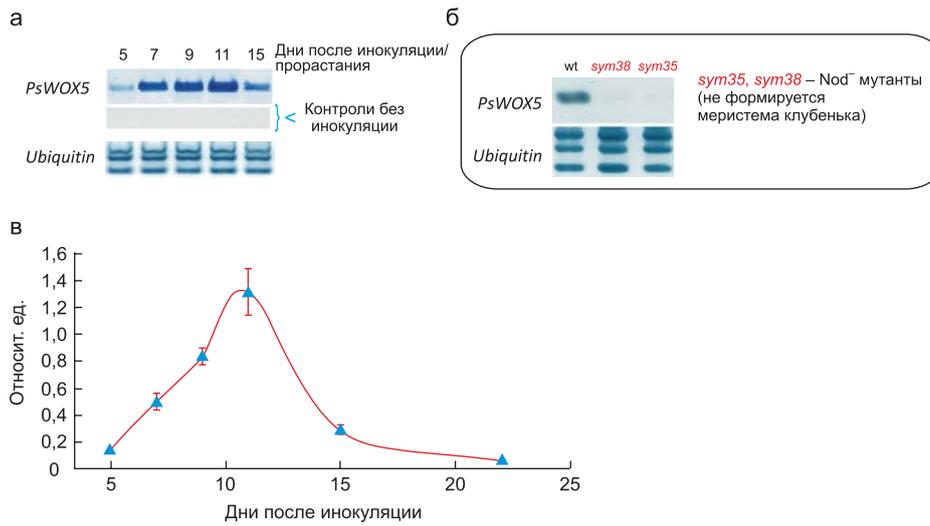


Рис. 11. Анализ экспрессии гена *WOX5* при развитии клубенька.

а – экспрессия *PsWOX5* у гороха дикого типа (Frisson); б – экспрессия *PsWOX5* у мутантов *sym35*, *sym38* на 7 д.п.и.; в – количественный анализ экспрессии *PsWOX5* у гороха дикого типа (Frisson) методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Экспрессия гена *WOX5* не наблюдается в отсутствие инокуляции, так же, как и у мутантов *Nod⁻*. Профиль его активности совпадает с интенсивностью клубенькообразования.

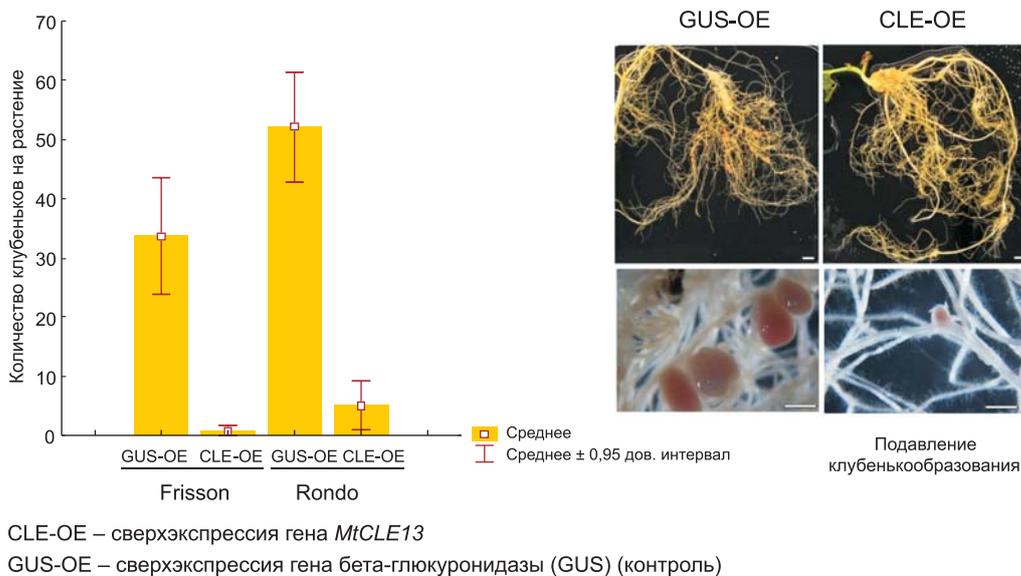


Рис. 12. Влияние сверхэкспрессии гена *MtCLE13* на количество образующихся клубеньков у гороха дикого типа.

Сверхэкспрессия сигнальных пептидов подавляет клубенькообразование в случае наличия активного рецептора (типа *CLA1*).

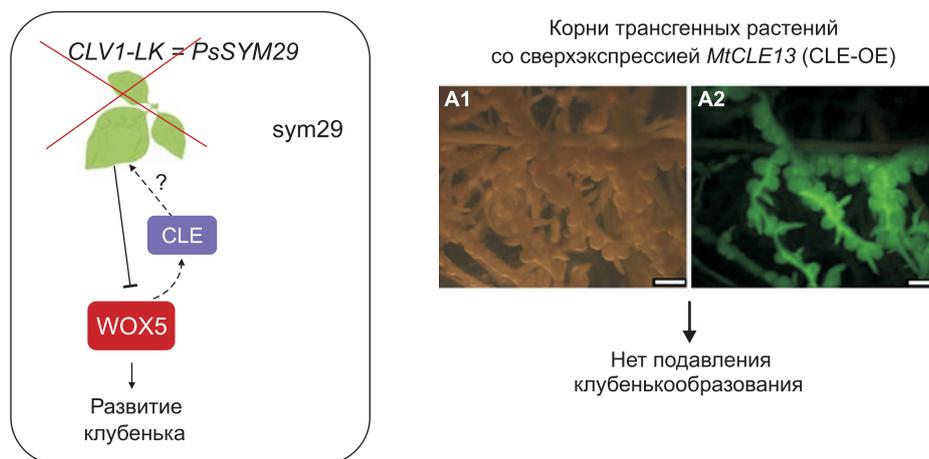


Рис. 13. Влияние сверхэкспрессии гена *MiCLE13* на количество образующихся клубеньков у гороха, мутантного по гену рецептора.

Сверхэкспрессия не влияет на суперклубенькообразование, видимо, вследствие нарушения связи CLV1-CLE.

WOX5 в ходе симбиогенеза сходен с профилем экспрессии генов, вовлеченных в цитокининовый сигналинг. Это заставляет предположить, что данный ген может быть вовлечен в локальную регуляцию клубенькообразования путем влияния на цитокининовый сигналинг, как это имеет место при образовании регулярных меристем, например, у арабидопсиса. Если бы такое сходство существовало, то увеличение активности *WOX5* должно было бы приводить к увеличению клубенькообразования, чего не было отмечено, следовательно роль *WOX5* может и не быть связанной с цитокининовым сигналингом.

Как уже было отмечено, *WOX5* может контролировать клетки покоящегося центра, тем самым регулируя их выход в деление. Изучение системы регуляции клубенькообразования, основанной на генах типа *WOX5*, позволяет приблизиться к пониманию механизмов образования клубеньковых структур из корневых. Например, наиболее простым предположением было бы то, что в ходе развития клубеньков происходит слияние двух корневых меристем, что и дает начало клубеньку. Это предположение было высказано М. Parniske. Нами изучаются мутации, которые связывают между собой два этих процесса. Мутанты гороха по гену *Coch* (*Cochleata*) характеризуются уникальным фенотипом – формированием корня на кончике развивающегося клубенька (рис. 14). Данный ген был клонирован нами в сотрудничестве с

зарубежными коллегами из Института изучения растений (ISV-CNRS, Gif-sur-Yvette, France) с использованием мутанта *noot Medicago truncatula* по гомологичному гену. Изучение гена *Cochleata* показало, что он кодирует белковый регулятор «идентификации» вторичной клубеньковой меристемы, и его «выключение» вследствие мутации ведет к переопределению статуса меристематической ткани с «клубенькового» типа на «корневой». Таким образом, роль *Cochleata* сводится к поддержанию меристемы клубенька в качественно ином состоянии по сравнению с таковым на кончике корня, а отсутствие его экспрессии приводит к «возвращению» меристемы к «базовому», корневому состоянию. Интересно, что у мутантов *M. truncatula* по гомологичному гену *noot* в зоне меристемы клубенька наблюдаются нарушения процессов обратной связи: в отличие от нормы (дикого типа), в клубеньках *noot* повышена экспрессия гена *WOX5* и подавлена экспрессия клубеньк-специфичного гена *CLE*. Следовательно, в основе поддержания статуса клубеньковой меристемы лежит та же консервативная регуляторная система WUS/*WOX*-CLV, при этом отличие от корневой меристемы обеспечивает белковый регулятор COCHLEATA, контролирующей работу данной системы в клубеньках при участии клубеньк-специфичных CLE пептидов.

Проявление мутантного фенотипа *Cochleata* не ограничено корневой системой и затрагивает также надземную часть растения – прилистники

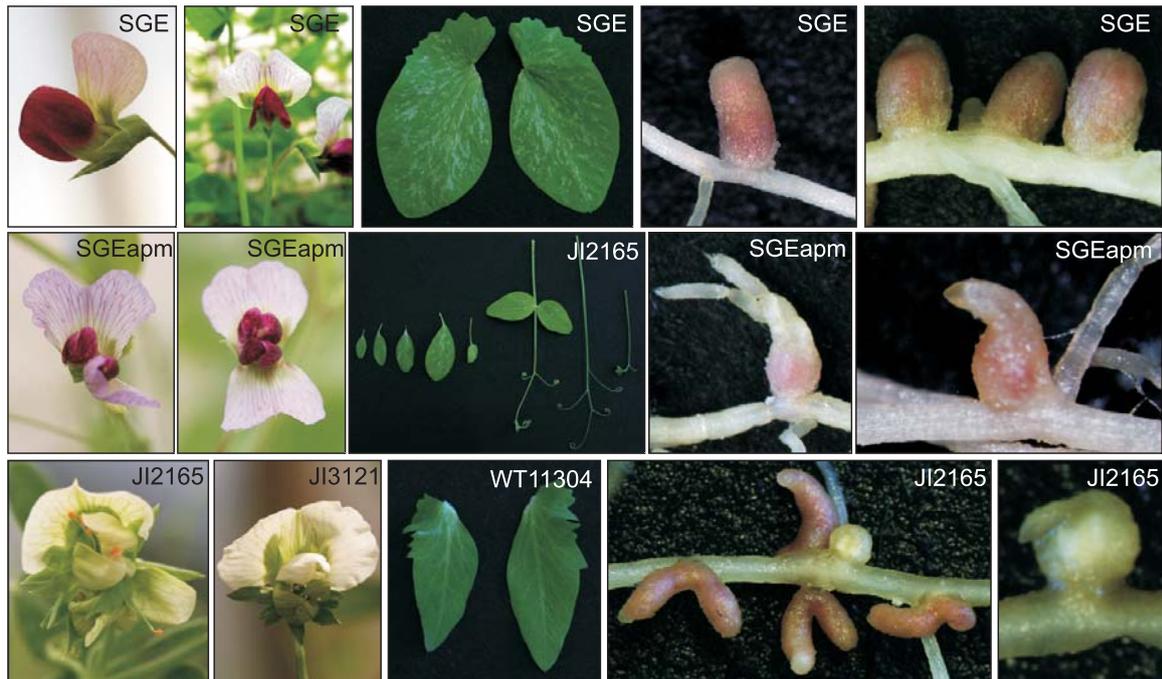


Рис. 14. Варианты проявления мутантного фенотипа *cochleata*.

Мутация определяет неспособность разграничения клубеньковой и корневой меристем. Она также плеiotропно влияет на ряд других признаков растения, связанных с функционированием меристем.

и цветки. Такое плеiotропное действие мутации в симбиотическом гене позволяет считать, что ген *Cochleata* был рекрутирован в систему контроля вторичной меристемы клубенька из более ранней системы контроля побеговых и корневых меристем типа *CLAVATA*.

Генетический анализ показал, что у арабидопсиса в рецепции сигнала, регулирующего функционирование меристемы, принимает участие третий белок – *CLAVATA2* (*CLV2*). Первоначально также предполагалось, что в ходе клубенькообразования *CLV2* и *CLV1* образуют гетеродимерный комплекс. Образование гетеродимеров, кажется, вообще характерно для сигнальных путей, например, это справедливо для рецепторного комплекса *nod*-фактора. Поэтому требовалось проверить, является ли ген *CLV2* специфическим фактором регулярных меристем или он также вовлечен и в симбиотическое взаимодействие.

Роль *CLV2* в процессе клубенькообразования была исследована группой авторов из 7 различных лабораторий мира, использовавших методологию исследований J. Stougaard (Krusell *et al.*, 2011).

Для идентификации *CLV2* гена у лотуса воспользовались геномной библиотекой трансформационно компетентных искусственных бактериальных хромосом (*transformation competent bacterial artificial chromosome -TAC*), в которой был обнаружен ген, названный (*LjClv2*). Подобный ген был обнаружен и у гороха (*PsClv2*). Оба гена были сходны между собой на 85 % и содержали открытую рамку считывания со структурой белка, состоящего соответственно из 719 и 724 аминокислот, с характерной для рецепторов LRR структурой экстрацеллюлярного домена. Они также были сходны с различными белками арабидопсиса, кукурузы и других растений, принимающих участие в контроле развития органов и тканей, а также в контроле устойчивости к фитопатогенам. Экстрацеллюлярная часть генов *LjCLV2*, *PsCLV2* и *MtCLV2* была сходна на 79–74 %, однако сходство с ортологичным геном арабидопсиса было гораздо меньшим: 37–33 %. Это показывает, что для создания новых адаптаций используются уже имеющиеся генетические структуры, которые, модифицируясь, становятся все более специфическими для новых образований, однако

сохраняют некоторые исходные функции. Это в полной мере проявляется при изучении фенотипа мутации *sym28* у гороха. Данный мутант проявляет гипернодулирующий фенотип с 2–3-кратным повышением количества клубеньков, который подчиняется стеблевому контролю. Оказалось, что ряд мутантов с увеличенным количеством клубеньков относятся именно к изменениям гена *Clv2*. При этом эффект выражен слабее и целесообразно было бы именовать данное явление гипернодуляцией в отличие от супернодуляции.

Соответствие мутации *sym28* гену *PsCLV2* убедительно доказано: были получены мутации в данном гене, которые в одном случае привели к появлению соответствующего фенотипа. Более того, в результате создания вектора *LjClv2 RNAi* удалось обеспечить сайленсинг данного гена, что привело к развитию гипернодуляции с двукратным повышением количества клубеньков, а также уменьшению транскрипционной активности до 20–30 % от дикого типа. Никаких изменений в развитии верхней части растения у таких форм выявлено не было. Это удивительно, поскольку в отличие от ранее описанного мутанта суперклубенькообразования *sym29*, у *sym28* хорошо видны изменения в габитусе растения (рис. 15): время закладки и формирования органов, а также расстояния между междоузлиями и закладкой листьев, в результате чего форми-

руется «букет» из цветков и листьев. Ботаники найдут здесь большое количество отклонений от нормального развития гороха. Вероятно, данный вариант *PsCLV2* или утрачивает обычные функции контроля регулярных меристем, или наоборот приобретает все большую специфичность по отношению к процессу клубенькообразования. Комбинация *clv2-1* и *har1-7* мутаций в одном генотипе не привела к изменению числа клубеньков, это подчеркивает, что «клубеньковый» ген *CLV2* работает раньше, чем *CLV1*, т. е. является более общим регулятором. Об этом же говорят и данные по его экспрессии – она независима от индукции симбиогенеза. Все эти данные подчеркивали независимость работы клубеньковых «клават». На это же указывала локализация этих белков в растительной клетке. Это было сделано с использованием бимолекулярной флюоресцентной комплементации. Суть метода состоит в том, что модельный объект, табак *N. benthamiana*, был трансформирован конструкциями, в которых полноразмерные кДНКовые копии *LjHar1* и *LjClv2* были слиты с *nYFP* или *cYFP*, которые по-разному светятся и позволяют отследить локализацию изучаемых белков в клетке. Инфильтрация листьев различными комбинациями взаимодействия белков не выявила. Это следовало из того, что анализируемые белки локализовались либо вместе с маркерами эндоплазматического ретикулюма (*CLV2*),



Рис. 15. Мутантный фенотип по гену *sym28* (Krussell *et al.*, 2002. P. 861–871).

а – гиперклубенькообразование у мутанта (слева) по сравнению с диким типом (сорт Frisson); б – побеги мутанта с фасцированным апикальным стеблем и укороченным расстоянием цветущих междоузлий. Можно видеть стебель мутанта в разрезе; в – то же у дикого типа; г – цветущий апекс дикого типа (увеличено); д – то же у мутанта; е – схема развития растений дикого типа (слева) и мутанта. Отмечено междоузлие, в котором появляется первый лист у дикого типа и у мутанта, а также появление двух листьев в одном междоузлии и фасциация у мутанта.

либо с маркерами плазматической мембраны (CLV1), но никак не вместе. Это доказывает то, что клубеньковое взаимодействие строится на известных механизмах или их составляющих, но отнюдь полностью к ним не сводится. Пока не существует убедительных схем, объясняющих все аспекты взаимодействия элементов молекулярного контроля АРК и клубенькообразования, тем более что такой контроль осуществляется на различных уровнях.

Важным вопросом в развитии учения о системности клубенькообразования является понимание роли гормонов в этом процессе (D'Haeseleer, 2010), в частности ауксина, который может рассматриваться как возможный кандидат на верхушечный сигнал. Стеблевая часть является основным источником данного гормона. Ауксин транспортируется в корни и может являться важным регулятором клубенькообразования. Его концентрация увеличивается у мутантов *supp* по сравнению с диким типом. В растениях дикого типа по мере развития АРК концентрация ауксина уменьшается, чего не наблюдается у мутантов. Вполне возможно, что концентрация данного гормона прямо связана с количеством клубеньков. Однако что-то определенное можно будет сказать по этому поводу только в свете изменения уровня и других гормонов, задействованных в регуляцию клеточных делений, например цитокинина и др.

Системность проявляется как общий признак развития симбиотических отношений с разными микроорганизмами. Разнообразие бактерий, живущих на листовой поверхности растений, было проанализировано у нормальных, бесклубеньковых и суперклубенькообразующих мутантов сои в условиях дефицита и достаточного количества азотных удобрений (Ikeda *et al.*, 2011). Состав популяции листовых бактерий существенно менялся у *Nod*⁻ и *Nod*⁺⁺ растений под воздействием азотных удобрений, тогда как у дикого типа он был более стабилен. Удалось даже определить две ОУТ, которые были наиболее чувствительны к уровню азота.

Системному контролю подчиняется также и микоризная инфекция. Изучение в системе расщепленного корня процесса микоризации на мутанте сои *nts 1007* (Meixner Claudia *et al.*, 2005) показало, что у дикого типа наблюдается явный супрессорный эффект на образование

отстроченных микоризных структур, тогда как у мутантов такой эффект отсутствовал.

Таким образом, АРК – это универсальный механизм контроля симбиотических отношений с микрофлорой.

КОРНЕВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ КЛУБЕНЬКООБРАЗОВАНИЯ

Как показали данные спонтанной изменчивости, регуляция клубенькообразования осуществляется на двух уровнях: на длительном расстоянии (АРК) и на более коротком, при котором регуляция осуществляется непосредственно в корнях. Примером таких исследований может служить работа, выполненная японскими авторами на мутации у *Lotus japonicus*, названной «слишком много любви» (*too much love*). Данный мутант характеризовался гипернодуляцией, однако при исследовании прививок и системы расщепленного корня было показано, что контроль данного признака осуществляется в корневой зоне. Естественно, что наиболее интересным является ответ на вопрос, в какой степени данный уровень регуляции связан с АРК, является ли он его частью. В ходе очень простого эксперимента, в котором мутантные и нормальные растения были обработаны различными концентрациями жасмоновой кислоты, было показано, что она угнетает клубенькообразование у обеих форм пропорционально использованной концентрации. Это наблюдение указывало на то, что данный гормон не является сигнальным фактором во взаимодействии корня–побеги, кроме того, у *tml* мутантов не наблюдается повышенной экспрессии *LjCLE-RS1* системы. Таким образом, скорее всего, мы имеем дело с системой регуляции, ассоциированной с АРК.

В нашем распоряжении была мутация *nod3* у гороха, которая характеризовалась повышенным клубенькообразованием, контроль которого, как и у *tml*, осуществлялся корневой зоной.

Проверка влияния сверхэкспрессии *MtCLE1* у *Psnod3* не выявила подавления клубенькообразования. Это свидетельствует о том, что корневой контроль является частью общей системы АРК, т. е. регуляция осуществляется на двух уровнях: на длительном расстоянии и непосредственно в месте образования клубенька.

Таким образом, сигнальный путь системной реакции достаточно подробно описан на модели клубенькообразования.

ФИЛОСОФСКОЕ ОСМЫСЛЕНИЕ СИСТЕМНОСТИ МРС

Понятия системности во всем их разнообразии описывает или стремится описать философия, в частности философия интеграции приспособительных процессов (см., напр.: Карпин, 2005). Естественно, что наиболее подробно анализируются процессы в многоклеточном животном организме, однако, как нам кажется, и растения в союзе с микроорганизмами представляют собой ценный материал для понимания роли системных процессов в адаптации. Согласно определению, система состоит из далее неделимых элементов. В качестве таких элементов в АРК можно рассматривать гены растений и бактерий, которые, интегрируясь в единую систему, создают расширенные возможности для адаптации. Также в качестве элементов могут выступать рецепторы и сигналы, способные отвечать на вызовы среды. Возмущения среды, выражающиеся в дефиците азота, например, компенсируются за счет привлечения азотфиксирующих бактерий к снабжению растений азотом. Система относительно обособлена по отношению к среде, она противостоит изменениям окружающего мира. Легко видеть, что именно МРС выполняет данную функцию.

Важным для понимания вопроса является иерархичность систем. Она прослеживается на примере дальнего и ближнего сигналинга. Методология анализа МРС вносит нечто новое в понимание высшего уровня системности. Этот уровень толкуется по-разному, в частности академик Ю.В. Наточин считает, что такой уровень представляет из себя организм, а не популяцию (цит. по: Карпин, 2005). Между этими понятиями МРС занимает некоторую промежуточную позицию. Формируясь на основе геномов про- и эукариот, микробная растительная система выступает как более высокая степень по отношению к организму, но зависит в свою очередь от популяционных процессов, протекающих среди почвенной микрофлоры. Понимание такой особенности МРС должно способствовать наиболее

эффективному использованию преимуществ данного уровня адаптаций.

Еще одна особенность МРС заключается в сочетании отрицательных и положительных связей. С одной стороны, на примере формирования симбиотического аппарата мы видим, что регуляция обеспечивается в основном за счет отрицательных связей, сходных с патогенезом, но с другой стороны, после ее возникновения положительные связи начинают преобладать, особенно в сфере интеграции метаболических процессов (более подробно см. Проворов, Воробьев, 2012).

Мы рассмотрели, естественно, не все аспекты системности, но даже на этих примерах видно, что МРС не только вписывается в общую теорию системности и ее регуляции, но и вносит новые моменты, расширяющие наши представления об адаптациях живых организмов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит за предоставленные материалы Л.А. Лутову, М.А. Осипову, А.Ю. Борисова, Е.А. Долгих, В.А. Жукова, О.Ю. Штарк, В.А. Ворошилову, а также Н.А. Проворова за прочтение рукописи и конструктивные предложения.

ЛИТЕРАТУРА

- Додуева И.Е., Орлова Е.В., Осипова М.А., Лутова Л.А. CLE пептиды – универсальные регуляторы развития меристем // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 17–31.
- Карпин В.А. Биологическая система: интеграция приспособительных процессов // Философия науки. 2005. № 3. С. 127–140.
- Лобашев М.Е. Генетика: учебник. 2-е изд. Л.: ЛГУ, 1967. 752 с.
- Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза / Под ред. И.А. Тихоновича. СПб.: Информ-Навигатор, 2012. 399 с.
- Сидорова К.К., Шумный В.К., Назарюк В.М. Симбиотическая азотфиксация: генетические и эколого-агрохимические аспекты. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2006. С. 134.
- Тихонович И.А., Романов В.И., Четкова С.А. и др. Азотфиксация у хлорофилльных мутантов гороха // Докл. АН СССР. 1987. № 294. 4 с.
- D'Haeseleer K., Goormachtig S., Holsters M. Legume nodule development // Developmental Biology – Biotechnological Perspectives Plant / Eds E.C. Pua, M.R. Davey. Berlin;

- Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. V. 1. Ch. 6. DOI 10.1007/978-3-642-02301-9_6#
- Gelin O., Blixt S. Root nodulation in peas // *Agr. Hort. Genetics*. 1964. V. 22. P. 149–159.
- Ikeda S., Anda M., Inaba Sh. *et al.* Autoregulation of nodulation interferes with impacts of nitrogen fertilization levels on leaf-associated bacterial community in soybean // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. doi:10.1128/AEM.02567-10.
- Kosslak R.M., Bohlool B.B. Suppression of nodule development of one side of a split-root system of soybeans caused by prior Inoculation of the other side // *Plant Physiol.* 1984. V. 75. P. 125–130.
- Krusell L., Madsen L.H., Sato S. *et al.* Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase // *Nature*. 2002. V. 420. P. 422–425.
- Krusell L., Sato N., Fukuhara I. *et al.* The *Clavata2* genes of pea and *Lotus japonicus* affect autoregulation of nodulation // *Plant J.* 2011. V. 65. P. 861–871.
- Meixner C., Ludwig-Muller J., Miersch O. *et al.* Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant nts1007 // *Planta*. 2005. V. 222. P. 709–715.
- Nutman P.S. Genetic factors concerned in the symbiosis of clover and nodule bacteria // *Nature*. 1946. V. 157. P. 463.
- Nutman P.S. Improving nitrogen fixation in legumes by plant breeding: The relevance of host selection experiments in red clover (*Trifolium pratense* L.) and subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) // *Plant and Soil*. 1984. V. 82. P. 285–301.
- Osipova M., Mortier V., Demchenko K.N. *et al.* *WUS-CHEL-RELATED HOMEBOX5* gene expression and interaction of CLE peptides with components of the systemic control add two pieces to the puzzle of autoregulation of nodulation // *Plant Physiology*. 2012. V. 158. No. 3. P. 1329–1341.
- Reid D.E., Ferguson B.J., Hayashi S. *et al.* Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation // *Ann. Bot.* 2011. V. 108. P. 789–795.
- Okamoto S., Ohnishi E., Sato Sh. *et al.* Nod factor/nitrate-induced *CLE* genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation // *Plant Cell Physiol.* 2009. V. 50. No. 1. P. 67–77.
- Streeter J.G. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate // *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 1988. V. 7. P. 1–23.