

Агросистемы будущего

УДК 631.461.52:581.557.2:577.175.19

doi: 10.15389/agrobiology.2018.1.3rus

НЕГАТИВНАЯ ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ КЛУБЕНЬКОВ. II. САЛИЦИЛОВАЯ, ЖАСМОНОВАЯ И АБСЦИЗОВАЯ КИСЛОТЫ*

(обзор)

А.В. ЦЫГАНОВА, В.Е. ЦЫГАНОВ

В результате взаимодействия с ризобиями бобовые растения способны фиксировать атмосферный азот в симбиотических клубеньках. Развитие и функционирование симбиотических клубеньков находится под строгим контролем со стороны растения-хозяина, в том числе за счет фитогормональной регуляции (B.J. Ferguson с соавт., 2014). Поскольку процесс формирования клубеньков требует затрат энергии, их число ограничивается растением. В негативную регуляцию клубенькообразования вовлечены, помимо этилена (А.В. Цыганова с соавт., 2015), салициловая (P.C. Van Spronsen с соавт., 2003; G. Stacey с соавт., 2006), жасмоновая (J. Sun с соавт., 2006) и абсцизовая (Y. Ding с соавт., 2008) кислоты. Все перечисленные фитогормоны действуют на разных стадиях развития и функционирования симбиотических клубеньков. Первые негативные эффекты жасмоновой и абсцизовой кислот связаны с блокированием ими кальциевых осцилляций (J. Sun с соавт., 2006; Y. Ding с соавт., 2008), индуцируемых под действием Nod-факторов — липохитоолигосахаридов, которые синтезируются ризобиями и активируют программу развития инфекции и органогенеза клубенька. Кальциевые осцилляции также блокируются этиленом (G.E. Oldroyd с соавт., 2001). Салициловая, жасмоновая и абсцизовая кислоты влияют на дальнейшее развитие симбиоза, блокируя как рост инфекционных нитей, по которым ризобии проникают вглубь корня, так и формирование клубеньковых примордиев (T. Nakagawa с соавт., 2006; J. Sun с соавт., 2006; Y. Ding с соавт., 2008). Негативный эффект абсцизовой кислоты на развитие клубеньковых примордиев опосредован действием на цитокининовый сигнальный каскад (Y. Ding с соавт., 2008). Салициловая, жасмоновая и абсцизовая кислоты также негативно влияют на азот-фиксирующую активность клубеньков, причем отрицательное действие абсцизовой кислоты связано с активацией продукции монооксида азота NO (A. Tomiyaga с соавт., 2010). Тем не менее, все эти фитогормоны могут оказывать и позитивный эффект на формирование и функционирование клубеньков. Например, жасмоновая кислота активирует экспрессию *nod*-генов ризобий, контролирующего синтез Nod-факторов (F. Mabood с соавт., 2006). Для салициловой и абсцизовой кислот показана позитивная роль в активации защитных механизмов растений при действии стрессовых факторов, что приводит к снижению их негативного влияния на функционирование клубеньков (F. Palma с соавт., 2013, 2014). Значительный интерес представляют будущие исследования взаимодействия этилена, салициловой, жасмоновой и абсцизовой кислот при негативной регуляции формирования азотфиксирующих клубеньков. Важно изучить возможности практического использования мутантов с пониженным содержанием какого-либо из фитогормонов. В этой связи перспективно исследование мутанта *enfl* (*enhanced nitrogen fixation1*), полученного на модельном бобовом *Lotus japonicus* и характеризующегося повышенной азотфиксацией (A. Tomiyaga с соавт., 2009). В то же время следует учитывать, что изменение в содержании какого-либо фитогормона может негативно повлиять на развитие растения и его реакцию на абиотические и биотические стрессы.

Ключевые слова: растительно-микробные взаимодействия, бобово-ризобиальный симбиоз, симбиотический клубенек, фитогормоны.

Для бобовых растений характерна важная адаптационная способность к биологической фиксации азота в результате взаимодействия с почвенными бактериями — ризобиями (1). В процессе взаимодействия на корнях бобовых формируются специализированные органы — симбиотические клубеньки; в них ризобии дифференцируются в бактериоиды, которые могут фиксировать атмосферный азот (2). В основе развития симбио-

* Работа финансово поддержана РНФ (проект № 14-24-00135).

«Негативная гормональная регуляция развития симбиотических клубеньков. Сообщение I. Этилен (обзор)» см. в журнале Сельскохозяйственная биология, 2015, 50(3): 267-277 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.3.267rus).

тического клубенька лежит обмен сигнальными молекулами (3). Важная роль в сигналинге принадлежит фитогормонам: жасмоновой кислоте (4), цитокининам и ауксинам (5, 6), гиббереллинам (7), этилену (8, 9), абсцизовой кислоте (10), салициловой кислоте (11), стригалактонам, брассиностероидам (12-14). Процесс формирования азотфиксирующего клубенька весьма энергозатратен, поэтому число клубеньков строго регулируется растением. Ранее мы рассмотрели негативную регуляцию развития и функционирования симбиотических клубеньков этиленом (рис.).

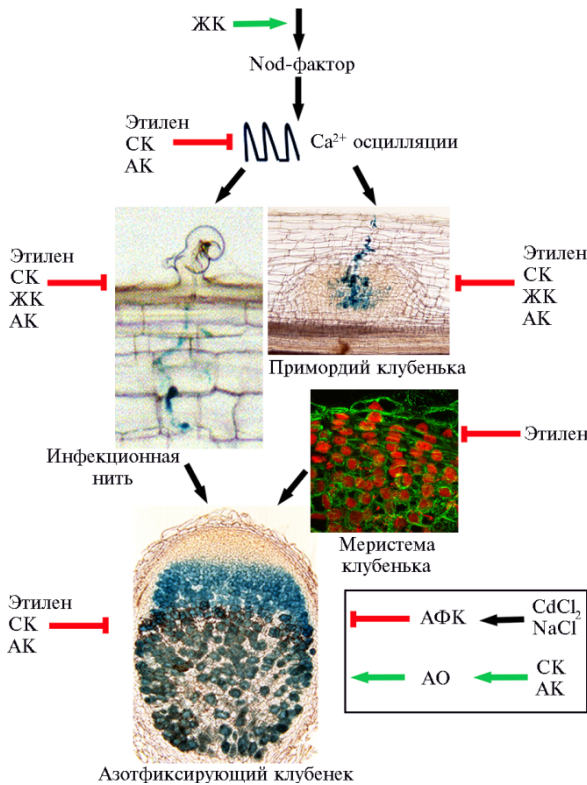


Схема влияния этилена, салициловой, жасмоновой и абсцизовой кислот на развитие и функционирование симбиотического клубенька. Черные стрелки — последовательные стадии развития клубенька, зеленые стрелки — позитивная регуляция стадии развития, красные стрелки — негативная регуляция стадии развития. В рамке показана регуляция при действии стрессовых факторов. ЖК — жасмоновая кислота, СК — салициловая кислота, АК — абсцизовая кислота, АФК — активные формы кислорода, АО — антиоксиданты.

(PTI, PAMP-triggered immunity; pathogen-associated molecular pattern, PAMP), и эффектор-индуцируемого иммунитета (effector-triggered immunity, ETI), а также в возникновении системной приобретенной устойчивости (systemic acquired resistance, SAR) (15). В последние годы активно изучается роль салициловой кислоты в мутуалистическом бобово-ризобиальном симбиозе.

В одной из первых публикаций сообщалось о влиянии салициловой кислоты на клубенькообразование при предобработке семян *Vigna mungo* (L.) Неррег сорта Т-9 разными концентрациями этого соединения. Выявлено уменьшение нитрогеназной активности при всех изученных концентрациях. В то же время концентрация 10 мкМ стимулировала клубенькообразование, тогда как при более высоких концентрациях (100 мкМ и 1 мМ)

Целью нашего обзора стало обсуждение роли салициловой, жасмоновой и абсцизовой кислот в развитии и функционировании клубеньков бобовых растений. Показано, что в эффектах трех фитогормонов имеется определенная специфичность, хотя все они негативно влияют на развитие и функционирование клубеньков. Кроме того, описано позитивное действие жасмоновой кислоты на самых ранних стадиях развития клубеньков, а также адаптивный эффект салициловой и абсцизовой кислот на функционирование клубеньков при стрессе.

Салициловая кислота играет важную роль в цветении, старении, устойчивости к патогенам и абиотическим стрессам (14). Наиболее изучена роль салициловой кислоты в индукции иммунной системы растений при атаке патогенов. Она проявляется в активации иммунитета, индуцируемого молекулярными паттернами, ассоциированными с патогеном

эффект был негативным (16). В другой работе изучали роль Nod-факторов в ингибировании защитных реакций, опосредованных салициловой кислотой, у бобовых растений. Инокуляция люцерны (*Medicago sativa* L.) мутантом ризобий *NodC*⁻, неспособным синтезировать Nod-факторы, а также несовместимым штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* приводила к значительному увеличению аккумуляции салициловой кислоты по сравнению с таковой в растениях инокулированных штаммом дикого типа (17). Экзогенная предобработка растений люцерны 25 мкМ салициловой кислоты (при этой концентрации не наблюдалось влияние обработки на развитие растений) перед инокуляцией ризобиями вызывала задержку формирования клубеньков и уменьшение их числа. Одновременное добавление в питательную среду 10⁻⁷ М Nod-фактора *R. meliloti* и 25 мкМ салициловой кислоты снижало количество формируемых примордиев на 75 %. Следовательно, Nod-факторы наряду с индукцией инфекции и органогенеза клубенька вовлечены в супрессию аккумуляции салициловой кислоты, что необходимо для успешного развития клубенькового примордия (17).

Исследования, проведенные на растениях гороха *Pisum sativum* L. дикого типа Frisson и мутанта P2 (*sym30*), неспособного формировать симбиотические клубеньки и арбускулярную микоризу, показали, что у P2 салициловая кислота накапливалась при инокуляции как штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* дикого типа, так и мутантом по гену *NodC* (18). Инокуляция штаммом микоризного гриба *Glomus mosseae* (Nico. & Gerd.) Gerd. and Trappe также приводила к более существенному накоплению салициловой кислоты у P2 по сравнению с диким типом. При инокуляции растений патогенным штаммом *Pseudomonas syringae* ssp. *syringae* не наблюдалось разницы в количестве салициловой кислоты между мутантом и диким типом. Возможно, мутация *sym30* вызывает специфическую устойчивость к симбиотическим микроорганизмам, связанную с накоплением салициловой кислоты (18).

Негативный эффект салициловой кислоты был описан и для бобовых растений, образующих детерминированные клубеньки с ограниченной активностью клубеньковой меристемы. Так, обработка корней проростков сои *Glycine max* (L.) Merr. 1 мМ или 4 мМ салициловой кислоты достоверно уменьшала число формируемых клубеньков (19). При этом обработка листьев салициловой кислотой (1 мМ), напротив, увеличивала этот показатель. В исследовании Т. Sato с соавт. (20) был выполнен сравнительный анализ влияния салициловой кислоты на клубенькообразование у родительского сорта сои Williams и двух гиперклубенькообразующих мутантов NOD1-3 (*rj7*) и NOD2-4 (*rj8*), формирующих повышенное число клубеньков. Проводилась предобработка 5-суточных проростков салициловой кислотой (100 мкМ) в течение 5 сут, после чего их инокулировали штаммом *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. Наблюдалось значительное снижение числа клубеньков на корнях родительского сорта, причем они не были способны к азотфиксации. В то же время у обоих гиперклубенькообразующих мутантов число клубеньков хоть и было снижено, но в значительно меньшей степени. Эти результаты позволили предположить, что салициловая кислота вовлечена в авторегуляцию клубенькообразования (20).

Эффект салициловой кислоты исследовали у растений вики посевной *Vicia sativa* L., инокулированных штаммами *R. leguminosarum* bv. *viciae* RBL 5523 и 248. Добавление в питательную среду 100 мкМ салициловой кислоты полностью ингибировало способность растений формировать клубеньки (21). В то же время наблюдалась стимуляция клубенькообразо-

вания при обработке салициловой кислотой в концентрации 5 мкМ для штамма RBL 5523 и 0,5 мкМ — для штамма 248. У лядвенца японского *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen клубенькообразование не ингибировалось при инокуляции штаммами TONO, R7A и E1R и добавлении 100 мкМ салициловой кислоты. Негативный эффект обработки салициловой кислотой (100 мкМ) наблюдался для растений гороха исходного сорта Frisson и суперклубенькообразующего мутанта P88, инокулированных штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* RBL 248, растений люцерны *M. sativa* L., инокулированных штаммом *Sinorhizobium meliloti* RCR 2011, клевера ползучего *Trifolium repens* L., инокулированного штаммом *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU 843. В то же время для бобовых растений, формирующих детерминированные клубеньки, — фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) сорта Negro Jamapa, инокулированной штаммом *R. elti* CE3, и сои (*Glycine soja* Siebold & Zucc.), инокулированной *S. fredii* HNO1, показано отсутствие ингибирования клубенькообразования при обработке 100 мкМ салициловой кислоты (21).

В последующих экспериментах было установлено, что негативное действие салициловой кислоты на *V. sativa* проявляется в первые 72 ч после инокуляции растений: предобработка в течение 24 ч не влияла на число клубеньков, а добавление салициловой кислоты через 72 ч снижало этот показатель лишь на 50 %. Показано, что салициловая кислота влияет на ассоциацию ризобий с поверхностью корня, поскольку не было выявлено скрученных корневых волосков и инфекционных нитей. В то же время обработка корней очищенными Nod-факторами вызывала деформацию корневых волосков и при добавлении 100 мкМ салициловой кислоты, в то время как клеточные деления во внутренней коре корня блокировались (21).

В дальнейших экспериментах использовали трансгенные растения *L. japonicus* и *Medicago truncatula* Gaertn., которые несли бактериальный ген *nahG*, кодирующий салицилатгидроксилазу (22). Трансгенные линии *L. japonicus*, несущие одну или две копии гена *nahG*, характеризовались снижением содержания салициловой кислоты, которое коррелировало с увеличенным числом клубеньков и количеством инфекционных нитей в корневых волосках. У трансгенных растений наблюдалось значительное увеличение длины корней. Рост числа инфекционных нитей на сантиметр корня (при сравнении с растениями дикого типа) авторы не отмечали. В экспериментах с точечной инокуляцией корней ризобиями, позволившей nivelировать эффект удлинения корней, было показано, что у растений, экспрессирующих *nahG*, число клубеньков увеличивалось. Аналогичные результаты получили при исследовании другого модельного бобового — *M. truncatula*. Инокуляция композитных растений, экспрессирующих *nahG*, приводила к 2-кратному увеличению числа инфекционных нитей и формируемых клубеньков по сравнению с контролем, при этом видимый эффект в отношении роста корней не наблюдался (22). Вероятно, салициловая кислота может быть вовлечена в авторегуляцию растением числа клубеньков на стадии образования инфекционных нитей посредством активации защитных реакций (22) (см. рис.).

При исследовании роли салициловой кислоты в формировании клубеньков использовались культуры клеток растений дикого типа *L. japonicus* и Nod⁻-мутанта *Ljsum4-2*, несущего мутацию в гене *CASTOR*, который кодирует белок, образующий ионный канал на ядерной мембране. Этот канал участвует в кальциевых осцилляциях, индуцируемых Nod-факторами (23). Мутант *Ljsum4-2* также характеризуется неспособностью формировать арбускулы при инокуляции микоризным грибом, поскольку грибная инфекция abortируется в эпидермальных колонизированных клетках, в которых

активируется программа преждевременной клеточной гибели (24). Культура мутантных клеток демонстрировала повышенную чувствительность к салициловой кислоте (0,5 и 1 мМ), что выражалось в резком увеличении числа мертвых клеток по сравнению с таковым в культуре клеток дикого типа (25). При этом в мутантной культуре наблюдалось двухпиковое увеличение содержания перекиси водорода, характерное для клеточного ответа на патогенную атаку (26). Усиление продукции перекиси водорода предшествовало активации продукции монооксида азота NO. То есть содержание салициловой кислоты, которое клетки дикого типа воспринимают как физиологическую норму, у мутантной культуры становится сигналом к запуску клеточной гибели. У этой культуры также выявили конститутивное повышение экспрессии гена *LjPRI* (25). В то же время у композитных растений, в корнях которых экспрессировался ген *nahG*, клубеньки не формировались. Это подтверждает, что измененная чувствительность к салициловой кислоте у мутанта *Ljsym4-2* не служит причиной Nod⁻-фенотипа.

Показано положительное влияние 2-суточной предобработки салициловой кислотой (0,1 и 0,5 мМ) на нитрогеназную активность и массу клубеньков у 49-суточных растений люцерны (*M. sativa*), которые впоследствии подвергались действию 200 мМ NaCl в течение 12 сут (27). Предполагается, что этот эффект связан с активацией салициловой кислотой антиоксидантного метаболизма (см. рис.). Позитивный эффект отмечался и при обработке 10⁻⁵ М салициловой кислотой надземной части 30-суточных растений нута (*Cicer arietinum* L.) сорта Avarodhi, которые росли в почве, загрязненной кадмием (25 мг) (28). Как у контрольных 90-суточных растений, так и у выросших в загрязненной почве наблюдалось увеличение числа клубеньков, нитрогеназной активности, содержания леггемоглобина, а также ферментов, вовлеченных в усвоение азота (28).

Исследование штамма *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3148 выявило присутствие у ризобий двух систем активного оттока веществ из клетки (efflux pump) типа MFS (major facilitator superfamily), контролируемых генами *salRAB* и *rmrA*, экспрессия которых активируется салициловой кислотой (29). Мутация в гене *sala* приводила к значительному ингибированию роста ризобий в присутствии 2 мМ салициловой кислоты, а изменение в гене *rmrA* не имело такого эффекта. При этом обе мутации не влияли на способность ризобий формировать симбиотические клубеньки и на их азотфиксирующую активность. Эти результаты могут объясняться присутствием в геноме ризобий дополнительных систем активного оттока веществ из клетки, которые компенсируют потерю функционального продукта генов *salRAB* и *rmrA* (29).

Жасмоновая кислота вовлечена в регуляцию различных процессов развития растений, в том числе в условиях биотических и абиотических стрессов, включая бобово-ризобиальный симбиоз (30).

Предполагалось, что не только флавоноиды, но и другие вещества, связанные с фенилпропаноидным путем, могут быть вовлечены в активацию экспрессии *nod* генов ризобий (31). Показано, что жасмоновая кислота и метилжасмонат могут индуцировать экспрессию *nod*-генов у некоторых штаммов ризобий, причем наблюдался синергичный эффект при действии жасмоновой кислоты и нарингенина — природного индуктора флавоноидной природы (31). Позднее был подтвержден позитивный эффект жасмоновой кислоты и метилжасмоната на продукцию Nod-факторов (см. рис.) у штаммов *B. japonicum* 532C и USDA3 (32). Предположение, что жасмоновая кислота наряду с флавоноидами может быть вовлечена в ин-

дукцию *nod*-генов ризобий, подтверждается и тем, что ее высокое содержание наблюдалось в кончиках корней проростков сои *G. max* (L.) Merr. сорта Williams (33). Показано также, что она участвует в индукции биосинтеза флавоноидов, поскольку обработка проростков *M. truncatula* метилжасмонатом приводила к индукции гена *MtFNSII-2*, кодирующего флавоносинтазу II (34).

В то же время при росте *M. truncatula* на среде, содержащей жасмоновую кислоту, число формируемых клубеньков снижалось. Эффект наблюдался уже при концентрации 0,1 мкМ, а при 10 мкМ происходило полное ингибирование образования клубеньков. При этом присутствии 10 мкМ жасмоновой кислоты в культуральной жидкости не влияло на развитие *S. meliloti*, то есть жасмоновая кислота прежде всего препятствует инфицированию ризобиями растения-хозяина (35) (см. рис.). Установлено, что жасмоновая кислота подавляет экспрессию генов *ENOD11* и *RIP1*, активирующихся на начальных этапах развития симбиоза, а также кальциевые осцилляции, вызываемые Nod-фактором (35) (см. рис.). Ранее было показано, что этилен тоже блокирует кальциевые осцилляции (36) (см. рис.). При этом высокие концентрации жасмоновой кислоты (100 мкМ) полностью подавляют осцилляции кальция, тогда как более низкие вызывают изменения в их частоте (35). У нечувствительного к этилену мутанта *sickle* по сравнению с диким типом частота кальциевых осцилляций уменьшалась при более низких концентрациях жасмоновой кислоты, то есть этилен при развитии клубенька ингибирует эффект жасмоновой кислоты и эти гормоны действуют как антогонисты в регуляции индуцируемых Nod-факторами осцилляций кальция (35). При добавлении к растениям дикого типа аминоксидовинилглицина (ингибитор действия этилена) или при использовании мутанта *sickle* негативное действие на клубенькообразование значительно снижалось, что указывает на синергичный эффект жасмоновой кислоты и этилена в общей регуляции клубенькообразования (см. рис.).

Опрыскивание побегов *L. japonicus* метилжасмонатом (10^{-4} - 10^{-3} М) приводило к существенной супрессии клубенькообразования у растений дикого типа и гиперклубенькообразующего мутанта *har1-4*. В то же время при обработке растений низкими концентрациями метилжасмоната (10^{-5} - 10^{-6} М) более сильное ингибирование наблюдалось для мутанта *har1-4*, что, возможно, объясняется большим влиянием низких концентраций метил жасмоната на число формируемых клубеньков у мутанта, лишенного способности воспринимать сигнал авторегуляции (37). Метилжасмонат негативно влиял на число клубеньков, блокируя скручивание корневых волосков, рост инфекционных нитей и формирование клубеньковых примордиев (37) (см. рис.).

Исследования гиперклубенькообразующего мутанта сои *G. max* (L.) Merr. SS2-2, несущего мутацию в гене *NTS/GmNARK*, который кодирует серин-треониновую рецепторную протеинкиназу, сходную с CLAVATA1, выявили повышенную экспрессию генов *vspA*, *vspB* и *Lox2*, активирующихся в ответ на жасмоновую кислоту (38). При этом экспрессия гена *PRI*, контролирующего ответ на салициловую кислоту, напротив, была снижена. Мутант по сравнению с диким типом также характеризовался 2-кратным увеличением содержания жасмоновой кислоты в листьях. Обработка растений метилжасмонатом приводила к снижению числа клубеньков, однако у мутанта *har1-4* после обработки число клубеньков уменьшалось в большей степени, чем у дикого типа (37), а у мутанта SS2-2 — в меньшей степени (38). В листьях, но не в корнях у неинокулированных мутантных

растений наблюдалась более высокая экспрессия генов ответа на жасмоновую кислоту по сравнению с диким типом. Вероятно, NTS/GmNARK участвует в защитном механизме, зависимом от жасмоновой кислоты, как негативный регулятор ее синтеза в листьях наряду с участием в авторегуляции числа клубеньков (38).

В клубеньках *M. truncatula* алленооксидциклаза (фермент, который участвует в биосинтезе жасмоновой кислоты) локализована в пластидах неинфицированных клеток в зоне азотфиксации, а также в клетках коры клубенька (39). Характер распределения алленооксидциклазы не различается в клубеньках, образованных эффективным и неэффективным штаммами. Измерение содержания жасмоновой кислоты не выявило существенной разницы между корнями и клубеньками. У композитных растений *M. truncatula*, в трансгенных корнях которых с помощью РНК-интерференции был выключен ген *MtAOC1*, не наблюдалось изменений в развитии клубеньков, на основании чего авторы сделали вывод, что жасмоновая кислота не участвует в регуляции этого процесса (39).

В то же время было описано положительное воздействие жасмоновой кислоты на образование клубеньков у *L. japonicus*. Мутант *phytochrome B (phyB)* характеризовался сниженным содержанием продуктов фотосинтеза, а также конъюгата жасмоноил-изолейцина (активного производного жасмоновой кислоты) (40). При этом по сравнению с диким типом он формировал меньшее число клубеньков, а обработка жасмоновой кислотой (0,1 мкМ) увеличивала у мутанта их число. У растений дикого типа, выращенных в условиях низкого соотношения красного/дальнего красного света, число клубеньков также было снижено, однако обработка жасмоновой кислотой повышала этот показатель. Представленные данные указывают, что жасмоновая кислота вовлечена с фотоморфогенетическую регуляцию формирования клубеньков посредством восприятия растением соотношения красного/дальнего красного света (40). Инкубация 3-недельных клубеньков сои (*G. max*) сорта Don Mario в течение 5 сут в растворах, содержащих жасмоновую или 12-оксофитодиеновую кислоту (предшественник в биосинтезе жасмоновой кислоты) приводила к увеличению числа и размера клеток в клубеньках (41).

Абсцизовая кислота — важный растительный гормон, вовлеченный в адаптацию растений к различным стрессам, таким как засуха, похолодание, засоление (42).

Показано, что обработки абсцизовой кислотой (см. рис.) корней гороха ингибирует клубенькообразование, останавливая деления клеток коры корня, активирующиеся при формировании клубеньков (43). Негативный эффект абсцизовой кислоты был показан для растений сои *G. max* (L.) Merr. дикого типа и гиперклубенькообразующего мутанта NOD1-3 (44, 45), а также для растений клевера *T. repens* и *L. japonicus* (46). При этом обработка растений лядвенца 1 и 10 мкМ абамина (ингибитор 9-цис-эпокси-каратиноиддиоксигеназы, участвующей в биосинтезе абсцизовой кислоты) приводила к снижению содержания эндогенной абсцизовой кислоты и увеличению числа формируемых клубеньков (46). Исследование инфекционного процесса показало, что абсцизовая кислота значительно снижает количество скрученных корневых волосков и волосков с инфекционными нитями (46) (см. рис.). Позднее было выявлено негативное влияние абсцизовой кислоты и на процесс азотфиксации. Так, ежедневная обработка 3-недельных клубеньков гороха абсцизовой кислотой (100 мкМ) в течение 9 сут приводила к значительному снижению азотфиксации (47). Обработка проростков фасоли (*P. vulgaris* L.) абсцизовой кислотой (1 и

10 мкМ) также уменьшала азотфиксацию. В то же время при добавлении к растениям 100 мМ NaCl в варианте с применением 1 мкМ абсцизовой кислоты азотфиксация была снижена в меньшей степени, чем без обработки (48). Предобработка растений люцерны (*M. sativa* L.) абсцизовой кислотой (10 мкМ) уменьшала активность азотфиксации. Подобно тому, что наблюдалось на растениях фасоли, обработка абсцизовой кислотой снижала негативное воздействие на азотфиксирующую активность клубеньков при добавлении 200 мМ NaCl (49). Авторы связывают такой эффект с активацией абсцизовой кислотой системы антиоксидантной защиты в клубеньках (см. рис.).

В экспериментах с обработкой различными концентрациями абсцизовой кислоты растений *M. truncatula* выявлено ее дозозависимое негативное влияние на число клубеньков и инфекционных нитей (50). Отрицательный эффект подтвердился при анализе экспрессии двух маркерных генов, которые активируются на ранних этапах симбиоза, — *RIP1* и *ENOD11*. Абсцизовая кислота, так же, как жасмоновая (35) и этилен (36), воздействует на кальциевые осцилляции, индуцируемые с участием Nod-факторов (см. рис.). Абсцизовая кислота в дозе 1 мМ полностью блокировала кальциевые осцилляции, в то время как при более низких концентрациях изменялись их частота и амплитуда (50). Установлено, что при высоких концентрациях Nod-факторов негативный эффект абсцизовой кислоты может нивелироваться, то есть при развитии клубенька важен количественный баланс между Nod-фактором и абсцизовой кислотой (50).

Важно отметить, что абсцизовая кислота и этилен регулируют развитие клубеньков независимо. В корнях *M. truncatula* сверхэксперсия мутантного аллеля *abi1-1* гена *ABSCISIC ACID INSENSITIVE1 Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., кодирующего нефункциональную протеинфосфатазу 2C, приводит к блокированию сигнального пути абсцизовой кислоты и увеличению числа клубеньков (50). Другой мутант *sta-1* по гену *SENSITIVITY TO ABA (STA)*, индуцированный непосредственно у *M. truncatula*, формировал сниженное число клубеньков. При этом чувствительность образования клубеньковых примордиев к абсцизовой кислоте у него повышалась, тогда как процессы деформаций и скручивания корневых волосков при действии Nod-факторов становились менее восприимчивыми к ее влиянию (50). Было также показано, что абсцизовая кислота снижает экспрессию генов *ENOD40* и *NIN*, которая активируется во внутренних слоях корня при формировании клубенькового примордия под воздействием цитокинина (50). У растений *snf2 L. japonicus*, несущих мутацию с потерей функции в гене *LOTUS HISTIDINE KINASE 1 (LHK1)*, кодирующем цитокининовый рецептор, абсцизовая кислота подавляет формирование спонтанных клубеньков. Полученные данные подтвердили предположение, что абсцизовая кислота блокирует развитие клубеньковых примордиев, влияя на цитокининовый сигнальный каскад (43, 50). Ранее было показано, что у суперклубенькообразующего мутанта сои *nts382* снижено соотношение абсцизовой кислоты/цитокинины по сравнению с диким типом (51).

При скрининге нечувствительных к абсцизовой кислоте мутантов *L. japonicus* был отобран вариант *enf1 (enhanced nitrogen fixation1)*, который характеризовался увеличенным (в 1,7 раза) числом клубеньков, а также повышенной азотфиксацией (52). У мутанта возрастало число инфекционных нитей. Показано, что мутантный фенотип определяется сниженным содержанием абсцизовой кислоты. Обработка растений дикого типа абаминном также приводила к повышению азотфиксации на фоне уменьшения количества абсцизовой кислоты. Мутация *enf1* не влияла на экспрессию ге-

нов, вовлеченных в фиксацию азота, но вызывала снижению содержания оксида азота NO (52, 53), который служит ингибитором азотфиксации (54).

Таким образом, выявлено негативное влияние салициловой кислоты на развитие симбиотических клубеньков как при экзогенной обработке, так и при изменении ее эндогенного уровня в трансгенных растениях. Негативный эффект наблюдался как у растений с детерминированными клубеньками (с ограниченной активностью меристемы), так и с недетерминированными (с продолжительной активностью меристемы). Салициловая кислота также приводила к снижению азотфиксации. Следует отметить, что при солевом стрессе интенсивность азотфиксации снижалась в меньшей степени у растений, подвергшихся предобработке салициловой кислотой, что, вероятно, связано с активацией системы антиоксидантной защиты при воздействии салициловой кислоты. В то же время недавно описано положительное влияние салициловой кислоты на образование клубеньков и азотфиксирующую активность у растений нута, выросших как в присутствии в почве солей кадмия, так и без них. Показано, что экзогенная жасмоновая кислота служит негативным регулятором клубенькообразования, но вместе с тем имеются сведения об ее позитивной роли в этом процессе (индукция *nod*-генов ризобий), а также о неучастии эндогенной жасмоновой кислоты в развитии симбиотического клубенька. Негативная регуляция развития клубеньков была продемонстрирована и для абсцизовой кислоты как с использованием экзогенных обработок, так и на мутантах с измененным количеством эндогенной абсцизовой кислоты. В то же время предобработка абсцизовой кислоты снижало негативное действие солевого стресса, вероятно, за счет активации антиоксидантной защиты.

Итак, в целом можно сказать, что салициловая, жасмоновая и абсцизовая кислоты, как и этилен служат негативными регуляторами развития и функционирования клубеньков, причем регуляция осуществляется на разных стадиях их развития. В то же время эти фитогормоны могут быть вовлечены в позитивную регуляцию, особенно при стрессовых условиях. Большой интерес представляют дальнейшие исследования, которые позволят выявить и описать взаимодействие между этиленом, салициловой, жасмоновой и абсцизовой кислотами в процессе регуляции бобово-ризобиального симбиоза, а также обнаружить особенностей действия каждого из фитогормонов.

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

Поступила в редакцию
5 сентября 2016 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 1, pp. 3–14

NEGATIVE HORMONAL REGULATION OF SYMBIOTIC NODULE DEVELOPMENT. II. SALICILIC, JASMONIC AND ABSCISIC ACIDS (review)

A.V. Tsyganova, V.E. Tsyganov

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency for Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail tsyganov@arriam.spb.ru (✉ corresponding author)
ORCID:

Tsyganova A.V. orcid.org/0000-0003-3505-4298

Tsyganov V.E. orcid.org/0000-0003-3105-8689

The author declares no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by Russian Science Foundation (project № 14-24-00135)

Received September 5, 2016

doi: 10.15389/agrobiology.2018.1.3eng

Abstract

As a result of interaction with rhizobia, legume plants are able to fix atmospheric nitrogen in symbiotic nodules. Development and functioning of symbiotic nodules are under strong host plant control, including phytohormonal regulation (B.J. Ferguson et al., 2014). Due to the fact that nodule formation is a highly energy-consuming process, nodule number is restricted by plant. The negative regulation of nodulation involves, along with ethylene (A.V. Tsyganova et al., 2015), also salicylic (P.C. Van Spronsen et al., 2003; G. Stacey et al., 2006), jasmonic (Sun et al., 2006) and abscisic (Ding et al., 2008) acids. It is important to note that all listed phytohormones act at the different stages of development and functioning of symbiotic nodules. The first negative effects of jasmonic and abscisic acids are related to the blocking of calcium oscillations (J. Sun et al., 2006; Y. Ding et al., 2008), induced by Nod factors (lipochitooligosaccharides synthesized by rhizobia and activating a program for the development of infection and nodule organogenesis). Calcium oscillations are also blocked by ethylene (G.E. Oldroyd et al., 2001). Salicylic, jasmonic and abscisic acids influence the further development of symbiosis, blocking both the growth of infection threads (through which the rhizobia penetrate into the root), and the formation of nodule primordia (T. Nakagawa et al., 2006; J. Sun et al., 2006; Y. Ding et al. 2008). For abscisic acid it was shown that its negative effect on the development of nodule primordia is mediated by the influence on cytokinin signal transduction pathway (Y. Ding et al., 2008). Salicylic, jasmonic and abscisic acids also negatively affect the nitrogen-fixing activity of the nodules, and for abscisic acid it has been shown that the negative effect is associated with the activation of the production of nitrogen monoxide NO (A. Tominaga et al., 2010). Nevertheless, all these phytohormones can have a positive effect on the formation and functioning of nodules. For example, jasmonic acid activates the expression of rhizobial *nod* genes that control the synthesis of Nod factors (F. Mabood et al., 2006). It is interesting to note that for salicylic and abscisic acids a positive role in activating the defense mechanisms in plants under the action of stress factors has been shown, which leads to a decrease in their negative effect on the functioning of the nodules (F. Palma et al., 2013, 2014). Future studies of the interaction of ethylene, salicylic, jasmonic and abscisic acids in the negative regulation of the formation of nitrogen-fixing nodules are of great interest. Such studies should shed light on why several phytohormones are involved in negative regulation and what the specificity of each of them is. It is important to study the possibility of practical use of mutants with a lower level of any of the phytohormones (ethylene, salicylic, jasmonic and abscisic acids). Therefore, it seems promising to study the mutant *enfl* (*enhanced nitrogen fixation1*), obtained on the model legume *Lotus japonicus* and characterized by an increased level of nitrogen fixation (A. Tominaga et al., 2009). At the same time, it should be considered that a change in the level of a certain phytohormone can have a negative impact both on the development of the plant and its response to abiotic and biotic stresses.

Keywords: plant-microbe interactions, legume-rhizobial symbiosis, symbiotic nodule, phytohormones.

REFERENCES

1. Tsyganova V.A., Tsyganov V.E. *Uspekhi sovremennoi biologii*, 2012, 132(2): 211-222 (in Russ.).
2. Tsyganova A.V., Kitaeva A.B., Brevin N.Dzh., Tsyganov V.E. [Cellular mechanisms of nodule development in legume plants. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2011, 3: 34-40 (in Russ.).
3. Oldroyd G.E. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2013, 11(4): 252-263 (doi: 10.1038/nrmicro2990).
4. Hause B., Schaarschmidt S. The role of jasmonates in mutualistic symbioses between plants and soil-born microorganisms. *Phytochemistry*, 2009, 70(13): 1589-1599 (doi: 10.1016/j.phytochem.2009.07.003).
5. Desbrosses G.J., Stougaard J. Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways. *Cell Host Microbe*, 2011, 10(4): 348-358 (doi: 10.1016/j.chom.2011.09.005).
6. Suzaki T., Ito M., Kawaguchi M. Genetic basis of cytokinin and auxin functions during root nodule development. *Front. Plant Sci.*, 2013, 4: 42 (doi: 10.3389/fpls.2013.00042).
7. Hayashi S., Gresshoff P.M., Ferguson B.J. Mechanistic action of gibberellins in legume nodulation. *J. Integr. Plant Biol.*, 2014, 56(10): 971-978 (doi: 10.1111/jipb.12201).
8. Guinel F.C. Ethylene, a hormone at the center-stage of nodulation. *Front. Plant Sci.*, 2015, 6: 1121 (doi: 10.3389/fpls.2015.01121).
9. Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Negative hormonal regulation of symbiotic nodule development. I. Ethylene (review). *Agricultural Biology*, 2015, 50(3): 267-277 (doi: 10.15389/agrobiol.2015.3.267eng).
10. Stec N., Banasiak J., Jasiński M. Abscisic acid-an overlooked player in plant-microbe symbioses formation? *Acta Biochim. Pol.*, 2016, 63(1): 53-58 (doi: 10.18388/abp.2015_1210).
11. Rivas-San Vicente M., Plasencia J. Salicylic acid beyond defense: its role in plant growth and

- development. *J. Exp. Bot.*, 2011, 62(10): 3321-3338 (doi: 10.1093/jxb/err031).
12. Ryu H., Cho H., Choi D., Hwang I. Plant hormonal regulation of nitrogen-fixing nodule organogenesis. *Mol. Cells*, 2012, 34(2): 117-126 (doi: 10.1007/s10059-012-0131-1).
 13. Nagata M., Suzuki A. Effects of phytohormones on nodulation and nitrogen fixation in leguminous plants. In: *Advances in biology and ecology of nitrogen fixation*. T. Ohyama (ed.). InTech, Rijeka, Croatia, 2014: 111-128 (doi: 10.5772/57267).
 14. Ferguson B.J., Mathesius U. Phytohormone regulation of legume-rhizobia interactions *J. Chem. Ecol.*, 2014, 40(7): 770-790 (doi: 10.1007/s10886-014-0472-7).
 15. Vlot A.C., Dempsey D.M.A., Klessig D.F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2009, 47: 177-206 (doi: 10.1146/annurev.phyto.050908.135202).
 16. Ramanujam M.P., Jaleel V.A., Kumaravelu G. Effect of salicylic acid on nodulation, nitrogenous compounds and related enzymes of *Vigna mungo*. *Biologia Plantarum*, 1998, 41(2): 307-311 (doi: 10.1023/A:1001859824008).
 17. Martinez-Abarca F., Herrera-Cervera J.A., Bueno P., Sanjuan J., Bisseling T., Olivares J. Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *Mol. Plant Microbe In.*, 1998, 11(2): 153-155 (doi: 10.1094/MPMI.1998.11.2.153).
 18. Blilou I., Ocampo J.A., García-Garrido J.M. Resistance of pea roots to endomycorrhizal fungus or *Rhizobium* correlates with enhanced levels of endogenous salicylic acid. *J. Exp. Bot.*, 1999, 50(340): 1663-1668 (doi: 10.1093/jxb/50.340.1663).
 19. Lian B., Zhou X., Miransari M., Smith D.L. Effects of salicylic acid on the development and root nodulation of soybean seedlings. *J. Agron. Crop Sci.*, 2000, 185(3): 187-192 (doi: 10.1046/j.1439-037x.2000.00419.x).
 20. Sato T., Fujikake H., Ohtake N., Sueyoshi K., Takahashi T., Sato A., Ohyama T. Effect of exogenous salicylic acid supply on nodule formation of hypernodulating mutant and wild type of soybean. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 2002, 48(3): 413-420 (doi: 10.1080/00380768.2002.10409219).
 21. van Spronsen P.C., Tak T., Rood A.M., van Brussel A.A., Kijne J.W., Boot K.J. Salicylic acid inhibits indeterminate-type nodulation but not determinate-type nodulation. *Mol. Plant Microbe In.*, 2003, 16(1): 83-91 (doi: 10.1094/MPMI.2003.16.1.83).
 22. Stacey G., McAlvin C.B., Kim S.Y., Olivares J., Soto M.J. Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.*, 2006, 141(4): 1473-1481 (doi: 10.1104/pp.106.080986).
 23. Riely B.K., Lounnon G., Ané J.-M., Cook D.R. The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *Plant J.*, 2007, 49(2): 208-216 (doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02957.x).
 24. Bonfante P., Genre A., Faccio A., Martini I., Schauser L., Stougaard J., Webb J., Parniske M. The *Lotus japonicus* *LjSym4* gene is required for the successful symbiotic infection of root epidermal cells. *Mol. Plant Microbe In.*, 2000 13(10): 1109-1120 (doi: 10.1094/MPMI.2000.13.10.1109).
 25. Bastianelli F., Costa A., Vescovi M., D'Apuzzo E., Zottini M., Chiurazzi M., Schiavo F.L. Salicylic acid differentially affects suspension cell cultures of *Lotus japonicus* and one of its non-symbiotic mutants. *Plant Mol. Biol.*, 2010, 72(4-5): 469-483 (doi: 10.1007/s11103-009-9585-8).
 26. Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 1994, 94(4): 491-501 (doi: 10.1016/0092-8674(94)90544-4).
 27. Palma F., Lypez-Gymez M., Tejera N.A., Lluch, C. Salicylic acid improves the salinity tolerance of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* by preventing nitrogen fixation inhibition. *Plant Sci.*, 2013, 208: 75-82 (doi: 10.1016/j.plantsci.2013.03.015).
 28. Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M.N., Ahmad A. Salicylic acid enhances the efficiency of nitrogen fixation and assimilation in *Cicer arietinum* plants grown under cadmium stress. *J. Plant Interact.*, 2014, 9(1): 35-42 (doi: 10.1080/17429145.2012.751635).
 29. Tett A.J., Karunakaran R., Poole P.S. Characterisation of SalRAB a salicylic acid inducible positively regulated efflux system of *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* 3841. *PLoS ONE*, 2014, 9(8): e103647 (doi: 10.1371/journal.pone.0103647).
 30. Wasternack C., Hause B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 2013, 111(6): 1021-1058 (doi: 10.1093/aob/mct067).
 31. Rosas S., Soria R., Correa N., Abdala G. Jasmonic acid stimulates the expression of nod genes in *Rhizobium*. *Plant Mol. Biol.*, 1998, 38(6): 1161-1168 (doi: 10.1023/A:1006064807870).
 32. Mabood F., Souleimanov A., Khan W., Smith D.L. Jasmonates induce Nod factor production by *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiol. Bioch.*, 2006, 44(11): 759-765 (doi: 10.1016/j.plaphy.2006.10.025).
 33. Creelman R.A., Mullet J.E. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *PNAS USA*, 1995, 92(10): 4114-4119 (doi: 10.1073/pnas.92.10.4114).
 34. Zhang J., Subramanian S., Zhang Y., Yu O. Flavone synthases from *Medicago truncatula* are flavanone-2-hydroxylases and are important for nodulation. *Plant Physiol.*, 2007, 144(2): 741-751 (doi: 10.1104/pp.106.095018).

35. Sun J., Cardoza V., Mitchell D.M., Bright L., Oldroyd G., Harris J.M. Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant J.*, 2006, 46(6): 961-970 (doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02751.x).
36. Oldroyd G.E.D., Engstrom E.M., Long S.R. Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 2001, 13(8): 1835-1849 (doi: 10.2307/3871322).
37. Nakagawa T., Kawaguchi M. Shoot-applied MeJA suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.*, 2006, 47(1): 176-180 (doi: 10.1093/pcp/pci222).
38. Seo H.S., Li J., Lee S.-Y., Yu J.-W., Kim K.-H., Lee S.-H., Lee I.-J., Paek N.-C. The hyper-nodulating *nts* mutation induces jasmonate synthetic pathway in soybean leaves. *Mol. Cells*, 2007, 24(2): 185.
39. Zdyb A., Demchenko K., Heumann J., Mrosk C., Grzeganeck P., Göbel C., Feussner I., Pawlowski K., Hause B. Jasmonate biosynthesis in legume and actinorhizal nodules. *New Phytol.*, 2011, 189(2): 568-579 (doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03504.x).
40. Suzuki A., Suriyagoda L., Shigeyama T., Tominaga A., Sasaki M., Hiratsuka Y., Yoshinaga A., Arima S., Agarie S., Sakai T., Inada S., Jikumaru Y., Kamiya Y., Uchiumi T., Abe M., Hashiguchi M., Akashi R., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Hirsch A.M. *Lotus japonicus* nodulation is photomorphogenetically controlled by sensing the red/far red (R/FR) ratio through jasmonic acid (JA) signaling. *PNAS USA*, 2011, 108(40): 16837-16842 (doi: 10.1073/pnas.1105892108).
41. Costanzo M.E., Andrade A., del Carmen Tordable M., Cassán F., Abdala G. Production and function of jasmonates in nodulated roots of soybean plants inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. *Arch. Microbiol.*, 2012, 194(10): 837-845 (doi: 10.1007/s00203-012-0817-y).
42. Umezawa T., Nakashima K., Miyakawa T., Kuromori T., Tanokura M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol.*, 2010, 51(11): 1821-1839 (doi: 10.1093/pcp/pcq156).
43. Phillips D.A. Abscisic acid inhibition of root nodule initiation in *Pisum sativum*. *Planta*, 1971, 100(3): 181-190 (doi: 10.1007/BF00387034).
44. Cho M.J., Harper J.E. Effect of abscisic acid application on root isoflavonoid concentration and nodulation of wild-type and nodulation-mutant soybean plants. *Plant Soil*, 1993, 153(1): 145-149 (doi: 10.1007/BF00010552).
45. Bano A., Harper J.E., Auge R.M., Neuman D.S. Changes in phytohormone levels following inoculation of two soybean lines differing in nodulation. *Funct. Plant Biol.*, 2002, 29(8): 965-974 (doi: 10.1071/PP01166).
46. Suzuki A., Akune M., Kogiso M., Imagama Y., Osuki K., Uchiumi T., Higashi S., Han S.Y., Yoshida S., Asami T., Abe M. Control of nodule number by the phytohormone abscisic acid in the roots of two leguminous species. *Plant Cell Physiol.*, 2004, 45(7): 914-922 (doi: 10.1093/pcp/pch107).
47. González E.M., Gálvez L., Arrese-Igor C. Abscisic acid induces a decline in nitrogen fixation that involves leghaemoglobin, but is independent of sucrose synthase activity. *J. Exp. Bot.*, 2001, 52(355): 285-293 (doi: 10.1093/jexbot/52.355.285).
48. Khadri M., Tejera N.A., Lluch C. Alleviation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris*) by exogenous abscisic acid supply. *J. Plant Growth Regul.*, 2006, 25(2): 110-119 (doi: 10.1007/s00344-005-0004-3).
49. Palma F., Lypez-Gymez M., Tejera N.A., Lluch C. Involvement of abscisic acid in the response of *Medicago sativa* plants in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* to salinity. *Plant Sci.*, 2014, 223: 16-24 (doi: 10.1016/j.plantsci.2014.02.005).
50. Ding Y., Kalo P., Yendrek C., Sun J., Liang Y., Marsh J.F., Harris J.M., Oldroyd G.E. Abscisic acid coordinates nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 2008, 20(10): 2681-2695 (doi: 10.1105/tpc.108.061739).
51. Caba J.M., Centeno M.L., Fernández B., Gresshoff P.M., Ligeró F. Inoculation and nitrate alter phytohormone levels in soybean roots: differences between a supernodulating mutant and the wild type. *Planta*, 2000, 211(1): 98-104 (doi: 10.1007/s004250000265).
52. Tominaga A., Nagata M., Futsuki K., Abe H., Uchiumi T., Abe M., Kucho K., Hashiguchi M., Akashi R., Hirsch A.M., Arima S., Suzuki A. Enhanced nodulation and nitrogen fixation in the abscisic acid low-sensitive mutant *enhanced nitrogen fixation1* of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.*, 2009, 151(4): 1965-1976 (doi: 10.1104/pp.109.142638).
53. Tominaga A., Nagata M., Futsuki K., Abe H., Uchiumi T., Abe M., Kucho K., Hashiguchi M., Akashi R., Hirsch A., Arima S., Suzuki A. Effect of abscisic acid on symbiotic nitrogen fixation activity in the root nodules of *Lotus japonicus*. *Plant Signaling & Behavior*, 2010, 5(4): 440-443 (doi: 10.4161/psb.5.4.10849).
54. Shimoda Y., Shimoda-Sasakura F., Kucho K., Kanamori N., Nagata M., Suzuki A., Abe M., Higashi S., Uchiumi T. Overexpression of class I plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant J.*, 2009, 57(2): 254-263 (doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03689.x).