

## ПРОТЕОМІКА БОБОВО-РИЗОБІАЛЬНОГО СИМБІОЗУ: ДОСЯГНЕННЯ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

Ю. Ю. КОНДРАТЮК, П. М. МАМЕНКО, С. Я. КОЦЬ

*Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ;  
e-mail: kondratyuk\_yulya@ukr.net*

*Огляд присвячено аналізу й узагальненню результатів протеомних досліджень бобово-ризобіального симбіозу. Обговорюються методичні складнощі, пов'язані з виділенням протеїнових екстрактів симбіотичних структур, та шляхи їх подолання. Висвітлено основні зміни процесів біосинтезу протеїнів за формування та функціонування симбіотичних утворень. Певну увагу приділено значенню протеомних досліджень рослинно-мікробних утворень, ролі макромолекул протеїнів у формуванні адаптаційних стратегій за несприятливих умов навколишнього середовища. Проаналізовано стратегічні та концептуальні перспективи протеоміки бобово-ризобіального симбіозу.*

*Ключові слова: протеоміка, протеїни, ризобії, симбіотична азотфіксація, бобово-ризобіальний симбіоз, методи екстракції протеїнів, стресорні фактори.*

Симбіотична азотфіксація є надзвичайно важливим процесом, завдяки якому здійснюється щорічне зв'язування 40 млн. тон нітрогену атмосфери [1] та забезпечення людства «екологічно чистою» продовольчою, кормовою та технічною продукцією [2]. Разом з тим конкуренція бобових рослин з іншими важливими сільськогосподарськими культурами за посівні площі [3, 4] та зростаючий стресорний тиск [1, 5, 6] не дозволяють істотно збільшувати їх виробництво. Єдиним виходом із цієї ситуації є вдосконалення стратегій їх вирощування, які б дозволяли повною мірою враховувати всі шляхи досягнення максимального кількісного та якісного результату за оптимального поєднання генетичного потенціалу рослини, кліматичних умов та агротехнічних прийомів. Тому, у першу чергу, для підвищення врожайності бобових рослин необхідно здійснювати ідентифікацію та характеристику генів і протеїнів, під контролем яких знаходиться продуктивність цих культур, та можливості їх пристосування до широкого діапазону умов зростання [7].

Протеоміка – новітній методологічний підхід постгеномної біологічної науки, який все частіше використовується в усіх галузях біології, біотехнології та біомедицини. Спектр можливостей, який вона відкриває, включає в себе як виявлення нових протеїнів, так і розкриття механізмів

складних протеїнових взаємодій. Ідентифікація пулу протеїнів та їх порівняння методами SDS-PAGE та двовимірного електрофорезу дозволяють вивчати відмінності протеїнової експресії в різних організмів і в різних умовах їх існування. Виявлення протеїн-протеїнових взаємодій за допомогою епітопного картування, імуноафінної хроматографії, електрофорезу в нативних умовах, аналіз посттрансляційних модифікацій, включаючи фосфорилювання, глікозилювання, процесинг та протеоліз, глобальне структурне вивчення складних протеїнових комплексів із використанням часткового протеолізу або ізотопного мічення – всі ці та інші етапи і методи протеомного аналізу дають можливість як найповніше охарактеризувати структуру та функції протеїну, його філогенетичне походження і роль в організмі та навколишньому середовищі [8, 9].

Розвиток сучасного високотехнологічного сільського господарства характеризується швидким впровадженням у різні його сфери результатів наукових досліджень, зокрема протеомних, починаючи з генної інженерії і закінчуючи контролем якості продукції та екологічним моніторингом [10]. Ідентифікація, каталогізація, якісний, кількісний та системний аналіз усієї сукупності протеїнів, синтезованих у клітинах, тканинах, в організмі

сільськогосподарських культур – необхідні прийоми, що дають важливу інформацію про їхні протеїнові профілі. Саме це дозволяє характеризувати рослину на предмет її поживної цінності, виявляти фактори, які впливають на її ріст і розвиток, а відтак визначати рівень врожайності, матеріальної та екологічної доцільності її вирощування.

Повне секвенування послідовностей геному таких модельних небобових рослин, як рис та арабідопсис дають уявлення щодо багатьох фундаментальних особливостей фізіології і біохімії рослин [11, 12]. Однак вони не дозволяють розкрити деякі важливі аспекти біології бобових, серед яких найдослідженішими в напрямі розшифровки геному та функціональної геноміки є *Lotus japonicus* і *Medicago truncatula* [13]. Дослідження геному сої здійснено в рамках проекту *Phytozome* (<http://www.phytozome.net/soybean>). Проте функціональна геноміка сої знаходиться в зародковому стані, тому протеоміка може бути потужним інструментом для аналізу функцій генів та протеїнів цієї важливої сільськогосподарської культури [14].

Протеоміка є ідеальним інструментом для вивчення рослинно-мікробних угруповань взагалі і бобово-ризобіального симбіозу, зокрема. По-перше, вона дає змогу ідентифікувати протеїни, що продукуються обома партнерами під час їх взаємодії і є критичними для встановлення і розвитку симбіозу, та дозволяє виявляти посттрансляційні модифікації в них. По-друге, вона відкриває можливість простежувати часові зміни протеїнових профілів під час функціонування симбіотичних систем бобових рослин та мікроорганізмів як за оптимальних, так і за стресових умов, що в свою чергу відкриває можливості спрямовано впливати на процес симбіотичної азотфіксації [15, 16]. По-третє, з огляду на безсумнівну перевагу бобово-ризобіального симбіозу в забезпеченні людства необхідним «екологічним» протеїном, протеомний аналіз набуває особливої значущості не лише для фундаментальної біологічної науки, а і для сільського господарства [17].

Метою огляду було проведення аналізу сучасних даних у галузі протеоміки бобово-ризобіального симбіозу, узагальнення результатів досліджень протеому бобових рослин, ризобій та утворених ними симбіотичних структур за їх функціонування в оптимальних

та стресових умовах, висвітлення труднощів, переваг та перспектив протеомних методів.

### **Екстракція протеїнів сої: переваги та недоліки методів**

Одержання протеїнових екстрактів – перший етап будь-якого протеомного аналізу, який, здебільшого, є вирішальним, оскільки визначає якість кінцевого результату досліджень [18, 19]. Ідеальний метод передбачає екстракцію та розчинення всього пулу протеїнів, наявних у зразку, з мінімальним включенням артефактів та непротеїнових компонентів. Проте, враховуючи величезне різноманіття поліпептидів за внутрішньоклітинною локалізацією, молекулярною масою, зарядом, гідрофобними властивостями, посттрансляційними модифікаціями, здатністю до утворення комплексів, досі не вдалося створити універсальний метод екстракції всього протеому хоча б якогось одного організму: умови проведення екстракції потрібно підбирати кожен раз залежно від матеріалу та мети протеомного дослідження [8, 9].

Рослинні тканини характеризуються відносно низьким вмістом протеїнів порівняно із тваринними та бактеріальними клітинами [20, 21]. Окрім цього, екстракція протеїну і підготовка зразків із рослинного матеріалу звичайно ускладнені наявністю в них великої кількості інтерферуючих компонентів, таких як фенольнісполуки, протеолітичні та окислювальні ензими, терпени, органічні та нуклеїнові кислоти, вуглеводи, полісахариди клітинних стінок, а також значно домінуючі в зелених тканинах хлоропластні протеїни, наприклад, такі як D-рибулозо-1,5-бісфосфаткарбоксилаза/оксигеназа [22–24]. Масштабні протеомні дослідження однієї з найважливіших сільськогосподарських культур – сої – почалися лише у 2002 році [25]. Велику кількість експериментів було присвячено підбору та оптимізації методів одержання та розчинення протеїну з різних тканин сої, що підтверджує наявність серйозних обмежень та проблем у протеомному аналізі цієї культури. Так, за порівняння протеїнових карт різних тканин рису та сої, складених після екстракції протеїнів кількома методами, виявлено значно менше протеїнових плям саме зі зразків сої, що доводить важливість підбору методів гомогенізації, очищення, розчинення та розділення поліпептидів цієї культури

[26]. Більшість методів одержання протеїнових препаратів різних тканин сої базуються на фенольній екстракції або преципітації протеїнів за допомогою трихлороцтової кислоти/ацетону. Крім того, застосовуються багато варіантів екстракційних та лізуючих буферів, що варіюють за хімічним складом та концентрацією компонентів (табл. 1).

За результатами багатьох досліджень методи одержання протеїнових екстрактів, що ба-

зуються на застосуванні фенолу, дитіотреїтолу або інших денатуруючих агентів як основних компонентів екстракційних та/чи лізуючих буферів є найефективнішими для екстракції та солюбілізації протеїнів сої. Вони дозволяють мінімізувати процеси протеолізу та оптимізувати екстракцію, результатом чого є одержання якісних препаратів протеїнів для двовимірного гель-електрофорезу [14]. В окремих випадках ефективнішим є застосування

Таблиця 1. Методи одержання протеїнових препаратів із різних тканин сої

Буфер для екстракції	Буфер для розчинення/лізису	Джерело
<i>Насіння</i>		
4% CHAPS, 5 М сечовини, 2 М тіосечовини, 65 мМ ДТТ, 0,8% амфолітів (рН 3–10)	–	[25]
50% фенолу, 0,45 М сахарози, 5 мМ ЕДТА, 0,2% β-меркапто-етанолу, 50 мМ трис-НСІ, рН 8,8	8 М сечовини, 2 М тіосечовини, 2% CHAPS, 2% тритону Х-100, 50 мМ ДТТ, 2 мМ трибутилфосфіну, 0,5% амфолітів	[19]
10% ТХО в ацетоні, 0,07% β-меркаптоетанолу	9 М сечовини, 1% CHAPS, 1% ДТТ, 1% амфолітів (рН 3–10)	[27]
<i>Корені</i>		
10% ТХО в ацетоні, 0,07% β-меркаптоетанолу, 1% ПВП	7 М сечовини, 2 М тіосечовини, 2% CHAPS, 1% ДТТ, 2% амфолітів (рН 3–10)	[28]
Фосфатно-сольовий буфер, рН 7,6 (65 мМ K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,6 мМ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 400 мМ NaCl, 3 мМ NaN <sub>3</sub> ), з наступною преципітацією 10% ТХО	9,5 М сечовини, 2% NP-40, 5% ПВП, 5% β-меркаптоетанолу, 2% амфолітів (рН 3–10)	[29]
<i>Листки</i>		
10% ТХО в ацетоні, 0,07% β-меркаптоетанолу	9 М сечовини, 1% CHAPS, 1% ДТТ, 1% амфолітів (рН 3–10)	[27]
100 мМ трис-НСІ, рН 8,8, 50 мМ ДТТ, 10 мМ ЕДТА, 1 мМ ФМСФ, інгібітори протеаз	8,5 М сечовини, 2,5 М тіосечовини, 5% CHAPS, 2% тритон Х-100, 1% амфолітів (рН 3–10), 100мМ ДТТ	[30]
<i>Бульбочки</i>		
0,3 М трис-НСІ, рН 8,8, 5 мМ ЕДТА, 4% DSNa, 5% гліцеролу, 3% β-меркаптоетанолу, 1 мМ ФМСФ	охолоджений ацетон	[31]
0,1 М натрій-фосфатний буфер рН 8,0, 0,15 М NaCl, 5 мМЕДТА, 1,5 мМ ПЕГ 6000, 10 <sup>-4</sup> мМ ФМСФ, 0,1% тритон Х-100, 0,3% β-меркаптоетанолу	насичений розчин сульфату амонію	[32]

Примітки: CHAPS – 3-[(3-холоамідопропіл)-диметиламоній]-1-пропансульфонат; ДТТ – дитіотреїтол; ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота; ТХО – трихлороцтова кислота; ПВП – полівінілпіролідон; NP-40 – нонілфеноксиполіетоксилетанол; ФМСФ – фенілметансульфонілфлуорид; DSNa – додецилсульфату натрію; ПЕГ – поліетиленгліколь.

методів на основі осадження протеїнів, наприклад, із молодих тканин, за допомогою ТХО чи ацетону. Проте такі методи відзначаються низкою недоліків, таких як утворення важкорозчинного осаду, імовірність гідролізу протеїнів, забруднення зразків нуклеїновими кислотами [33]. З огляду на це, вчені пропонують різні методики одержання протеїнових препаратів із різних тканин сої, водночас акцентуючи увагу на необхідності корекції їх кожного разу.

### **Протеомний аналіз диференційно представлених протеїнів як інструмент дослідження бобово-ризобіального симбіозу**

Виявлення та ідентифікація протеїнів, що експресуються в різних тканинах, органах, органелах та в симбіотичних утвореннях, дозволяє визначати їхню структурну та функціональну належність, встановлювати їх походження та значення. На основі даних протеомного аналізу створюються протеомні карти та атласи, що дозволяють прослідкувати динамічні зміни протеїнів у складі рослинного та мікробного організму в процесі становлення та функціонування їх симбіозу, розкривати механізми їх взаємодії, стратегії адаптації до дії стресорних факторів.

Взаємовідносини бобових рослин та бульбочкових бактерій – це складний багатоступеневий процес. Внаслідок взаємодії рослинного та бактеріального організму відбуваються глибокі фізіологічні перебудови клітин обох партнерів симбіозу [34, 35]. Інфікування коренів бобових рослин ризобіями супроводжується змінами експресії багатьох рослинних генів на рівні синтезу протеїнів та метаболічними перебудовами [36]. У першу чергу в коренях відбувається перепрограмування експресії генів, що виявляється уповільненим синтезом одних протеїнів (або взагалі їх зникненням) та посиленням утворенням або появою інших, відсутніх у неінокульованих рослин. Загалом цей процес подібний до інфікування рослини патогенами. Тому має місце синтез низки стресорних сполук, загальних для багатьох організмів [37]. По-друге, рослинними клітинами синтезуються молекули, специфічні тільки для бобово-ризобіальної взаємодії, наприклад, нодуліни, необхідні для утворення симбіотичних структур [38].

Водночас зміни у протеїновому синтезі відбуваються і в клітинах бактерій, що призводить до перетворення їх на бактероїди, які врешті-решт набувають можливості засвоювати молекулярний азот атмосфери, трансформуючи його в доступні рослині-хазяїну форми [39].

Процес симбіотичної взаємодії ризобій та бобових рослин починається з інфікування кореневих волосків бактеріями. Колективом авторів було проведено дослідження змін транскриптому кореневих волосків сої у відповідь на мутуалістичну бактеріальну інфекцію [40]. Аналіз цих змін показав експресію близько двох тисяч генів у клітинах кореневих волосків за інокуляції насіння сої штамом *Bradyrhizobium japonicum*. Було продемонстровано, що ці гени кодують синтез протеїнів різних функціональних груп і виконують важливу роль у процесах становлення симбіотичного апарату та, власне, у зв'язуванні молекулярного азоту. Автори показали, що деякі протеїни є унікальними для кореневих волосків порівняно з коренями (хітиназа, фосфоенолпіруваткарбоксілаза). Попередньо було виявлено низку відомих протеїнів, що експресуються у відповідь на бактеріальну інфекцію (пероксидаза, фенілаланінаміакліаза) та ідентифіковано декілька нових (фосфоліпаза D і фосфоглюкомутаза) [41]. Таким чином, було створено карту та повний транскриптомний атлас протеїнів кореневих волосків сої, вирощених у контрольованих умовах, що експресуються у відповідь на інокуляцію *B. japonicum*.

Дослідження рослинних мутантів, дефектних за здатністю до нодуляції, дозволили ідентифікувати низку ключових кореневих протеїнових кіназ, чутливих до ризобіальної інфекції та/або формування бульбочок. Це рецептороподібні кінази, що залучаються до розпізнавання сигнальних Nod-факторів, *GmNFR1* (*LjNFR1*, *MtLYK3*), та *GmNFR5* (*LjNFR5*, *MtNFP*). Цими генами кодуються LysM-типу серин/треонінові рецептори кіназ, в яких LysM-домен відповідає за специфічне приєднання Nod-фактора та сигнальну клітинну відповідь.

За допомогою методів специфічного фосфорилування в кореневих волосках сої було виявлено 1126 унікальних фосфопропротеїнів [42]. Серед них 240 фосфопропротеїнів залучались до відповіді рослини на інокуляцію ризобіями. Одержані



дані свідчать про унікальні особливості фосфопротеому коренів сої та наявність складної мережі кіназ та фосфатаз, які з'являються у відповідь на ризобіальну інфекцію.

У процесі формування корневих бульбочок бактеріальні клітини в інфікованих ними коренях оточуються оболонкою рослинного походження – симбіосомною мембраною. Через цю структуру здійснюється взаємодія симбіонтів. Колективом авторів було одержано препарати протеїнів симбіосомних мембран, в яких ідентифіковано 197 протеїнових компонентів, а також препарати перибактероїдної зони корневих бульбочок сої, серед яких для 15 протеїнів було визначено структуру та функціональний клас [43]. Ідентифіковані протеїни залучаються до процесів фолдингу та деградації, транспорту розчинів, обміну метаболітами. До них належать аквагліцеропорин нодулін 26, реморин, гомолог протеїну з родини GTPаз – Rab7, низка протеїнів-транспортів сірки, кальцію, іонів водню, пептидів/дикарбоксилатів тощо.

За допомогою протеомного аналізу було ідентифіковано та класифіковано за функціями цитозольні протеїни бульбочок сої [44]. Майже половина виявлених поліпептидів бере участь у вуглеводному та азотному обміні (28 та 12% відповідно). Ще одна значна група (12%) – протеїни, залучені до кисневого обміну (регулювання вмісту кисню та захист від його активних форм). Тобто ці три групи охоплюють поліпептиди, за допомогою яких реалізуються основні азотфіксуючі функції бульбочок. Окрім цих протеїнів ще одну численну групу (11%) становили протеїни везикулярного транспорту. Значний вміст саме цих протеїнів у цитозолі підтверджує активний обмін великими макромолекулами порівняно з меншими вуглеводними та азотними метаболітами.

У рослин лядвенцю *L. japonicus* за допомогою біохімічних та генетичних методів було ідентифіковано гени, залучені до процесів утворення та функціонування корневих бульбочок. Застосувавши в своїх дослідженнях протеомний підхід, колектив авторів докладніше проаналізував ці процеси [45]. Порівнявши протеїнові профілі бульбочок до фіксації в них молекулярного азоту (так званих «білих») і бульбочок, в яких активно відбувається процес азотфіксації («червоні») та коренів, вони ідентифікували близько 780 протеїнів бульбочок

і 790 – коренів. За порівняння 1327 генів бульбочок, коренів, бобів та насіння було виявлено близько 7% спільних генів, більше ніж 56% – ідентифіковано лише в одній тканині. Цікавим також було і те, що посттрансляційні модифікації характерні більшою мірою протеїнам бульбочкових екстрактів порівняно з корневими. Разом із тим «білі» бульбочки характеризувалися значно вищими рівнями протеїнів теплового шоку (ПТШ), протеїнів, пов'язаних із патогенезом (pathogen-related proteins – PR-proteins), протеїнів, залучених до окисно-відновних процесів, що є підтвердженням підвищеного рівня стресу на цій стадії розвитку бульбочок. Водночас у «червоних» бульбочках виявлялись у значній кількості леггемоглобін, сахаросинтаза, аспарагінова та глютамінова синтетази. Окрім цього, бульбочки на різних фазах розвитку різнилися вмістом деяких нітрилаз, ензимів метаболізму аскорбату та ін.

Симбіотична взаємодія рослин буркуну білого (*Melilotus alba*) із штамом *Sinorhizobium meliloti* 1021 призводила до змін протеїнових профілів обох симбіонтів [46]. За допомогою N-кінцевого амінокислотного сиквенсу та MALDI-TOF мас-спектрометрії було складено протеомні карти коренів буркуну, клітин ризобій, вирощених у чистій культурі, бульбочок та бактероїдів. Порівняно зі зразками коренів у бульбочках спостерігалася індукція або посилення синтезу понад 250 протеїнів; бактероїди характеризувались зниженням експресії більше ніж 350 порівняно з культуральною формою ризобій. Близько 100 виявлених протеїнів було ідентифіковано за допомогою баз даних. Серед них були бульбочкові протеїни – леггемоглобін та NifH, – залучені до метаболізму вуглецю та азоту у *S. meliloti*. У бактероїдах знижувалась кількість глютамінсинтетази, уреази, ізоформи РІІ. Також відзначалось зменшення рівня кількох ензимів, що беруть участь у синтезі полігідроксибутирату, та протеїнів, залучених до клітинного поділу.

З огляду на беззаперечні переваги протеоміки, такі як виявлення посттрансляційних модифікацій і, як наслідок, можливість не просто передбачити можливі шляхи перебігу фізіологічних процесів, а ідентифікувати реальних учасників клітинного метаболізму, ця галузь досліджень дуже швидко розвивається. Відбувається накопичення ве-

личезного масиву даних протеїнових профілів різних тканин, органів, симбіотичних утворень, внутрішньоклітинних органел, які депонуються в спеціальних базах, наприклад ProteomeXchange. Безумовно результати цих досліджень є надзвичайно важливим ресурсом для вивчення процесів формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу.

### Протеом бобово-ризобіального симбіозу за дії біотичних та абіотичних факторів

У природі рослини зазнають різноманітних стресорних впливів. Процес симбіотичної фіксації азоту є особливо чутливим до змін умов довкілля, зокрема таких як дефіцит вологи, недостатнє освітлення, низькі та високі температури, засолення, перенасичення земель мінеральними добривами тощо [1, 5, 6]. Незалежно від того, який вплив має той чи інший чинник, позитивний чи негативний, його дія в будь-якому разі призводить до змін у процесах життєдіяльності рослини [47], зокрема до диференційної експресії генів тих чи інших протеїнових молекул (табл. 2) [48]. У зв'язку зі зростаючим погіршенням екологічної ситуації на планеті, зменшенням кількості придатних для сільського господарства земель, зниженням об'ємів доступної води вчені-біологи все більше уваги приділяють вивченню можливостей рослин реагувати на дію зовнішніх несприятливих чинників. Розуміння механізмів резистентності та толерантності культурних рослин може забезпечити розробку стратегій підвищення їх стійкості, а відтак і збільшення їх продуктивності.

Як відомо, посуха – один з абіотичних чинників довкілля, що найбільше впливає на сільськогосподарське виробництво і може призводити до втрат значної частини врожаю культурних рослин та зниження його якості [49–51]. Симбіотична фіксація азоту – фізіологічний процес бобових рослин, який одним із перших піддається адаптивним змінам у бульбочках під час посухи [52–54]. Недостатнє зволоження ґрунту призводить до зменшення кількості сумарного протеїну в корневих бульбочках бобових рослин на фоні загального зниження маси надземної частини та коренів рослини. Так, десятиденний дефіцит ґрунтової вологи спричинював зниження кількості сумарного протеїну в бульбочках квасолі і за 30% найменшої

вологоємності вміст протеїнів рослини-хазяїна в корневих бульбочках зменшувався на 50% порівняно з контролем [55]. У бульбочках бобів (*Vicia faba* L. var *minor* cv *Soravi*) в умовах недостатнього зволоження протягом восьми днів кількість сумарного розчинного протеїну знижувалась з 15 до 2,5 мг/г сухої речовини [56]. Таке істотне зменшення кількості розчинних поліпептидів у бульбочках бобів за умов водного дефіциту порівнюється із природними процесами старіння рослини в цілому і бульбочок, зокрема, та з наслідками, спричиненими надлишковим вмістом нітратів у ґрунті. В обох випадках значне зниження кількості сумарного протеїну в бульбочках бобів спричинялося посиленням ензиматичної активності протеаз і відповідно інтенсифікацією протеолітичних ензимів, що, можливо, має місце і в умовах водного дефіциту [57]. Водночас у бульбочках сої вміст сумарного протеїну дещо зростає протягом 2–4 днів посухи (26,6 мг/г сухої речовини) порівняно з контролем (23,5 мг/г сухої речовини).

Дослідження якісного складу протеїнових профілів листків люцерни посівної (*Medicago sativa* L., *Magali* variety), вирощеної в умовах посухи, були проведені за допомогою двовимірного електрофорезу з подальшою мас-спектрометриєю [58]. При цьому ідентифіковано 28 протеїнів, які по-різному експресувалися за оптимальних умов для росту рослин та за водного дефіциту. Виділено чотири протеїни, утворення яких індукувалось флавоноїдним еліситором під час симбіотичної взаємодії *Medicago truncatula* та *Rhizobium leguminosarum*. Ними виявились протеїни нітрогеназного комплексу NodB, NodE та інші низькомолекулярні поліпептиди, що не мають гомології з відомими протеїнами [59]. Групою вчених на чолі із Chen було ідентифіковано 59 поліпептидів, синтез яких посилювався чи зменшувався за дії посухи на *Sinorhizobium meliloti*, та визначено їх функціональні класи: вони залучаються до процесів основного метаболізму, клітинного росту, оксидативного стресу, синтезу протеїнів [33, 60]. Окрім цього, в азотфіксуючих бульбочках було проаналізовано зміни в біосинтезі протеїнів, задіяних у сигнальних процесах [61] та ідентифіковано два кальмодулінподібних протеїни (CaML2 та 6b). Третій CaML4 протеїн детектовано у *M. truncatula* [62]. Біосинтез деяких інших протеїнів, пов'язаних із фіксацією молекулярного азоту, переважно протеїнів

Таблиця 2. Протеїни органів сої та її симбіотичних структур, біосинтез яких змінюється у відповідь на дію стресорних факторів

Стресорний фактор	Протеїни	Джерело
Посуха	Нуклеотиддифосфаткіназа, попередник глутеліну типу 1, попередник 19 кДа глобуліну, ПТШ 70, актин, кінезин, дегідрин, фосфоенолпіруваткарбоксілаза, глутамінсинтетаза, енолаза, шаперонін GroEL1, протеїни нітрогеназного комплексу (NifH нітрогеназний Fe-протеїн, $\alpha$ - та $\beta$ -ланцюги NifD нітрогеназного Fe-Mo-протеїну, FixU-азотфіксуючий протеїн), ін.	[48, 62]
Засолення	Цитохром P450 71D9, $\beta$ -субодиниця АТР-синтетази, інозитол-3-фосфат, оксистеролзв'язуючий протеїн, кінезин, інгібітор трипсину, алкогольдегідрогеназа, аннексин, ізофлавонова редуктаза, хінонова оксидоредуктаза, гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа, кальретикулін, осмотин, ін.	[14, 66]
Температура	ПТШ H, ПТШ D, ПТШ B, ПТШ 83, ПТШ 17, ПТШ 16.9B, ПТШ 17.9B, шапероніни GroEs1 та GroEs2	[48, 73]
Важкі метали	Цитохром P450, розчинний рибосомний протеїн, цитокінінооксидаза, АВС-транспортерподібний протеїн, протеїни родини АТРаз, ізоформи антиоксидантних протеїнів GSTs, ПТШ, ГТФ-зв'язувальний протеїн, ін.	[14, 28, 66]
Нітратне забруднення	Глутамінсинтетаза, глутаматамонійліаза, $\alpha$ -глутамілцистеїнсинтетаза, аспартатамінотрансфераза, глутаматдекарбоксілаза 1, глутаматдегідрогеназа, карбамоїлфосфатсинтетаза, феридоксиннітратредуктаза, нітрилаза, УТФ-амонійліаза, глутаміл-тРНК-синтетаза/ліаза, аспартил-тРНК-синтетаза, ін.	[48]
Мікробне ураження	Аскорбатпероксидаза, шаперонін 60 кДа, шаперонін GroEL C, фактор елонгації TU, леггемоглобін I, протеїн нітрогеназного комплексу NifH, редуктаза нітрогенази, LIR 18B-протеїн, фосфоліпаза D, фосфоглюкомутаза, ін.	[14, 41]

Примітки: ПТШ – протеїни теплового шоку.

нітрогеназного комплексу, таких як nifD, nifH і nifK, а також регуляторних протеїнів PII (GlnB), PIIA (PtsN), зазнавав змін за дії посухи на симбіотичні утворення [48].

Нещодавно на рослинах сої було показано локальне інгібування дефіцитом ґрунтової вологи симбіотичної азотфіксації та метаболічних процесів у бульбочках [50]. Вчені вирощували рослини в спеціальних ємкостях, розділяючи кореневу систему з утвореними на ній бульбочками на дві частини, одна з яких одержувала повне водозабезпечення, а інша – зазнавала впливу посухи. При цьому азотфіксуюча активність симбіотичних структур за дії стресора знижувалась удвічі, а за нормального поливу – відповідала контрольним значенням. Водночас, незалежно від рівня транспірації, в коренях за посушливих

умов відбувалось накопичення амінокислот та уреїдів, що було пов'язано не з інтенсифікацією біосинтезу останніх, а з біодеградаційними процесами. Нарешті, протеомним аналізом було підтверджено, що в корневих бульбочках сої, яка зазнала впливу посухи, процеси метаболізму вуглецю, протеїнового синтезу, клітинного росту та амінокислотного метаболізму зазнають найбільших змін за нестачі вологи в ґрунті.

Засолення є основним з екологічних стресорних факторів, що негативно впливає на рослини, знижуючи їх продуктивність [63]. Особливо гострою ця проблема є в посушливих та напівпосушливих регіонах, де сумарне випаровування набагато перевищує кількість опадів [64]. Збільшення концентрації солей у ризосфері спричинює порушення гомеостазу клітин, ба-

лансу іонів, денатурації структурних протеїнів. Унаслідок цього запускаються сигнальні шляхи, кінцевим етапом яких є синтез осмотично активних метаболітів, специфічних протеїнів (наприклад, шаперонів), біомолекул, що контролюють надходження іонів та води. Сольовий стрес має негативний вплив на бобові рослини та ризобії, а відтак і на процеси симбіотичної фіксації молекулярного азоту [65]. Він спричиняє зниження інтенсивності формування бульбочок та синтезу леггемоглобіну. Протеомні дослідження були здійснені для різних бобово-ризобіальних систем. У *R. etli* і *S. meliloti* ідентифіковано протеїни, синтез яких посилюється в умовах підвищеної солоності ґрунту. Виявлено протеїн із молекулярною масою 65 кДа. Ці протеїни було розділено на дві функціональні групи. Частина з них виявилась рецепторами для осмотичних розчинів, продукованих бактеріальними клітинами. А інші – залучались до синтезу спермідину шляхом декарбоксілювання орнітину та аргініну. Було показано підвищений синтез осмотинподібного протеїну, ПТШ, кальретикуліну. Група із шести протеїнів, синтез яких пригнічувався засоленням, належать до протеїнів-транспортів [48].

Aghaei K. зі співавторами [66] ідентифікували 47 протеїнів коренів та гіпокотилів сої, синтез яких змінюється за дії сольового стресу. Двадцять три протеїни ідентифікували за допомогою N-кінцевого секвенування. Було висунуто припущення, що ці протеїни можуть відігравати важливу роль в солестійкості сої. Сольовий стрес призводив до порушення ростових процесів та синтезу протеїнів у листках, гіпокотиліях та коренях 7-денних рослин сої [67]. Відбувалось зниження рівня гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази як на рівні протеїну, так і мРНК, що могло спричинити зменшення утворення АТФ і, як наслідок, пригнічення росту рослин. На підставі цих та попередніх даних автори припускають можливе використання гена цього протеїну, як мішені для підвищення толерантності сої до засолення.

У сої досліджені деякі солейндуцибельні гени. Так, у відповідь на дію засолення та у разі старіння сім'ядолей виявлений гомолог оксистеролзв'язуючого протеїну [68]. В коренях у міжклітинному просторі ідентифікувалась кисла форма протеїну PR-5 (PR-protein 5-ї групи) [69]. Виявлена кисла фосфатаза залучалась у про-

цеси адаптації сої до підвищених концентрацій солей, беручи участь в утворенні активних форм кисню або залучаючись до сигнальних шляхів [70]. Надекспресія гена *GmDREB2*, спричинена засоленням, корелювала з підвищенням рівня вільного проліну. Цей ген також є важливим активатором транскрипції і корисним для підвищення стійкості рослин до сольового стресу [71].

Бобово-ризобіальний симбіоз є досить чутливим до температурних стресів. Оптимальним для формування та ефективного функціонування азотфіксуючих структур є діапазон температур від 15 до 30 °C [72]. Показано, що в квасолі утворення бульбочок та зв'язування молекулярного азоту в них відбувається і при 32 °C, проте вже за температури 28 °C інтенсивність цих процесів значно знижується [73]. Температура нижче 10 °C спричинює появу ознак холодного стресу [74]. При цьому температурний режим може мати як прямий вплив на процеси симбіотичної азотфіксації, що полягає в інгібуванні бульбочкоутворення та прискоренні їх старіння, так і опосередкований: через пригнічення розвитку корневих волосків, редукцію нодуляційних сайтів, зміну сприйнятливості бактерій до корневих волосків [75]. У відповідь на дію несприятливих температур у бобових рослин, ризобій та утворених між ними симбіотичних структурах відбувається синтез стресових протеїнів, значну частку серед яких займають протеїни теплового шоку – ПТШ 90, ПТШ 70, шапероніни, низькомолекулярні ПТШ, убіквітин. ПТШ відіграють велику роль у підтримці клітинного гомеостазу як за оптимальних умов, так і за дії різних стресорних факторів. Вони забезпечують фолдинг, транслокацію, деградацію протеїнів, запобігають їх агрегації [76]. За дії низьких та високих температур відмічено надекспресію або пригнічення синтезу деяких протеїнів у *V. japonicum*, частина з яких була ідентифікована як ПТШ. Ці протеїни було розділено на групи: низькомолекулярні ПТШ, гомологи низькомолекулярних ПТШ, GroEL/DnaK-протеїни [77]. Також було виявлено протеїн YufN із родини ABC-транспортів, який бере участь у надходженні поживних речовин у клітини мікросимбіонта або експорті токсичних продуктів життєдіяльності [48]. Окрім цього виявлено низку протеїнів, функції яких не до кінця зрозумілі.

Swigonska S. зі співавторами показала зміни синтезу великої кількості протеїнів коренів



сої за довготривалої дії на рослини холодного стресу. Більшість із них пов'язані з метаболізмом амінокислот, нуклеотидів, сірки, азоту. Так, було показано збільшення рівнів метіонін-синтетази, АТР-сульфурилази, ембріоспецифічної уреазы, ін. [78].

У відповідь на дію важких металів рослини можуть вмикати різні механізми захисту, такі як іммобілізація, виведення, хелатування, компартменталізація іонів металів [66, 79]. Окрім цього, запускаються загальні процеси відповіді на тиск стресорного фактора: синтез етилену, стресових протеїнів тощо.

Серед важких металів, що мають найбільшу шкодочинну дію та вміст яких у навколишньому середовищі неухильно зростає, знаходиться кадмій. Показано, що надлишок цього металу в ґрунті активує синтез протеїнів антиоксидантної відповіді в сої [80], посилюючи утворення протеїну, ідентифікованого як супероксиддисмутаза [Cu-Zn] та семи протеїнів, що відповідають глутатіон-S-трансферазам. Підвищення активності супероксиддисмутази [Cu-Zn] підтверджує стимуляцію кадмієм накопичення в клітинах активних форм кисню. Крім цього ідентифіковано протеїни, що асоційовані зі шляхами хелатування кадмію [81], шаперони та ПТШ [82].

У відповідь на токсичний вплив алюмінію на бобово-ризобіальний симбіоз Zhen Y. зі співавторами ідентифікували низку ПТШ, які здійснюють захист клітин коренів шляхом рефолдингу протеїнів, структуру яких було порушено через дію алюмінію, до їх нативної конформації, перешкоджаючи деградації та денатурації. Водночас збільшувався рівень цистеїн-синтетази (ключового ензиму біосинтезу цистеїну), що підтверджує її безпосередню участь в адаптації сої до стресу, спричиненого цим металом [28]. Окрім цього синтез деяких протеїнів, залучених до процесів зв'язування молекулярного азоту, зокрема протеїнів нітрогеназного комплексу *nifD*, *nifK*, *nifH*, регуляторних протеїнів II (*GlnB*) та РІА (*PtsN*), змінювався за наявності в ґрунті надлишкових доз важких металів [48].

Таким чином, будь-які коливання умов навколишнього середовища впливають на процеси формування та функціонування симбіозу між бобовими рослинами та ризобіями. У відповідь на дію різноманітних стресорних факторів у клітинах обох симбіопартнерів запускається каскад специфічних та неспецифічних реакцій

протеому, які, очевидно, сприяють відновленню нормального ходу метаболічних процесів та забезпечують регуляцію взаємодії рослин із ризобіями за стресових умов. Велика кількість публікацій свідчить про активне застосування протеомних технологій для вивчення реакції рослин на дію різних стресорів [83], а комплексне узагальнення інформації про структурно-функціональні зміни на рівні геному, транскриптому, протеому та метаболому дає змогу визначати фізіолого-біохімічні стратегії адаптації рослин до стресів та модифікувати їх [84].

### Перспективи протеоміки азотфіксуєючих систем

Розвиток сучасної біології рослин характеризується зростанням використання результатів протеомних досліджень симбіотичних систем, спрямованих на розв'язання нових завдань, зумовлених прогнозованим погіршенням умов навколишнього середовища, таких як зростання забруднення, глобальне потепління, дисбаланс поживних речовин тощо. Протеоміка дає можливість розширювати знання про «симбіотичні» протеїни, залучені до метаболізму азоту, вуглецю, інших процесів [46]. Одержання даних сиквенсу протеїнів, що відіграють ключову роль у реакції симбіотичних систем на дію абіотичних стресорів, може бути спрямоване на розуміння функцій ідентифікованих протеїнів або генів, що їх кодують [85]. За допомогою ідентифікації низки специфічних бульбочкових протеїнів можна виявляти фізіологічні маркери тканиноспецифічної експресії протеїну. Накопичення бази тканино-специфічних протеїнових профілів, одержаних за допомогою електрофорезу чи двовимірного гель-електрофорезу, дозволяє створювати протеїнові карти, за допомогою яких можна проводити порівняльний аналіз бобово-ризобіальних структур, утворених на основі симбіонтів дикого типу, мутантних форм, за дії на них біотичних та абіотичних факторів. Це, в свою чергу, дає можливість дізнаватися як, де, коли і на якому рівні будуть транслюватися молекули-месенджери і де буде акумулюватися відповідний протеїн; вивчати посттрансляційні модифікації (наприклад, відрізання сигнального пептиду, фосфорилювання, глікозилювання і т.д.) [48]. Зрозуміло, що основна мета протеомних

досліджень полягає у відкритті нових протеїнів, каталогізації невідомих раніше клітинних і субклітинних протеїнових компонентів [86]. Разом із тим протеоміка забезпечує зв'язок між транскриптомом та метаболомом, результати дослідження яких відкривають насамперед перспективи покращення якості та кількості врожаю у разі найефективніших технологій ведення сільського господарства.

Отже, важливість протеоміки в дослідженні процесів формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу в постгеномну еру зростає з кожним днем. Протеоміка є потужним інструментом, за допомогою якого здійснюється ідентифікація та класифікація протеїнів, що синтезуються як рослинними та мікробними організмами, так і за їх симбіотичної взаємодії в оптимальних умовах навколишнього середовища та за дії різноманітних стресорних факторів. Поєднання протеомних технологій з методами молекулярної біології, генетики, фізіології та патології рослин дозволяє розширити знання про функції протеїнів бобових культур та ризобій. Безумовно, різним напрямкам протеоміки рослин, наприклад субклітинній, функціональній протеоміці, надається і буде надаватися все більше значення. Водночас моніторинг змін експресії протеїнів може бути ускладнений багатьма практичними аспектами, починаючи від великих матеріальних потреб і закінчуючи технічними проблемами, пов'язаними з особливостями рослинних тканин. Разом із тим протеоміка відкриває перед ученими великі перспективи, нівелюючи труднощі, що виникають під час досліджень. Результати протеомних досліджень дозволяють детальніше і глибше зрозуміти механізми взаємодії між рослиною-хазяїном та мікросимбіонтом; дозволяють відстежувати динамічні зміни протеїнового складу після посттрансляційних модифікацій, фосфорилування, глікозилювання; служать підґрунтям для розробки нових стратегій підвищення стійкості рослин та бактерій до абіотичних стресів, патогенів, хвороб; різноманітні виявлені маркерні гени та протеїни можуть використовуватися за конструювання трансгенних рослин та мікроорганізмів. Ідентифікація симбіосомних протеїнів та генів, що їх кодують, безумовно, може дозволити проведення маніпуляцій для підвищення толерантності симбіотичних струк-

тур до несприятливих чинників за оптимальних та стресових умов.

### **ПРОТЕОМИКА БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБІОЗА: ДОСТИЖЕННЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ**

*Ю. Ю. Кондратюк, П. Н. Маменко,  
С. Я. Коць*

Институт физиологии растений  
и генетики НАН Украины, Киев;  
e-mail: kondratyuk\_yulya@ukr.net

Обзор посвящен обобщению результатов протеомных исследований бобово-ризобияльного симбиоза. Обсуждаются технические сложности, связанные с методами получения протеиновых экстрактов симбиотических структур, и пути их преодоления. Освещены основные изменения процессов биосинтеза протеина при формировании и функционировании симбиотических образований. Особое внимание уделено значению протеомных исследований растительно-микробных образований в формировании ими адаптационных стратегий при неблагоприятных условиях окружающей среды. Представлены технические и концептуальные перспективы протеомики бобово-ризобияльного симбиоза.

**Ключевые слова:** протеоміка, протеїни, ризобії, симбіотическа азотфіксація, бобово-ризобіальний симбіоз, методи екстракції протеїнів, стресорні фактори.

### **LEGUME-RHIZOBIUM SYMBIOSIS PROTEOMICS: ACHIEVEMENTS AND PERSPECTIVES**

*Iu. Iu. Kondratiuk, P. M. Mamenko,  
S. Ya. Kots*

Institute of Plant Physiology and Genetics, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: kondratyuk\_yulya@ukr.net

The present review contains results of proteomic researches of legume-rhizobium symbiosis. The technical difficulties associated with the methods of obtaining protein extracts from symbiotic structures and ways of overcoming them were discussed. The changes of protein synthesis under formation and functioning of symbiotic structures were shown. Special attention has been given to the importance of proteomic studies of plant-microbe structures in

the formation of adaptation strategies under adverse environmental conditions. The technical and conceptual perspectives of legume-rhizobium symbiosis proteomics were shown.

**Key words:** proteomics, proteins, rhizobium, symbiotic nitrogen fixation, legume-rhizobium symbiosis, protein extraction methods, stress factors.

### References

1. Udvardi M., Poole P. S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2013;64(1):781-805.
2. Herridge D. F., Peoples M. B., Boddey R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil.* 2008;311(1-2):1-18.
3. Graham P. H., Vance C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crop. Res.* 2000;65(2-3):93-106.
4. Cooper R. L. A delayed flowering barrier to higher soybean yields. *Field Crop. Res.* 2003;82(1):27-35.
5. Petrychenko V. F., Kots S. Ya. Symbiotic systems in modern agricultural manufacture. *Bull. NAS Ukraine.* 2014;(3):57-66. (in Ukrainian).
6. Kots S. Ya., Morgun V. V., Tyhonovych I. A., Provorov N. A., Patyka V. F., Petrychenko V. F., Melnykova N. M., Mamenko P. M. Biological nitrogen fixation: legume-rhizobial symbiosis. Kyiv: Logos, 2011;1:404 p. (in Ukrainian).
7. Komatsu S., Toorchi M., Yukawa K. Soybean proteomics. *Curr. Proteomics.* 2007;4(3):182-186.
8. van Wijk K. J. Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiol.* 2001. 126(2):501-508.
9. Rose J. K. C., Bashir S., Giovannoni J. J., Jahn M. M., Saravanan R. S. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J.* 2004;39(5):715-733.
10. Salekden G. H., Komatsu S. Crop proteomics: aim at sustainable agriculture of tomorrow. *Proteomics.* 2007;7(16):2976-2996.
11. International Rice Genome Sequencing Project. The map-based sequence of the rice genome. *Nature.* 2005;436(7052):793-800.
12. Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* 2000;408(6814):796-815.
13. Young N. D., Cannon S. B., Sato S., Kim D., Cook D. R., Town C. D., Roe B. A., Tabata S. Sequencing the Genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicas*. *Plant Physiol.* 2005;137(4):1174-1181.
14. Komatsu S., Ahsan N. Soybean proteomics and its application to functional analysis. *J. Proteomics.* 2009;72(3):325-336.
15. Jain S. M., Brar D. S. Molecular techniques in crop improvement. Netherlands: Springer-Science+Business Media B.V., 2009. 772 p.
16. Kots S. Ya., Morgun V. V., Patyka V. F., Malichenko S. M., Mamenko P. M., Kiriziy D. A., Mykhalkiv L. M., Beregovenko S. K., Melnykova N. M. Biological nitrogen fixation: legume-rhizobial symbiosis. Kyiv: Logos, 2010;2:523 p. (in Ukrainian).
17. Rolfe B. G., Mathesius U., Djordjevic M., Weinman J., Hocart C., Weiler G., Bauer W. D. Proteomic analysis of legume-microbe interactions. *Comp. Funct. Genomics.* 2003;4(2):225-228.
18. Cho W. Proteomics technologies and challenges. *Genomics, Proteomics Bioinformatics.* 2007;5(2):77-85.
19. Mooney B. P., Krishnan H. B., Thelen J. J. High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification. *Phytochemistry.* 2004;65(12):1733-1744.
20. Isaacson T., Damasceno C. M. B., Saravanan R. S., He Y., Catala C., Saladie M., Rose J. K. C. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nat. Protoc.* 2006;1(2):769-774.
21. Thiellement H. Plant proteomics: Methods and protocols. Humana Press, 2007. 416 p.
22. Espagne C., Martinez A., Valot B., Meinel T., Giglione C. Alternative and effective proteomic analysis in *Arabidopsis*. *Proteomics.* 2007;7(20):3788-3799.
23. Granier F. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* 1988;9(11):712-718.
24. Mesquita R. O., Soares E. A., Barros E. G., Loureiro M. E. Method optimization for proteomic analysis of soybean leaf: improvements in identification of new and low-abundance proteins. *Genet. Mol. Biol.* 2012 Jun;35(1 (suppl)):353-361.



25. Herman E. M., Helm R. M., Jung R., Kinney A. J. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol.* 2003;132(1):36-43.
26. Toorchi M., Nouri M.Z., Tsumura M., Komatsu S. Acoustic technology for high-performance disruption and extraction of plant proteins. *J. Proteome Res.* 2008;7(7):3035-41.
27. Natarajan S., Xu C., Bae H., Caperna T. J., Garrett W. M. Characterization of storage proteins in wild (*Glycine soja*) and cultivated (*Glycine max*) soybean seeds using proteomic analysis. *J. Agr. Food Chem.* 2006;54(8):3114-20.
28. Zhen Y., Qi J. L., Wang S. S., Su J., Xu H. G., Zhang M. S. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. *Physiol. Plant.* 2007;131(4):542-54.
29. Sobhanian H., Razavizadeh R., Nanjo Y., Ehsanpour A. A., Jazii F. R., Motamed N., Komatsu S. Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. *Proteome Sci.* 2010;8(19):1-15.
30. Sarma A. D., Oehrle N. W., Emerch D. W. Plant protein isolation and stabilization for enhanced resolution of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 2008;379(2):192-5.
31. Mamenko P. M., Kots S. Ya., Drozdenko G. M., Zhemojda A. V. The protein content of soybean nodules, inoculated by strains and Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with different efficiency. *Physiol. Biochem. Cultivated Plants.* 2008;40(6):525-531. (in Ukrainian).
32. Toldra F., Nollet L. M. L. Proteomics in foods. Principles and applications. Germany: Springer, 2013. 589 p.
33. Chen S., Harmon A. C. Advances in plant proteomics. *Proteomics.* 2005;6(20):5504-16.
34. Kawaguchi M., Minamisawa K. Plant-microbe communications for symbiosis. *Plant Cell Physiol.* 2010;51(9):1377-1380.
35. Ferguson B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., Gresshoff P.M. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant Biol.* 2010;52(1):61-76.
36. Reid D. E., Hayashi S., Lorenc M., Stiller J., Edwards D., Gresshoff P. M., Ferguson B. J. Identification of systemic responses in soybean nodulation by xylem sap feeding and complete transcriptome sequencing reveal a novel component of the autoregulation pathway. *Plant Biotechnol. J.* 2012;10(6):680-689.
37. Deakin W. J., Broughton W. J. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009;7(4):312-320.
38. Oldroyd G. E., Downie J. A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008;59(1):519-546.
39. Spaink H. P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000;54(1):257-288.
40. Libault M., Farmer A., Brechenmacher L., Drnevich J., Langley R. J., Bilgin D. D., Radwan O., Neece D. J., Clough S. J., May G. D., Stacey G. Complete transcriptome of the soybean root hair cell, a single-cell model, and its alteration in response to *Bradyrhizobium japonicum* infection. *Plant Physiol.* 2010;152(2):541-552.
41. Wan J., Torres M., Ganapathy A., Thelen J., DaGue B. B., Mooney B., Xu D., Stacey G. Proteomic analysis of soybean root hairs after infection by *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2005;18(5):458-467.
42. Nguyen T. H. N., Brechenmacher L., Aldrich J. T., Clauss T. R., Gritsenko M. A., Hixson K. K., Libault M., Tanaka K., Yang F., Yao Q., Pasa-Tolic L., Xu D., Nguyen H. T., Stacey G. Quantitative Phosphoproteomic Analysis of Soybean Root Hairs Inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Cell. Proteomics.* 2012;11(11):1140-1155.
43. Clarke V. C., Loughlin P. C., Gavrin A., Chen C., Brear E. M., Day D. A., Smith P. M. C. Proteomic analysis of the soybean symbiosome identifies new symbiotic proteins. *Mol. Cell. Proteomics.* 2015;14(5):1301-22.
44. Oehrle N. W., Sarma A. D., Waters J. K., Emerich D. W. Proteomic analysis of soybean nodule cytosol. *Phytochem.* 2008;69(13):2426-2438.
45. Dam S., Dyrland T. F., Ussatjuk A., Jochimsen B., Nielsen K., Goffard N., Ventosa M., Lorentzen A., Gupta V., Andersen S. U., Enghild J. J., Ronson C. W., Roepstorff P., Stougaard J. Proteome reference maps of the *Lotus japonicus* nodule and root. *Proteomics.* 2014;14(2-3):230-240.
46. Natera S. H. A., Guerreiro N., Djordjevic N. A. Proteome analysis of differentially displayed



- proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interac.* 2000;13(9):995-1009.
47. Han S.-K., Wagner D. Role of chromatin in water stress responses in plant. *J. Exp. Botany.* 2014;65(10):2785-2799.
48. Muneer S., Ahmad J., Bashir H., Qureshi M. I. Proteomics of nitrogen fixing nodules under various environmental stresses. *Plant Omics J.* 2012;5(2):167-176.
49. Zahran H. H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999;63(4):968-989.
50. Chaves M. M., Flexas J., Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 2009;103(4):551-560.
51. Gil-Quintana E., Larrainzar E., Seminario A., Díaz-Leal J. L., Alamillo J. M., Pineda M., Arrese-Igor C., Wienkoop S., González E.M. Local inhibition of nitrogen fixation and nodule metabolism in drought-stressed soybean. *J. Exp. Bot.* 2013;64(8). – P. 2171-2182.
52. Coletto I., Pineda M., Rodino A. P., De Ron A. M., Alamillo J. M. Comparison of inhibition of N<sub>2</sub> fixation and ureide accumulation under water deficit in four common bean genotypes of contrasting drought tolerance. *Ann. Bot.* 2014;113(6):1071-1082.
53. Durand J. L., Sheehy J. E., Minchin F. R. Nitrogenase activity, photosynthesis and nodule water potential in soybean plants experiencing water deprivation. *J. Exp. Botany.* 1987;38(2):311-321.
54. Sinclair T. R., Serraj R. Legume nitrogen fixation and drought. *Nature.* 1995;378(6555):334.
55. Valentine A. J., Benedito V. A., Kang Y. Legume nitrogen fixation and soil abiotic stress: from physiology to genomics and beyond. *Annu. Plant Rev.* 2011;42:207-248.
56. Ramos M. L. G., Gordon A. J., Minchin F. R., Sprent J. I., Parsons R. Effect of water stress on nodule physiology and biochemistry of a drought tolerant cultivar of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ann. Bot.* 1999;83(1):57-63.
57. Guerin V., Trinchant J.-C., Rigaud J. Nitrogen fixation (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction) by broad bean (*Vicia faba* L.) nodules and bacteroids under water-restricted conditions. *Plant Physiol.* 1990;92(3):595-601.
58. Aranjuelo I., Molero G., Erice G., Avice J. C., Nogues S. Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 2011;62(1):111-123.
59. Bestel-Corre G., Dumas-Gaudot E., Poinot V., Dieu M., Dierick J. F., van T. D., Remacle J., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis.* 2002;23(1):122-137.
60. Chen H., Higgins J., Oresnik I. J., Hynes M. F., Natera S., Djordjevic M. A., Weinman J. J., Rolfe B. G. Proteome analysis demonstrates complex replicon and luteolin interactions in pSymA-cured derivatives of *Sinorhizobium meliloti* strain 2011. *Electrophoresis.* 2000;21(17):3833-42.
61. Fester T., Kiess M., Strack D. A mycorrhiza-responsive protein in wheat roots. *Mycorrhiza.* 2002;12(4):219-22.
62. Larrainzar E., Wienkoop S., Weckwerth W., Ladrera R., Arrese-Igor C., Gonzalez E. M. *Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress. *Plant Physiol.* 2007;144(3):1495-1507.
63. Aghaei K., Komatsu S. Crop and medicinal plants proteomics in response to salt stress. *Fron. Plant Sci.* 2014; 4(8):1-9.
64. Sobhaniana H., Aghaei K., Komatsu S. Changes in the plant proteome resulting from salt stress: Toward the creation of salt-tolerant crops? *J. Proteomics.* 2011;74(8):1323-1337.
65. Elsheikh E. A. E., Wood M. Nodulation and N<sub>2</sub> fixation by soybean inoculated with salt-tolerant rhizobia or salt-sensitive *Bradyrhizobium* in saline soil. *Soil Biol. Biochem.* 1995;27(4-5):657-661.
66. Aghaei K., Ehsanpour A.A., Shah A.H., Komatsu S. Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. *Amino Acids.* 2009;36(1):91-98.
67. Sobhanian H., Razavizade R., Nanjo Y., Ehsanpour A. A., Jazii F. R., Motamed N., Komatsu S. Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. *Proteome Sci.* 2010;8(19):1-15.
68. Li D. Y., Inoue H., Takahashi M., Kojima T., Shiraiwa M., Takahara H. Molecular charac-

- terization of a novel salt-inducible gene for an OSBP (oxysterolbinding protein)-homologue from soybean. *Gene*. 2008;407(1-2):12-20.
69. Onishi M., Tachi H., Kojima T., Shiraiwa M., Takahara H. Molecular cloning and characterization of a novel salt-inducible gene encoding an acidic isoform of PR-5 protein in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Plant Physiol. Biochem.* 2006;44(10):574-580
  70. Liao H., Wong F. L., Phang T. H., Cheung M. Y., Li W. Y. F., Shao G., Yan X., Lam H. M. GmPAP3, a novel purple acid phosphatase-like gene in soybean induced by NaCl stress but not phosphorus deficiency. *Gene*. 2003;318(30):103-111.
  71. Chen M., Wang Q. Y., Cheng X. G., Xu Z. S., Li L. C., Ye X. G., Xia L. Q., Ma Y. Z. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;353(2):299-305.
  72. Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Foolad M. R. Heat tolerance in plants: an overview. *Environ. Exp. Bot.* 2007;61(3):199-223.
  73. Hungria M., Kaschuk G. Regulation of N<sub>2</sub> fixation and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilation in nodulated and N-fertilized *Phaseolus vulgaris* L. exposed to high temperature stress. *Environ. Exp. Bot.* 2014;98:32-39.
  74. Miura K., Furumoto T. Cold signaling and cold response in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14(3):5312-5337.
  75. Aranjuelo I., Arrese-Igor C., Molero G. Nodule performance within a changing environmental context. *J. Plant Physiol.* 2014;171(12):1076-1090.
  76. Rodziewicz P., Swarczewicz B., Chmielewska K., Wojakowska A., Stobiecki M. Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiol. Plant.* 2014;36(1):1-19.
  77. Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 2004;9(5):244-52.
  78. Swigonska S., Weidner S. Proteomic analysis of response to long-term continuous stress in roots of germinating soybean seeds. *J. Plant Physiol.* 2013;170(5):470-479.
  79. Cvjetko P., Zovko M., Balen B. Proteomics of heavy metal toxicity in plants. *Arch. Indust. Hygiene Toxicol.* 2014;65(1):1-18.
  80. Sobkowiak R., Deckert J. Proteins induced by cadmium in soybean cells. *J. Plant Physiol.* 2006;163(11):1203-6.
  81. Ahsan N., Nakamura T., Komatsu S. Differential responses of microsomal proteins and metabolites in two contrasting cadmium (Cd) accumulating soybean cultivars under Cd stress. *Amino Acids*. 2012;42(1):317-27.
  82. Hossain Z., Hajika M., Komatsu S. Comparative proteome analysis of high and low cadmium accumulating soybeans under cadmium stress. *Amino Acids*. 2012;43(6):2393-416.
  83. Barkla B. J., Vera-Estrella R., Pantoja O. Progress and challenges for abiotic stress proteomics of crop plants. *Proteomics*. 2013;13(12-13):1801-1815.
  84. Kosakivska I. V., Bluma D. A., Ustinova A. Yu., Demirevska K. Influence of stress temperatures on proteins of *Brassica napus* var. *oleifera* varieties. *Physiol. Biochem. Cultivated Plants*. 2011;43(6):492-497. (in Ukrainian).
  85. Kav N. N. V., Srivastava S., Yajima W., Nidhi S. Application of proteomics to investigate plant-microbe interactions. *Curr. Proteomics*. 2007;4(1):28-43.
  86. Christof R., Muralli S. The application of proteomics to plant biology: a review. *Can. J. Bot.* 2006;84(6):883-892.

Отримано 08.05.2015