

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ**

На правах рукописи



Гончарова Алена Михайловна

**ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ И МУТУАЛИСТА НА
АКТИВНОСТЬ КОМПОНЕНТОВ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ
СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ И ЕЕ ВЗАИМОСВЯЗЬ С УРОВНЕМ
ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В ПРОРОСТКАХ ГОРОХА**

1.5.21. – физиология и биохимия растений

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:
доктор биологических наук
Ломоватская Лидия Арнольдовна**

Иркутск, 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность исследований	6
Положения, выносимые на защиту:	8
Научная новизна	9
Теоретическая и практическая значимость работы	10
Апробация работы	10
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Молекулярные механизмы распознавания фитопатогенов и мутуалистов растениями	12
1.2. Сигнальная сеть растений	16
1.2.1. Сигнальные системы растений	17
1.2.2. Пероксид водорода (H ₂ O ₂) – вторичный мессенджер НАДФН-оксидазной сигнальной системы	20
1.2.3. Аденилатциклазная сигнальная система	22
1.2.4. Системный сигналинг	32
1.2.5. Бобово-ризобиальный симбиоз	33
1.2.6. Взаимодействие растений с патогенными бактериями	42
1.2.7. Род <i>Pseudomonas</i>	44
1.2.8. <i>Clavibacter spp.sepedonicus</i>	47
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
2.1. Объекты исследования	49
2.2. Проращивание гороха и инокуляция проростков бактериями	49
2.3. Культивирование бактерий	50
2.4. Определение интенсивности адгезии бактерий	50
2.5. Инкубация проростков гороха с п-бутирил-цАМФ	51
2.6. Инкубация проростков гороха с сураминол	51
2.7. Определение активности компонентов аденилатциклазной сигнальной системы	52
2.7.1. Определение активности тАЦ и рАЦ	52
2.7.2. Очистка образцов от примесей других циклических нуклеотидов с помощью нейтральной окиси алюминия	53
2.7.3. Иммуноферментный анализ (ИФА)	53
2.8. Определение влияния пероксида водорода на активность трансмембранной (тАЦ) и «растворимой» (рАЦ) аденилатциклазы из клеток корня проростков гороха	55
2.9. Определение концентрации пероксида водорода в корнях проростков гороха	55
2.10. Статистическая обработка данных	56

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	57
3.1. Особенности адгезии патогенов <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> и <i>C. sepedonicus</i> , а также штаммов <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> , отличающихся по эффективности симбиоза на различных участках корня проростков гороха.....	57
3.2. Изменение активности трансмембранной и растворимой форм аденилатциклазы в зонах роста корня проростков гороха под влиянием <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> или <i>C. sepedonicus</i>	63
3.3. Изменение концентрации цАМФ в различных участках корня проростков гороха под влиянием инокуляции <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> или <i>C. sepedonicus</i>	69
3.4. Влияние инокуляции <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> или <i>C. sepedonicus</i> на изменение концентрации эндогенного H ₂ O ₂ в различных зонах корня проростков гороха и в эпикотиле	77
3.5. Влияние n-бутирил-цАМФ и сурамина на изменение концентрации эндогенного H ₂ O ₂ в зонах роста корня и в эпикотиле при воздействии <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> или <i>C. sepedonicus</i>	83
3.6. Влияние экзогенного H ₂ O ₂ на активность тАЦ и рАЦ, выделенных из клеток корней проростков гороха после инокуляции эффективным штаммом <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> , <i>C. sepedonicus</i>	91
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	105

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСС – аденилатциклазная сигнальная система

АЦ – аденилатциклаза

рАЦ – «растворимая» АЦ

тАЦ – трансмембранная АЦ

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

БРС – бобово-ризобиальный симбиоз

СОД – супероксиддисмутаза

СЧ - реакция – реакция сверхчувствительности

ПД – потенциал действия

ФДЭ – фосфодиэстераза

рФДЭ – «растворимая» ФДЭ

тФДЭ – трансмембранная ФДЭ

ЭПС – экзополисахариды

Avr-белок – авирулентный белок

Cs – *Clavibacter sepedonicus*

ETI – effector triggered immunity (иммунитет, активируемый эффекторами патогенов)

GPCR – G-protein coupled resceptors (рецепторы, сопряженные с G-белками)

LRR – leucine-rich repeats (лейцин обогащенные повторы)

LysM – lysin motive (лизиновые мотивы во внеклеточном домене)

NBS (NB) – nucleotide binding site (сигнальная область, связывающаяся с АТФ и ГТФ)

NF – Nod-Factor (факторы нодуляции)

NFR – Nod Factor Resceptors (рецепторы, распознающие факторы нодуляции)

PAMP – pathogen-associated molecular patterns (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны)

PRRs – Pattern Recognition Resceptors (паттерн-распознающие рецепторы)

PR-белки – pathogenesis related proteins (белки, связанные с патогенезом)

Psp – *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*

PTI – pattern-triggered immunity (неспецифический иммунитет, активируемый PAMP)

RLCK – recceptor-like cytoplasmic kinases (рецептор-подобные цитоплазматические киназы)

RLK – recceptor-like kinases (рецептор-подобные киназы)

Rlv – *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследований

Ризосфера и ризоплана являются областью тесного контакта и взаимодействия клеток корней растений с микроорганизмами. На ранних этапах интенсивность и обратимость адгезии бактерий, а также ответная активация сигнальных систем в клетках растений являются ключевыми моментами взаимодействия. Сигнальные события на начальных этапах азотфиксирующего симбиоза и бактериального патогенеза имеют много общего (Gust et al., 2012; Zipfel, Oldroyd, 2017). Это касается, в том числе, кратковременного повышения уровня внутриклеточного пероксида водорода и ионов кальция (Gough, 2001; Puppo et al., 2013; Granqvist et al., 2015). Длительность и интенсивность таких «всплесков» концентраций сигнальных молекул индивидуальна при каждом типе взаимодействий, что способствует развитию соответствующих метаболических программ. Так, одной из особенностей сигнальных событий в клетках растений при бобово-ризобиальном симбиозе (БРС) является однократная, но более сильная «окислительная вспышка», чем при взаимодействии с патогенами. Хорошо известна сигнальная роль ионов кальция (Колупаев, 2007а), а также NO (Puppo et al., 2013) в индукции защитных программ при патогенезе и на начальных этапах бобово-ризобиального симбиоза.

Также известно о неодинаковой активности компонентов некоторых сигнальных систем в участках корня гороха, различных по степени сформированности корневых волосков и, соответственно, метаболизму и содержанию в них активных молекул. В частности, активно растущие корневые волоски бобовых отличаются повышенным содержанием АФК в субапикальной (подверхушечной) области, в то время как в зрелых корневых волосках уровень АФК заметно ниже или отсутствует (Cardenas et al., 2008б). По литературным данным, наиболее «предпочтительными» участками для необратимой адгезии ризобий в корнях бобовых являются зачатки и молодые корневые волоски (Акимова и др., 2002; Макарова и др., 2004; Макарова, Нурминский, 2005; Ho et al., 1994). По данным С. Bowler и R. Fluhr, через 24 ч после инфицирования

Rhizobium leguminosarum в данных участках корней гороха происходит кратковременное возрастание уровня свободного Ca^{2+} и снижение уровня АФК (Bowler, Fluhr, 2000).

Некоторые литературные данные указывают на то, что на ранних этапах бактериального патогенеза инициатором многих сигнальных событий в клетках растений является изменение уровня внутриклеточного циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) (Ломоватская и др., 2014; Bindschedler et al., 2001). Активация компонентов аденилатциклазной сигнальной системы (цАМФ, аденилатциклаза) в клетках растений под воздействием экзометаболитов патогенов может приводить к кальциевым спайкам и изменению уровня внутриклеточного пероксида водорода (Gough, 2001). Подобные данные по участию цАМФ в регуляции начальных этапов БРС в литературе отсутствуют, хотя показано участие этой сигнальной молекулы в контроле поздних стадий азотфиксирующего симбиоза (Terakado et al., 2003).

Несмотря на большое количество работ, посвященных сигнальным системам растений и, в частности, аденилатциклазной сигнальной системе (АСС), остаются до сих пор неясными временные и пространственные различия в активности компонентов этой системы растений при патогенезе и БРС. Это тем более важно, что на ранних этапах инфицирования ризобии проявляют свойства патогенов и супрессируют иммунитет бобовых. Наряду с этим, практически отсутствуют сведения о взаимосвязи между активностью компонентов АСС и другими вторичными мессенджерами в клетках растений.

Поэтому цель настоящего исследования заключалась в изучении изменений в активности компонентов аденилатциклазной сигнальной системы (трансмембранной и «растворимой» форм аденилатциклазы, уровня цАМФ) и концентрации H_2O_2 , а также возможной взаимосвязи этих параметров в проростках гороха при взаимодействии с бактериальными патогенами и мутуалистом.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Провести сравнительный анализ интенсивности адгезии *R. leguminosarum* bv. *viciae* / *P. syringae* pv. *pisi* / *C. sepedonicus* в участках корня проростков гороха, различающихся по степени сформированности волосков через 5, 15, 120 и 360 минут после инокуляции.

2. Изучить влияние инокуляции *R. leguminosarum* bv. *viciae* / *P. syringae* pv. *pisi* / *C. sepedonicus* на концентрацию H_2O_2 , цАМФ и активность трансмембранной и растворимой форм аденилатциклазы в различных участках корня проростков гороха и эпикотиле через 5, 15, 120 и 360 минут после инокуляции.

3. Выявить взаимосвязь между изменением уровня внутриклеточного цАМФ и концентрацией H_2O_2 в различных участках корня проростков гороха и эпикотиле при инокуляции *R. leguminosarum* bv. *viciae* / *P. syringae* pv. *pisi* / *C. sepedonicus* в течение 5 минут.

4. Изучить влияние H_2O_2 на изменение активности трансмембранной и растворимой форм аденилатциклазы из гомогената клеток корней проростков гороха после инокуляции *R. leguminosarum* bv. *viciae* / *P. syringae* pv. *pisi* / *C. sepedonicus*.

Положения, выносимые на защиту:

1. *Rhizobium leguminosarum* bv *vicia* вызывает специфический ответ АСС (трансмембранной и «растворимой» форм аденилатциклазы, уровня цАМФ) в участках корней проростков гороха, восприимчивых к этой инфекции, через 360 минут инокуляции.
2. Существует зависимость уровня H_2O_2 от изменений концентрации цАМФ в участках корня проростков гороха. Экзогенный пероксид водорода дозозависимо снижает активность трансмембранной и «растворимой» форм аденилатциклазы в гомогенате клеток корней проростков гороха, в том числе после предварительной инкубации с бактериальными патогенами и мутуалистом.

Научная новизна

Впервые показано, что бактериальная адгезия на различных по степени сформированности волосков участках корней проростков гороха, определяется специфичностью бактерий (*Rhizobium leguminosarum* bv *vicia*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisii*, *Clavibacter sepedonicus*) в отношении растения-хозяина. При этом активация компонентов АСС в участках корней проростков гороха под воздействием этих бактерий не зависит от интенсивности их адгезии. Это подтверждается существенным возрастанием уровня цАМФ при инокуляции *Clavibacter sepedonicus*, несмотря на полное отсутствие адгезии данного патогена. Резкое повышение активности аденилатциклазы и уровня цАМФ при инокуляции только эффективным по азотфиксации штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* в участках корня, наиболее восприимчивых к ризобияльной инфекции, доказывает участие АСС в процессах формирования бобово-ризобияльного симбиоза.

Также впервые показано влияние экзогенного цАМФ на изменения концентрации H_2O_2 в корнях проростков гороха. При искусственном снижении уровня цАМФ в корнях неинокулированных бактериями проростков гороха, концентрация H_2O_2 возрастала. В то время как кратковременная инокуляция бактериальным мутуалистом или патогенами снижала уровень H_2O_2 во всех участках корней.

В экспериментах с применением экзогенного H_2O_2 впервые установлено, что избыток этой молекулы способен снижать активности как трансмембранной, так и «растворимой» аденилатциклазы в гомогенате корней проростков гороха, особенно интенсивно после предварительного воздействия *R. leguminosarum* bv *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* или *Clavibacter sepedonicus*.

По результатам проведенных исследований с привлечением литературных данных предложена схема взаимодействия аденилатциклазной и супероксидсинтазной сигнальных систем клеток корней гороха при воздействии азотфиксирующих и фитопатогенных бактерий.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные расширяют и углубляют современные представления о взаимосвязи внутриклеточного сигналинга растений с процессами специфического/неспецифического узнавания на ранних этапах растительно-бактериального молекулярного диалога, которые могут быть использованы для построения более полной модели внутриклеточных сигнальных и защитных механизмов растений при бактериальном патогенезе или азотфиксирующем симбиозе. Результаты исследования могут использоваться в биотехнологии для разработки методов диагностики устойчивости и эффективности азотфиксации новых сортов растений и штаммов микроорганизмов. Материалы диссертации могут быть включены в курсы лекций по физиологии и биохимии растений, микробиологии, экологии, а также использоваться в профильных научно-исследовательских институтах Российской академии наук.

Апробация работы

Международная научная конференция «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», «PLAMIC2018» (Уфа, 13–17 июня 2018 г.); Всероссийская научная конференция с международным участием «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды», VIII съезд общества физиологов растений России, (Иркутск, 10–15 июля 2018); Всероссийская научная конференция с международным участием, «Физиология растений – основа создания растений будущего», IX съезд Общества физиологов растений России, (Казань, 19–21 сентября 2019 г.).

Личное участие автора

Автор лично принимал участие в планировании и проведении экспериментов, статистической обработке, обобщении и интерпретации полученных данных, а также в написании статей, опубликованных по результатам работы. В диссертационной работе использованы экспериментальные материалы, полученные лично автором, а также совместно с сотрудниками лаборатории генетической инженерии растений СИФИБР СО РАН.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения и трех глав, включающих обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 343 библиографических источников, 240 из которых на английском языке. Материалы диссертации изложены на 146 страницах машинописного текста, иллюстрированы 19 рисунками и 5 таблицами.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность и благодарность научному руководителю диссертационной работы – главному научному сотруднику лаборатории физиологии устойчивости растений, доктору биологических наук, Лидии Арнольдовне Ломоватской за идейное руководство и всестороннюю помощь, а также за предоставленную возможность работать над интересной темой. Автор выражает искреннюю благодарность главному научному сотруднику, заведующей лабораторией физиологии устойчивости растений, доктору биологических наук, Людмиле Евгеньевне Макаровой за ценные советы и рекомендации, а также н.с. лаборатории физиологии устойчивости растений, к.б.н. Ольге Васильевне Захаровой за помощь в проведении экспериментальной работы. Кроме того, автор выражает благодарность с.н.с. лаборатории физиологии устойчивости растений, к.б.н. Галине Петровне Акимовой; доценту, д.б.н., главному научному сотруднику, заведующей лабораторией физиологической генетики Ольге Ивановне Грабельных; с.н.с. лаборатории физиолого-биохимической адаптации, д.б.н. Марине Диомидовне Пермяковой, а также доценту кафедры физиологии растений, клеточной биологии и генетики ИГУ, к.б.н., Анастасии Валерьевне Третьяковой за внимательное прочтение рукописи, сделанные замечания и полезные рекомендации при ее подготовке.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Молекулярные механизмы распознавания фитопатогенов и мутуалистов растениями

В природе растения постоянно атакуются различными видами бактерий, взаимодействие с которыми может приводить как к развитию симбиоза, так и заболеванию у растений. При этом микроорганизмы содержат консервативные специфические молекулярные структуры, отсутствующие у растений. Такие структуры получили название микробных “паттернов” (или MAMP – microbial associated molecular patterns) (Staal, Dixelius, 2007; Trdá et al., 2015). В свою очередь структуры, характерные только для патогенов, называются патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (или PAMP – pathogen-associated molecular patterns) (Кабашникова, 2018; Nurnberger, Kemmerling, 2018). К MAMP и PAMP можно отнести флагеллины, факторы удлинения Tu (EF-Tu), липополисахариды, пептидогликаны и др. (Boller, Felix, 2009).

Для их распознавания растения, как и животные, используют комплексы рецепторных киназ RLK (receptor-like kinases) на клеточной поверхности. Кроме того, у растений существуют и внутриклеточные рецепторы, играющие важную роль в фитоиммунитете (Шафикова, Омеличкина, 2015). В состав RLK входит внеклеточный домен, участвующий в восприятии лиганда, трансмембранный домен и внутриклеточный киназный домен. Также рецепторы могут быть представлены специализированными белками, которые имеют только внеклеточный сигнальный домен (Couto, Zipfel, 2016).

Растительные рецепторы имеют один или несколько центров связывания молекул и проявляют высокое сродство к своим лигандам. Распознавание микробных молекул растениями является лишь частично консервативным; некоторые неспецифические факторы вирулентности, например, флагеллины, имеют различные эпитопы, которые распознаются различными рецепторами. Например, флагеллин flg22 и EF-Tu имеют несколько иммуногенных эпитопов, включая консервативный 22-аминокислотный эпитоп flg22, который распознается большинством наземных растений через лейцинобогатую рецепторную

киназу FLS2 (Boller, Felix, 2009). Однако пасленовые и рис могут воспринимать флагеллины FLS2-независимым способом (Fliegmann, Felix, 2016).

В настоящее время рецепторы, интегрированные в плазматическую мембрану, по структуре и механизму функционирования делят на три типа:

- 1) рецепторы, активность которых связана с G-белками (GPCR – G-protein coupled receptors);
- 2) рецепторы, представляющие из себя ионные каналы;
- 3) рецепторы, работа которых связана с ферментативной активностью (Альбертс и др., 1994).

Рецепторы третьего типа по принципам взаимодействия с цитоплазматическими мишенями подразделяются на серин-треониновые протеинкиназы и гистидинкиназы. Каталитический участок данных рецепторов локализован с цитоплазматической стороны и активируется под влиянием внешнего сигнала. Вместе с соответствующим фактором транскрипции они образуют так называемую двухкомпонентную сигнальную систему, чем напоминают аналогичные системы простейших (Джамеев, 2015). Серин-треониновые протеинкиназы найдены не только в наружной мембране клетки растений, но и в клеточной стенке. Они физически связывают внеклеточный матрикс и цитоплазму и осуществляют между ними сигнальные функции. В настоящий момент считается, что у растений это самый распространенный класс рецепторов.

У гистидинкиназ, в свою очередь, ферментативная активность отсутствует. По этой причине этот вид рецепторов функционирует только при связывании с цитоплазматическими (нерецепторными) протеинтирозинкиназами при действии внешнего сигнала. Нерецепторные протеинтирозинкиназы, в свою очередь, в свободном состоянии неактивны. В основном, эти рецепторы являются или мономерами, или олигомерами (Холл, 2002).

По литературным данным, у растений также имеются регуляторные рецепторные киназы (Halter et al., 2014; Le et al., 2014; Yeh et al., 2016).

Защитные реакции растений, возникающие в ответ на воздействие МАР и РАМР, являются первым уровнем врожденного неспецифического иммунитета и получили название РТИ (pattern-triggered immuniti). Результатом работы РТИ является развитие реакции сверхчувствительности (СЧ-реакция) (Tsuda et al., 2008). Однако в процессе эволюции патогены научились обходить систему неспецифического иммунитета на уровне распознавания паттерн-распознающих рецепторов (PRRs – Pattern Recognition Recptors) и проникать в клетки, на что растения ответили развитием специфического иммунного ответа, активируемого лигандами (эффекторами) патогенов – ЕТИ (effector-triggered immuniti) (Шафикова, Омеличкина, 2015). Функционирование ЕТИ обусловлено цитоплазматическими R-белками (resistant-устойчивый), узнающими специфические эффекторы определенных патогенов. Эти белки существуют у растений конститутивно и обладают рецепторными функциями за счет входящих в их состав лейцин обогатенных повторов (LRR-leucine-rich repeats), связывающихся с элиситором патогена. Также в состав R-белков входит сигнальная область NBS (NB) (nucleotide binding site), которая связывается с аденозинтрифосфатом (АТФ) и гуанозинтрифосфатом (ГТФ), что приводит к активации ферментов или G-белков. Для привязки к внутриклеточным компонентам R-белки используют область так называемой «лейциновой застежки» (Хаитов, 2006; Вахрушева, Недоспасов, 2011).

Индукция защитных ответов посредством цитоплазматических рецепторов NB-LRRs или R-белков происходит в три этапа. На первом этапе лиганд, эффектор бактериального фитопатогена, проникший в клетку, связывается с NB-LRRs. На второй стадии NB-LRRs активируется путем конформации и связыванием АТФ с NB доменом. На третьей стадии активированный рецептор поступает в ядро через ядерные поры для индукции защитных ответов. Это может происходить путем ингибирования негативных регуляторов защиты, таких как TIR49a-транскрипционный кофактор (Caplan et al., 2008).

Если бактериальный эффектор проникает непосредственно в цитоплазму клеток растения, то его узнавание может осуществляться различными путями.

Например, существует так называемая “сторожевая” гипотеза (“guard hypothesis”), согласно которой являющиеся мишенью для патогенов рецепторы NB-LRR ассоциированы с белком-адаптером, связывающего микробные эффекторы и делающих их доступными для распознавания R-белком. Таким образом у растений происходит запуск эффектор-запускаемого иммунитета ETI (effector triggered immunity). Также распознавание эффекторов в клетке растений может осуществляться с помощью белка-посредника, который является структурным аналогом мишени эффектора и конкурирует за связывание с ним (McDowell, Woffenden, 2003; Rafiqi et al., 2009).

Третий способ распознавания патогенов носит название “модель приманка” (“bait-and-switch model”). В данном случае эффектор сначала связывается со специальным белком, выполняющим роль приманки. При этом необходима связь с АТФ. Далее авирулентный (Avr) белок вызывает конформационные изменения в интерфейсе NB-LRR, что приводит к инициации сигнала. Одновременно с этим или после происходит диссоциация данного комплекса и NB-LRR через белок-приманку может снова взаимодействовать со следующим эффектором (Hann et al., 2010).

Важным принципом в становлении процесса распознавания сигналов с помощью растительных рецептор-киназных комплексов является динамическая ассоциация и активация рецепторо-подобных цитоплазматических киназ (RLCKs – receptor-like cytoplasmic kinases). Известно, что эволюционно эти рецепторо-подобные цитоплазматические киназы связаны с RLK, однако в отличие от последних, лишены трансмембранных и внеклеточных доменов (Sreekanta et al., 2015). Разнообразные RLCKs связывают лиганд-активированные рецепторные комплексы с целью трансдукции сигналов к генетическому аппарату клетки. По данным E. Andrio с коллегами, RLCK принимает участие в нодуляции (Andrio et al., 2013).

В результате работы врожденного иммунитета как на уровне PTI, так и на уровне ETI, у растений может формироваться системная устойчивость, которая

обеспечивает длительную защиту всего растения от различных патогенов (Кабашникова, 2018; Jones, Dangl, 2006; Tsuda et al., 2008).

1.2. Сигнальная сеть растений

Для формирования защитных реакций при биотическом и абиотическом стрессах растения выработали различные механизмы, с помощью которых происходит распознавание, усиление и трансдукция внешних сигналов и последующая передача в ядро клетки, что приводит к запуску необходимых процессов (Тарчевский, 2001). Кроме того, растения способны к межклеточным коммуникациям, что позволяет им передавать информацию на значительные расстояния (Пятыгин, 2007, 2008a; Felle, Zimmermann, 2007). Таким образом, у растений подразумевается наличие объединенной сигнальной сети, состоящей из отдельных систем, контролирующей активность генетического аппарата клетки (Тарчевский, 2001). Основными компонентами сигнальных систем являются молекулы, выполняющие роль вторичных мессенджеров при передаче сигнала, а также ферменты, регулирующие их концентрацию в клетке. К дополнительным компонентам сигнальных систем также можно отнести G-белки, протеинкиназы и протеинфосфатазы.

G-белки являются посредниками между рецепторами клеточной мембраны и эффекторными белками (Бовин, Долгих, 2019; Jones, Assman, 2004). В состав G-белков различных живых организмов входят три субъединицы альфа-, бета-, и гамма. При этом, бета-, и гамма, в основном, работают как $\beta\gamma$ -комплекс (Бовин, Долгих, 2019; Trusov et al., 2007; Wang et al., 2008).

Гамма-субъединица взаимодействует с C -участком рецептора, а β -субъединица объединяет γ с неактивной α -субъединицей, которая связана с молекулой гуанозиндифосфата (ГДФ). При воздействии лигандом, внешний N-концевой участок трансмембранного рецептора подвергается конформационным изменениям. Далее, сигнал передается на связанный с ним гетеротримерный комплекс G-белков. Затем, происходит обмен ГДФ, связанного с α -субъединицей, на цитоплазматический ГТФ. В результате α -субъединица активируется, выходит из комплекса и взаимодействует с аденилатциклазой или другим стартовым

ферментом какой-либо сигнальной системы. Со временем ГТФ дефосфорилируется, в результате чего α -субъединица становится неактивной. Происходит восстановление исходной структуры неактивного комплекса $\alpha\beta\gamma$, связанного с рецептором. Такие преобразования, сопровождающиеся превращением цитозольного ГТФ в ГДФ, обеспечивают как передачу сигнала от рецептора к любому стартовому ферменту, так и прерывание через некоторое время сигнальной цепи. Данное условие необходимо для эффективной работы любой сигнальной системы (Тарчевский, 2001).

Другими важными компонентами в сигнальной сети растений являются протеинкиназы и протеинфосфатазы. Протеинкиназы осуществляют посттрансляционную модификацию ферментов и других белков путем фосфорилирования входящих в их состав аминокислот. У эукариот выявлено около 1000 представителей протеинкиназ, многие из которых выявлены у растений (Xu et al., 2006; Lehti-Shiu, Shiu, 2012). Протеинкиназы состоят из трех доменов. Первый, каталитический, является консервативным для различных семейств этих ферментов. Второй имеет менее консервативную структуру и выполняет регуляторную функцию. От его структуры зависит способность протеинкиназ взаимодействовать с конкретными частями эффекторов, в качестве которых могут служить вторичные мессенджеры сигнальных систем клеток. В результате происходит регуляция работы протеинкиназ и модуляция интенсивности передачи элиситорного импульса по сигнальной цепи. Третий домен протеинкиназ отвечает за распознавание субстратов и является наиболее вариабельным (Джамеев, 2015; Кабашникова, 2018).

При завершении передачи сигнала и возвращении белков в исходное состояние важную роль играют протеинфосфатазы, осуществляющие реакции дефосфорилирования (Джамеев, 2015; Кабашникова, 2018).

1.2.1. Сигнальные системы растений

В клетках всех живых организмов восприятие, усиление и трансдукцию различных сигналов из окружающей среды обеспечивают сигнальные системы. При этом компоненты одних сигнальных систем в разной степени могут менять

активность других.

Известно, что в клетках растений функционируют одновременно несколько сигнальных систем: MAP-киназная, липоксигеназная, фосфатидатная, кальциевая, NO-синтазная, протонная, НАДФН-оксидазная и аденилатциклазная.

В настоящее время MAP-киназная сигнальная система хорошо изучена на животных объектах (Zhao et al., 2007). Основными компонентами являются митоген-активируемые протеинкиназы серин-треонинового типа (МАРК) и MAP-киназный каскад. После распознавания рецептором, сигнал передается на G-белки. Далее происходит активация киназы киназы MAP-киназы (МАРККК), затем – киназы MAP-киназы (МАРКК) и, далее, MAP-киназы (МАРК), которая, в свою очередь, активирует факторы транскрипции. Также известна способность MAP-киназной сигнальной системы активировать липоксигеназную путем фосфорилирования ФЛА₂. Кроме того показано, что отдельные компоненты MAP-киназной сигнальной системы ингибируются активными формами кислорода (АФК) (Креславский, 2012).

Вторичными мессенджерами липоксигеназной сигнальной системы являются оксипирины, активирующие экспрессию генов защитных реакций (Mikami et al., 1998). Основными ферментами данной системы являются мембранозвязанная фосфолипаза А₂ и липоксигеназа (Озерецковская и др., 2008; Cowan, 2005). Усиление сигналов в этой сигнальной системе происходит за счет нескольких видов автокаталитических процессов (циклов) (Джамеев, 2014; Покотило и др., 2015).

Представляет интерес изучение фосфатидатной сигнальной системы, стартовым ферментом которой является фосфолипаза Д (Canonpe et al., 2011). В ходе функционирования данной сигнальной системы происходит высвобождение фосфатидной кислоты из фосфолипидов (Тарчевский, 2001). Известно, что накопление свободной фосфатидной кислоты влияет на активность мембрансвязанных компонентов других сигнальных систем. Также, фосфатидная кислота способна регулировать уровень внутриклеточного кальция (Тарчевский, 2001; Schroeder et al., 2001). У животных фосфатидная кислота активирует

супероксидсинтазный сигнальный каскад, однако у растительных клеток такого явления обнаружено не было (Schroeder, 2001).

Известно, что одной из наиболее ранних ответных реакций на стрессы является повышение уровня кальция в цитозоле – вторичного мессенджера кальциевой сигнальной системы (Zipfel, Oldroyd, 2017). Сигнальная функция основана на способности ионов кальция взаимодействовать с белками, тем самым изменяя их трансформацию и, следовательно, свойства (Batistic, Kudla, 2012; Kudla et al., 2018). Известно, что кальций может проникать через кальциевые каналы различных клеточных органелл (Zimmermann et al., 1999). Немаловажным является взаимосвязь кальциевой сигнальной системы с циклическими нуклеотидами (Swieżawska-Boniecka et al., 2021). Декодирование сигнала Ca^{2+} в клетках растений обеспечивают кальций связывающие белки. В частности, протеинкиназы и регуляторный белок кальмодулин, активирующийся при связывании четырех ионов Ca^{2+} . Протеинкиназы, в свою очередь, активируются независимо или независимо от кальмодулина. В клетках протеинкиназы фосфорилируют факторы регуляции транскрипции, изменяя экспрессию генов защитных белков. Также важными элементами кальциевой сигнальной системы являются кальциевые каналы (Колупаев, 2007а).

Также известно о важной роли протонов H^+ в регуляции защитных реакций клеток на действие элиситоров (Тарчевский, 2001; Geilfus, 2017).

Вызывает интерес и NO-синтазная сигнальная система, вторичным мессенджером которой является оксид азота (Джамеев, 2015). Эта молекула играет важную роль в защите растений от патогенов (Дмитриев, 2003). Растения способны поглощать атмосферный оксид азота листьями, а также самостоятельно образовывать его в значительных количествах. Показано, что NO принимает участие в процессах роста, развития и устойчивости растений. Накопление NO способствует ограничению роста и развития патогена, однако неизвестно, обладает ли оксид азота непосредственным антимикробным действием (Pande et al., 2021).

Кроме того, действие элиситоров на клетки приводит к интенсивному

синтезу активных форм кислорода (АФК). К числу АФК относятся свободнорадикальные частицы ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}), пероксидные радикалы (RO_2^{\cdot}), а также нейтральные молекулы (H_2O_2 , 1O_2 , O_3) и так далее (Колупаев, 2007б; Креславский, 2012; Ткачук и др., 2012; Шарова, 2016). Процесс усиленной генерации клетками АФК при стрессе так называемого «окислительного взрыва», впервые обнаружили в 1983 году (Doke et al., 1996) при инфицировании фитофторой клубней картофеля. Позже «окислительный взрыв» у растений наблюдали при воздействии различных биотических и абиотических стрессоров (Bindschedler et al., 2001). Одной из важных функций окислительного взрыва можно считать появление реакции сверхчувствительности, которая приводит к гибели инфицированной клетки и формированию вокруг него зоны из мертвых клеток, содержащих антимикробные соединения (Kunstler et al., 2015; Qi et al., 2017).

Немаловажной также является функция АФК в качестве сигнальных молекул, участвующих в активации защитных генов (Дмитриев, 2003; Пятыгин, 2008б; Максимов, 2017). Так, АФК функционируют как вторичные мессенджеры, участвующие в передаче стрессового сигнала на генетический аппарат клетки (Колупаев, Карпец, 2010; Gamaley, Klyubin, 1999). Известно, что под действием АФК происходит перекисное окисление липидов. Далее, продукты перекисного окисления липидов способны вступать в реакцию с мембранными белками (Лукаткин, 2002; Ткачук и др., 2012). При этом, важную роль играют редокс-чувствительные белки (Колупаев, 2007б).

НАДФН-оксидаза является ключевым ферментом НАДФН-оксидазной сигнальной системы. В клетках растений этот фермент продуцирует супероксид-радикал $O_2^{\cdot-}$ путем переноса электронов от НАДФН к кислороду. Далее, $O_2^{\cdot-}$ при помощи супероксиддисмутазы превращается в H_2O_2 – молекулу, обладающей, помимо защитной, сигнальной функцией (Глянко, Ищенко, 2010).

1.2.2. Пероксид водорода (H_2O_2) – вторичный мессенджер НАДФН-оксидазной сигнальной системы

В настоящее время большой интерес вызывает изучение пероксида водорода в роли сигнальной молекулы (Креславский, 2012; Швартау и др., 2014).

Процесс образования H_2O_2 в клетке может происходить спонтанно за счет дисмутации O_2^- посредством активности супероксиддисмутазы (СОД) (Ишеева, 2010; Ткачук и др., 2012; Загоскина, Назаренко, 2016). H_2O_2 относится к менее токсичным и более стабильным из всех АФК, при этом способным проникать через мембраны и преодолевать значительные расстояния со скоростью от 0.01 до 0.7 см/мин (Vranova et al., 2002; Makino et al., 2004; Bienert et al., 2007).

В клетках растений пероксид водорода может способствовать откреплению от клеточной стенки ряда слабосвязанных ферментов. Наиболее важной сигнальной ролью пероксида водорода является его свойство оказывать влияние на структуру и, следовательно, активность белков, используя в качестве мишеней сульфгидрильные группы (Spadaro et al., 2010), в том числе входящих в состав энзимов других сигнальных систем. Показано, что H_2O_2 вызывает активацию липоксигеназы, фосфолипазы A_2 и C , а также гуанилатциклазы (Волин и др., 1998). Также H_2O_2 способен активировать одну из изоформ киназы - MAP-киназы (Ткачук, 2012; Kovtun et al., 2000). Вероятно, благодаря этой способности H_2O_2 играет важную роль в работе MAP-киназной системы, причем одновременно с активацией PR-белков (pathogenesis-related proteins) (Тарчевский, 2001; Ткачук, 2012). Существует мнение, что первичным сенсором пероксида водорода является двухкомпонентная гистидин-киназа, которая является активатором MAP-киназного сигнального каскада (Scandalios, 2005).

Также H_2O_2 может служить в качестве индуктора экспрессии НАДФН-оксидазы (Самуилов, 2006). Вероятно, что данный способ активации НАДФН-оксидазы необходим в формировании защитного ответа растений при заражении патогенами, при котором наблюдается первичный всплеск уровня пероксида водорода за счет работы, в том числе, внеклеточными апопластными пероксидазами (Ишеева, 2010).

Важную роль также играет способность пероксида водорода влиять на экспрессию защитных хлоропластных и ядерных генов при стрессе (Foyer, Noctor, 2009).

1.2.3. Аденилатциклазная сигнальная система

1.2.3.1. Общая характеристика

Существование аденилатциклазной сигнальной системы у растений долгое время ставилось под сомнение. Однако, применение методов спектроскопии, ЯМР, радиоиммунного анализа показало присутствие цАМФ в растительных клетках и, следовательно, аденилатциклазы и фосфодиэстеразы, регулирующих его концентрацию (Ломоватская и др., 2007, 2010; Martinez-Atienza et al., 2007).

В состав аденилатциклазной сигнальной системы растений, как и у всех высших эукариот, входят рецептор, G-белок, аденилатциклаза (АЦ) и фосфодиэстераза (ФДЭ).

Аденилатциклазы (АТФ–пирофосфатлиаза циклизирующая КФ 4.6.1.1) катализирует следующую реакцию: $ATP \rightarrow cAMP + PP_n$ (фосфат неорганический).

При этом, у разных видов живых организмов аденилатциклаза имеет значительные различия в регуляции (Defer et al., 2000; Sunahara, Taussig, 2002; Halls, Cooper, 2017). На основании сходства аминокислотного строения каталитических центров аденилатциклазы делят на несколько классов. АЦ из *E. coli* из соответствующих грамотрицательных прокариотов вошли в класс I. Класс II охватывает «токсиновые» АЦ из таких патогенов, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Bacillus anthracis* (Drum et al., 2002; Baker, Kelly, 2004). Эукариотические АЦ и гуанилатциклазы отнесли к классу III, наиболее обширному, куда входят члены из бактериального и животного царств (Kamenetsky et al., 2006). Классы IV, V и VI выделены сравнительно недавно и включают один или несколько прокариотических членов (Kamenetsky et al., 2006; Halls, Cooper, 2017). К сожалению, АЦ растений пока несистематизированы. Очевидно, это связано с отсутствием однозначных данных о нуклеотидных последовательностях каталитических участков этого растительного фермента.

По своей локализации в клетке АЦ класса III, характерные для всех организмов, включая растения, делятся на две большие группы: трансмембранные формы фермента, представляющие собой белковые молекулы, один или более раз

пронизывающие плазматическую мембрану, и растворимые (цитозольные) (Sunahara, Taussig, 2002; Baker, Kelly, 2004; Halls, Cooper, 2017).

Трансмембранные аденилатциклазы (тАЦ) III класса биохимически и структурно хорошо изучены у бактерий, животных и человека (рис. 1) (Sunahara, Taussig, 2002; Baker, Kelly, 2004; Linder, 2006; Bassler et al., 2018). Установлено, что тАЦ животных имеет молекулярную массу 180-200 кДа (Ishikawa, Homcy, 1997) и содержит пять доменов: N – терминальный цитозольный домен, ТД1 – погруженный в мембрану гидрофобный домен, состоящий из шести α -спиралей. Далее находится большой цитоплазматический домен С1а, за которым располагается второй трансмембранный спиральный домен ТД2, содержащий гликозильный остаток. У С-конца аденилатциклазы находится второй цитоплазматический домен С2а, гомологичный первому. Цитоплазматические домены С1а и С2а образуют один каталитический домен, в состав которого входит участок связывания с АТФ, а также сайт связывания с форсколином, являющегося активатором данной формы аденилатциклазы. Кроме того, в каталитическом центре находится зона, в которой происходит связывание фермента с α -субъединицей G-белка: Gs (стимулирующей) или Gi (ингибирующей) (Dessauer, 1999).

Как показали поиски в различных базах данных и литературных источниках, сходства растительных тАЦ с ортологами животных по аминокислотным последовательностям не были обнаружены (Gehring et al., 2010).

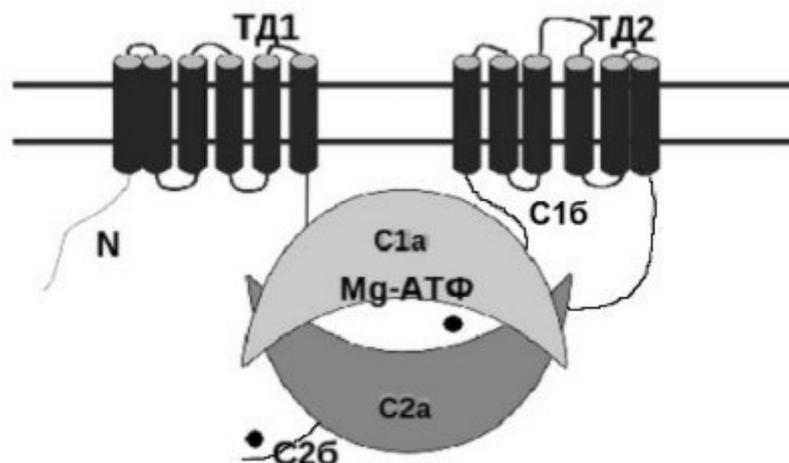


Рисунок 1. Структура трансмембранной аденилатциклазы (Яковлева и др., 2009).

тАЦ содержит пять доменов: N – терминальный цитозольный домен, ТД1 – погруженный в мембрану гидрофобный домен, состоящий из шести α -спиралей. Далее располагается большой цитоплазматический домен C1a, за которым следует второй трансмембранный спиральный домен ТД2, имеющий гликозильный остаток. У C-конца фермента расположен второй цитоплазматический домен C2a, гомологичный первому. Цитоплазматические домены C1a и C2a образуют один каталитический домен, в состав которого входит участок связывания с АТФ, а также сайт связывания с форсколином, являющегося активатором данной формы аденилатциклазы. Кроме того, в каталитическом центре находится зона, в которой происходит связывание фермента с α -субъединицей G-белка.

Первый серьезный поиск аминокислотных последовательностей АЦ растений *in silico* был предпринят С. Gehring (2010). В дальнейшем было показано, что у растений имеются мультимерные белки, содержащие несколько доменов, в том числе имеющих свойства аденилатциклаз (Wong, Gehring, 2013; Swieżawska et al., 2014; Al-Younis et al., 2015). Причем, аденилатциклазная активность этих белков неодинакова и зависит от присутствия в активном центре отрицательнозаряженных аминокислот, необходимых для связывания катионов Mg^{2+}/Mn^{2+} (Ruzvidzo et al., 2019).

По литературным данным, в арабидопсисе кандидатные АЦ включают два белка (At3g28223 и At4g39756) и toll-интерлейкиновый рецептор (TIR) NBS-LRR

(Nucleotide binding site- leucine-rich repeats) (At3g04220), участвующие в защитных реакциях растений (Wong, Gehring, 2013).

В связи с этим следует заметить, что АЦ из кукурузы (Moutinho et al., 2001) структурно схожа с растительными TIR-NBS-LRR (Toll/interleukin-1 recceptor nucleotide-binding site leucine-rich repeat) белками устойчивости к болезни. Например, ADB66335.1, *Populus trichocarpa*, 4e-76 и At3g04220, которые также содержат Р-петлю, характерную для нуклеотидциклаз (Leipe et al., 2004). Поиск в программе BLAST для библиотеки белковых семейств и суперсемейств, индексированных по функциям, указывает на присутствие в арабидопсисе 83 позиций с онтологами генов АЦ следующих категорий биологических процессов: процессы иммунной системы, рецепторы клеточной поверхности, связанные с передачей сигнала, внутриклеточный сигнальный каскад, метаболические процессы нуклеотидов и нуклеиновых кислот и сигнальная трансдукция (Wong, Gehring, 2013). Таким образом, предложенный С. Gehring метод *in silico* очерчивает довольно широкий круг претендентов на роль АЦ, но не дает точного представления об их нуклеотидных последовательностях. Другие авторы (Ruzvidzo et al., 2013), используя состоящий из 14 аминокислотных остатков мотив арабидопсиса (At3g21465), полученный в базе данных BLAST, выделили АЦ-подобный белок, специфически связывающийся с АТФ и катализирующий его превращение в цАМФ. В ходе экспериментов At3g21465 был экспрессирован в клетки *Escherihia coli*, в которых этот белок проявлял аденилатциклазную активность. Как утверждают авторы, этот фермент также функционирует в митохондриях, где участвует в проведении сигналов при возникновении стрессов. Недавно хлоропластах арабдопсиса был найден еще один комплексный белок, 9-цис-эпоксикаротиноид-диоксигеназа (NCED3 и At3g14440), отвечающий за синтез АБК и содержащий участок с аденилатциклазной активностью (Al-Younis et al., 2021).

В. Swieżawska с коллегами (2014) удалось клонировать и охарактеризовать новый ген аденилатциклазы из *Hippeastrum hybridum*, названный *HpAC1*. Этот ген кодирует белок, состоящий из 206 аминокислот с рассчитанной молекулярной

массой 23кД и изоэлектрической точкой, равной 5.07. Предсказанная аминокислотная последовательность содержит все типичные признаки и имеет высокую идентичность с предполагаемыми растительными АЦ. Очищенный рекомбинантный белок HрАС1 способен конвертировать АТФ в цАМФ. Комплементационный тест, использованный для анализа способности *HрАС1* компенсировать дефицит АЦ в *Escherichia coli*, штамм SP850, показал, что HрАС1 функционирует как аденилатциклаза и продуцирует цАМФ. Кроме того, авторы показали, что уровень транскрипта HрАС1 и концентрация цАМФ изменялись в условиях стресса (Swieżawska et al., 2014). По-видимому, АЦ в *Hippeastrum* является цитозольным белком, поскольку *in silico* анализ алгоритма с помощью программы SOSUI не показал присутствие трансмембранной последовательности внутри HрАС1. Такой вывод был подтвержден биохимически, когда активатор трансмембранной АЦ, фторид натрия, не оказал влияния на обсуждаемый фермент. Однако HрАС1 имеет гомологию с аналогичными белками из мха (*Physcomitrella patens*) и водорослей (*Chlorella variabilis*, *Volvox carteri*, *Chlamidomonas reinhardtii* и *Coccomyxa subellipsoidea*), а также с многими АЦ из грамположительных бактерий (стрептококки, бациллы, энтерококки и стафилококки). Ценность большинства представленных выше литературных данных заключается не только в определении неких аминокислотных/нуклеотидных последовательностях активного центра АЦ, но и в экспериментальном подтверждении функциональной активности таких рекомбинантных молекул. Кроме того, такой подход показал, что этот фермент, скорее всего, функционирует в составе мультибелковых комплексов. Об этом свидетельствуют данные, полученные рядом авторов. I. Al-Younis с коллегами (2015) удалось выявить в K^+ - зависимой пермеазе 7 (AtKUP7) N-концевой цитозольный домен AtKUP71-100 с активностью АЦ. Встраивание данной последовательности в мутант *Escherichia coli*, дефицитного по *суаА* (аденилатциклаза), восстанавливало ферментацию лактозы, что невозможно без соответствующего уровня внутриклеточного цАМФ (Al-Younis et al., 2015). Весьма интересным представляется сообщение о том, что в эндоцитозных

пузырьках в составе клатринового белкового комплекса были выявлены нуклеотидные последовательности, соответствующие каталитическому центру АЦ: AT1G68110 и AtClAP. Полагают, что цАМФ необходим в перемещении и изоляции патогенных эффекторов в эндоплазматическую сеть и вакуоль растительных клеток (Chatukuta et al., 2018). Также недавно у кукурузы были определены митохондриальный белок ZmRPP13-LK3 и прикрепленный к плазматической мембране ZmPSiP, обладающие аденилатциклазной активностью и дополнительной функцией PR-белков (pathogen resistens protein). Показана роль этих АЦ в индуцированной абсцизовой кислотой термоустойчивости растений путем усиления экспрессии БТШ (Yang et al., 2021).

Поскольку исследования свойств и структуры АЦ у растений значительно отстают по времени и эффективности от таковых у животных, данные об этих ферментах долгое время имели скудный и противоречивый характер (Bhalta, Chopra, 1984; Carricarte et al., 1988). При этом, неоспоримым сходством АЦ животных и растений является их субстратная специфичность – АТФ и металлы-кофакторы (Mn^{2+} , Mg^{2+}) (Lusini et al., 1990), а также активаторы (NaF , Ca^{2+}) (Lomovatskaya et al., 2007a, б, 2011). На этом фоне представляются весьма интересными опубликованные сведения о нетипичной аденилатциклазе из мха печеночника *Marchantia polymorpha*. Этот фермент имеет стандартный С-домен, характерный для III класса АЦ, и N-концевой домен, представляющий собой фосфодиэстеразу (Kasahara et al., 2016). Этот рекомбинантный белок кодируется геном *MpCAPE* (COMBINED AC with PDE), наиболее высокая его активность была найдена в органах размножения этого растения – антеридиумах. Авторы полагают, что этот белок необходим для регуляции репродуктивного процесса в растениях с мужскими гаметофитами. Недавно, ортологи *CAPE* были обнаружены у других видов растений, размножающихся с помощью подвижных сперматозоидов (Yamamoto et al., 2021). Еще одним свойством, указывающим на сходство механизмов регуляции тАЦ животных и растений, является модуляция их активности с помощью соответствующих G-белков (Lomovatskaya et al., 2011).

К настоящему еще не установлен изоферментный состав аденилатциклаз.

При этом существуют косвенные доказательства присутствия у растений изоформ тАЦ. Например известно, что Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} способны вызывать различный, в том числе противоположный эффект на активность тАЦ (Carricarte et al., 1988; Lusini et al., 1990; Pietrowska-Borek et al., 2014).

По литературным данным, оптимум pH для тАЦ растений имеет большой разброс. Так, выявлена форма тАЦ с оптимумом активности при pH 4.8-5.2, также показана изоформа с оптимумом активности в щелочной области (pH 8.8). Причем форсколин и фторид натрия, как и в отношении тАЦ животных, активировали этот фермент (Lusini et al., 1990; Lomovatskaya et al., 2006; Tezuka et al., 2007).

Про «растворимую» аденилатциклазу растений обнаруживается еще более противоречивая информация. Например, была частично изучена фракция «растворимой» АЦ из корней люцерны (*Medicago sativa*) (Carricarte et al., 1988). Как оказалось, измеренная в присутствии $MnATP$ в качестве субстрата аденилатциклазная активность, стимулировалась ионами Ca^{2+} и кальмодулином. В то время как гуанозин 5'-[$\beta\gamma$ -имидо]трифосфат, ГТФ, фторид натрия, холерный токсин и форсколин, являющиеся модуляторами животной трансмембранной АЦ, не активировали данный энзим. Авторы выявили некоторые молекулярные характеристики исследуемого фермента: стоксовский радиус 4,4 нм, коэффициент седиментации 4.1S. Существует альтернативная точка зрения, согласно которой у арабидопсиса и вероятно, у растений вообще рАЦ отсутствует (Roelofs, Van Haastert, 2002). Вероятно, подобное мнение сложилось по причине того, что у растений гены аденилатциклазы могут быть скрыты среди генов других белков, в частности, R-генов, которых у арабидопсиса насчитывается 200-300, а у риса – около 1500. На основании частичного сиквенса белка, полученного из пыльцы *Agapanthus umbellatus* и при его сравнении с полученными данными из библиотеки про кДНК кукурузы заключили, что наличие лейцин-обогащенной последовательности белка из пыльцы и Р-петли для связи с АТФ могут этот белок к рАЦ (Moutinho et al., 2001).

Поскольку АЦ растений является частью сигнальной системы, то ее

активность зависит от различных факторов окружающей среды (Pietrowska-Borek et al., 2014; Gehring, Turek, 2017). Показано, что низкая температура (Thomas et al., 2013), свет (Thomas et al., 2013), экзогенные фитогормоны (Di et al., 2015), а метаболиты грибов и бактерий оказывают весьма существенное влияние на изменение уровня эндогенного цАМФ (Cooke et al., 1994; Jiang et al., 2005), что является косвенным доказательством модуляции аденилатциклазной активности.

Имеется ряд экспериментальных статей, свидетельствующих о том, что растительная АЦ активируется под воздействием различных эффекторов патогенных бактерий и грибов. Так показано, что активность АЦ из клеток *Nicotiana benthamiana* повышалась при инфицировании *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, что существенно уменьшало количество симптомов программируемой клеточной смерти (Ito et al., 2014). Инокуляция *Phoma narcissi* тканей *Hippeastrum x hybridum* приводила не только к повышению концентрации цАМФ, но и увеличению транскрипционного уровня РНК АЦ. Авторы полагают, что это является одной из защитных реакций растений на нарушения целостности симпласта и апопласта (Swiezawska et al., 2014). Под воздействием РAMP *Pseudomonas syringae* в листьях *Arabidopsis* повышался уровень цАМФ, что способствовало развитию защитных реакций (Ma et al., 2013). Аналогичные результаты были получены при изучении действия элиситора из *Colletotrichum lindemuthianum* на суспензионную культуру клеток французских бобов (Bindschedler et al., 2001). В работе Jiang с коллегами (2005) показано, что увеличение уровня синтеза салициловой кислоты является следствием усиления активности АЦ в растениях арабидопсиса при инфицировании *Verticillium*, что может приводить к усилению защитных реакций растений (Jiang et al., 2005).

Помимо непосредственной модуляции с помощью рецепторов, связанных с G-белками, активность АЦ растений, так же как и АЦ животных (Sunahara, Taussig, 2002), может меняться под воздействием ионов кальция (Филинова и др., 2018; Ruzvidzo et al., 2013; Chatukuta et al., 2018).

Ферментом, переводящим цАМФ в неактивную нециклическую форму АМФ, является фосфодиэстераза (ФДЭ цАМФ, КФ 3.1.4.17). Растительная ФДЭ

имеет значительные отличия от аналогичного фермента животных и микроорганизмов (Выскребенцева, 1981). Во-первых, для ФДЭ растений характерен иной оптимум pH, во-вторых, в результате работы этого фермента образуется другой состав продуктов реакции: смесь 5'- и 3'-АМФ в соотношении 1:5, 1:2, 1:7 или даже 1:50 (Яворская, 1990). Кроме того, растительные ФДЭ, помимо 3',5'-цАМФ, также способны разлагать 2',3'-циклические нуклеотиды, таким образом принимая участие в деградации РНК.

1.2.3.2. Циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) - вторичный мессенджер аденилатциклазной сигнальной системы

Концентрация цАМФ в клетках растений имеет широкий диапазон от низких фемтомолярных до десятков микромолей, в зависимости от вида растения, а также от морфологии, фазы роста клеток, изменения режима питания и т. д. Кроме того, различия в концентрации этой молекулы зависят от метода и способа очистки препаратов (Яворская и др., 1984; 1990; Sharaf, Rooney, 1982; Cooke et al., 1994). Показано изменения уровня цАМФ в каллусной ткани табака и подсолнечника (Sharaf, Roney, 1982).

Из литературных данных известно, что одноклеточные и многоклеточные организмы способны регулировать содержание цАМФ путем его выделения в окружающую среду (Орлов, Максимова, 1999). Несмотря на то, что физиологическое значение данного явления неизвестно, предполагается, что цАМФ играет важную роль в межклеточных взаимодействиях (Ломоватская и др., 2004; Fehr et al., 1990).

В настоящее время вызывает интерес изучение физиологической роли цАМФ у растений. Установлено, что цАМФ участвует в регуляции различных процессов в растительных клетках, например, полирибосом, синтеза ряда ферментов, фитогормонов, нуклеиновых кислот, терпеноидов, бетацианиновых пигментов (Игуменов, Этингф, 1980). Выявлена роль цАМФ в процессе роста и реориентации пыльцевой трубки (Moutinho et al., 2001). В 1998 году D. Volotovski с соавторами зафиксировали повышение уровня цитозольного кальция в протопластах табака, зависимое от цАМФ и цГМФ (Volotovski et al., 1998).

Благодаря способности влиять на концентрацию свободного цитозольного кальция, цАМФ регулирует такие процессы, как, например, закрытие устьиц и разбухание протопластов (Curvetto et al., 1994). Также цАМФ с помощью цАМФ-зависимых протеинкиназ регулирует выход калия в клетках фасоли (Li et al., 1994).

Остается актуальным изучение роли цАМФ в защитных реакциях растений при биотическом стрессе. Сама по себе молекула цАМФ бактерицидными свойствами не обладает, однако способна оказывать влияние на активность защитных механизмов при контакте растения с патогеном. Например, за счет способности регулировать работу кальциевых каналов, зависимых от циклических нуклеотидов (Świeżawska-Boniecka et al., 2021), тем самым вызывая «кальциевую волну», передающую соответствующие сигналы в ядро клетки (Bose et al., 2011). Также продуцируемый под влиянием элиситоров цАМФ способен активировать протеинкиназы, которые, в свою очередь, фосфорилируют целевые белки – регуляторы экспрессии R-генов устойчивости (Volotovskii, 1998).

Известно, что при биотическом стрессе у растений наблюдается повышение уровня цАМФ, что говорит о его участии в передаче «сигнала тревоги» на другие системы клеток. На примере взаимодействия картофеля с экзополисахаридами возбудителя кольцевой гнили *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* показана динамика уровня цАМФ в зависимости от устойчивости сортов к данному фитопатогену. Так, у устойчивого сорта наблюдалось возрастание уровня цАМФ уже в первые минуты взаимодействия, в то время как у восприимчивого накопление данной молекулы происходило значительно медленнее (Ломоватская и др., 2010).

Малоизученным остается роль аденилатциклазной сигнальной системы и, в частности, цАМФ в процессах формирования бобово-ризобиального симбиоза. Большинство исследований проводились на более поздних этапах этого процесса. Например, была показана важная способность цАМФ-зависимого сигнального каскада модулировать степень инфекционной нагрузки ризобиями, а также восприимчивость растений к ней (Tian et al., 2012). Известно о повышенном

содержании цАМФ в симбиотических клубеньках по сравнению с листьями бобовых (Terakado et al., 2003). Также показана активация тАЦ и возрастание уровня цАМФ в стареющих бактериоидах (Catanese et al., 1989).

Также важным свойством АСС является способность влиять на МАР-киназный и кальциевый пути передачи сигнала (Świeżawska-Boniecka et al., 2021) благодаря способности цАМФ или цАМФ-зависимой протеинкиназы подавлять работу киназы киназы МАР-киназы, а также влиять на активность кальциевой сигнальной системы (Mishra et al., 2002).

1.2.4. Системный сигналинг

К настоящему моменту вызывает интерес изучение влияния одних сигнальных систем на другие. Так, показано влияние кальциевой сигнальной системы на НАДФН-оксидазную (Колупаев, Карпец, 2008; Максимов, 2010). Также показано, что кальциевый статус клеток оказывает значительное влияние на образование АФК (Колупаев, 2010). Причем, между Ca^{2+} и АФК существуют реципрокные взаимоотношения. Ионы кальция и АФК в растительных клетках также можно рассматривать в качестве ключевых компонентов единой сети, объединяющей другие сигнальные системы (Тарчевский, 2001; Колупаев, 2007а; Колупаев, Карпец, 2010). Также было показано, что способность пероксида водорода оказывать влияние на экспрессию гена каталазы происходит с участием кальция. Обработка пероксидом водорода приводит к открыванию Ca^{2+} каналов у растительных клеток, что важно в процессе передачи сигнала окислительного стресса и дальнейшей активации экспрессии гена каталазы (Ткачук, 2012).

Про существование межклеточных системных сигналов, возникающих у растений при стрессе, упоминалось в более ранний период (Enyedi et al., 1992). Одним из видов таких сигналов является изменение потенциала действия (ПД), который у растений способен быстро распространяться и связывать рецепторное распознавание сигналов с эффекторным ответом (Dziubinska et al., 2001). Потенциал действия обладает высокой надежностью и может играть важную роль на этапе неспецифического системного стресс-сигнала. Кроме того, ПД, вероятно, находится в тесной связи с другими сигнальными системами, в том числе с

аденилатциклазной (Воденеев и др., 2006).

1.2.5. Бобово-ризобиальный симбиоз

Известно, что растениям в процессе жизнедеятельности необходим такой химический элемент, как азот. Несмотря на большое содержание этого компонента в атмосфере и в почве, растения не способны его усваивать самостоятельно. Однако в процессе эволюции растения выработали способность вступать в азотфиксирующие симбиотические отношения с бактериями. Типичным примером азотфиксирующего симбиоза является взаимодействие растений из семейства бобовых с бактериями семейства *Rhizobiaceae*. В результате данного симбиоза на корнях растения развиваются специализированные органы – клубеньки (рис. 2), с помощью которых бобовые обеспечиваются азотом в форме NH_4^+ , а бактерии получают органические соединения, синтезируемые растением в ходе фотосинтеза.



Рисунок 2. Клубеньки на корнях бобовых.
(<https://udobreniya.net/wp-content/uploads/2018/05/1-12.06.12-.jpg>).

Процесс формирования азотфиксирующего симбиоза включает несколько стадий: преинфекция, инфекция, формирование клубенька, процесс азотфиксации в клубеньке, старение клубенька.

1.2.5.1. Адгезия и начальные стадии бобово-ризобиального симбиоза

Начальным этапом взаимодействия ризобий с бобовыми является стадия адгезии, на которых бактерии аттрагируются корневыми экссудатами, содержащими широкий спектр фенольных соединений. Изначально ризобии прикрепляются к поверхности корня бобовых неспецифически за счет ионных взаимодействий между поверхностями растительной и бактериальных клеток. При этом, важную роль в успешной колонизации клеток корня, а также в дальнейших процессах развития БРС, играют ризобиальные экзополисахариды (ЭПС) (Via et al., 2016). По литературным данным, дефектные по мукоидности мутантные штаммы *R. leguminosarum* слабо прикрепляются к корневым волоскам (Carlson, 1993), а лишенные ЭПС мутанты *R. meliloti* не формируют инфекционных нитей или образуют клубеньки без бактериоидов (Leigh et al., 1985).

Фенольные соединения из выделений корней бобовых могут выполнять функции сигнальных молекул в отношении ризобий (Макарова, Рудиковская, 2003; Овцына, Тихонович, 2004). В частности, нарингенин является сигнальной молекулой и выполняет функцию активатора экспрессии симбиотических *nod*-генов (*nodulation genes*) у бактерий рода *Rhizobium*. Причем на начальных этапах под влиянием нарингенина происходит экспрессия бактериального *nodD* гена, продуктом которого является NodD белок. Этот белок непосредственно связывается с флавоноидами (Овцына, Тихонович, 2004; Глянько, 2014; Downie, Johnston, 1986) и, далее, служит транскрипционным активатором для других бактериальных *nod*-генов (*nodABC*). Дальнейшая экспрессия *nodABC* приводит к синтезу ризобиальных Nod-факторов (NF) – специфичных молекул липохитоолигосахаридной природы (Кругова, 2009; Глянько, 2014; Downie, Johnston, 1986). Важно отметить, что структура и состав NF в дальнейшем определяет специфичность ризобий в отношении растения-хозяина (Хадри, Бисселинг, 2002; Maillet et al, 2011; Morieri et al, 2013). Помимо структуры, немаловажную роль играет и концентрация NF (Иванова, Цыганов, 2014; Gough, Cullimore, 2011).

1.2.5.2. Белки, распознающие Nod-факторы

Известно, что для распознавания хитиновых олигомеров, в том числе ризобияльных Nod-факторов (NF), бобовые используют сложные белковые комплексы – рецепторы NFR (Nod Factor Receptors), расположенные в эпидермальных клетках корня (Murray, 2011). Известно, что для узнавания микросимбионта NFR специфически связывают NF при физиологически значимых концентрациях последних (Broghammer et al., 2012) и инициируют сигнальный каскад, ведущий к запуску необходимых для дальнейшего развития симбиоза реакций (Bozsoki et al., 2017). Тем не менее, данных об их структуре, локализации в корне и функционировании NFR до сих пор мало.

В ранних исследованиях были предложены две гипотезы о механизмах распознавания NF. Первая предполагала наличие у бобовых одного рецептора, активность которого зависит от структуры NF (Hirsch, 1992). Согласно второй гипотезе, в распознавании NF принимает участие комплекс из двух рецепторов (Ardourel et al., 1994), один из которых (сигнальный) является низкоспецифичным к NF и способен вызывать деформацию корневых волосков, а также деление кортикальных клеток даже в отсутствии самих бактерий. Вторым рецептором (распознающий), напротив, проявляет высокую специфичность к NF, не функционирует в отсутствие ризобий и ответственен за формирование инфекционной нити и, далее, клубенька (Ardourel et al., 1994; Lhuissier et al., 2001).

В дальнейшем, у бобовых был выявлен уникальный класс белков-рецепторов, выполняющих роль NFR: лейцин-обогащенная рецептор-подобная киназа LRR-RLK (leucine-rich repeats receptor-like kinases), а также рецептор-подобная киназа, содержащая лизиновые мотивы во внеклеточном домене - LysM-RLK (lysin motive receptor-like kinases) (Ferguson et al., 2010; Gust et al., 2012). Существует мнение, что LRR-RLK необходима на начальных этапах формирования азотфиксирующего симбиоза при скручивании корневых волосков, а также образовании инфекционных нитей, в то время как LysM-RLK участвует в запуске сигнальных процессов, в результате которых уже происходит

формирование клубенька (Ferguson et al., 2010). В свою очередь, LysM-RLK кодируется генами *LYK3* и *SYM37*, индукция которых происходит на стадии проникновения ризобий в клетки корня бобовых. LysM-мотивы в составе данного рецептора служат для связывания группировок, содержащих N-ацилглюкозамин – корового компонента молекул хитина и NF (Долгих и др., 2010). Показано, что в *Lotus japonicus* была идентифицирована рецепторная LysM - киназа, EPR3, опосредующая прямое распознавание экзополисахаридов из совместимых ризобиальных штаммов (Gully, et al., 2016).

К настоящему моменту определены два семейства LysM-RLK: LYK, имеющие функциональный киназный домен (Arrighi et al., 2006; Lohmann et al., 2010), и LYR, у которых киназный домен отсутствует. Гомологи этих белков были найдены у различных видов бобовых (Кириенко и др., 2013). Так, представителем LYR у гороха *P. sativum* L. является белок PsSYM10, а LYK - PsSYM37 (Arrighi et al., 2006; Smit et al., 2007). При этом, на начальных стадиях распознавания NF участвует PsSYM10, а на стадии внедрения ризобий в ткани бобового важную роль играет PsSYM37. Причем PsSYM37 контролирует развитие инфекционного процесса зависимым от структуры NF образом (Zhukov et al., 2008).

Также вызывает интерес киназа *PsLYK9*, относящаяся к CERK1 (Chitin elicitor receptor kinase 1) -подобным рецепторам растений (Леппянен и др., 2016). Как известно, рецепторы CERK1 служат растениям для распознавания хитиновых олигосахаридов как патогенных, так и симбиотических организмов, контролируя развитие как защитных, так и симбиотических реакций. Причем, как было показано на *PsLYK9*, одним из важнейших регуляторов в способности отличать высокополимерные хитоолигосахариды патогенов от низкополимерных, характерных для симбионтов, является β -субъединица G-белка (Леппянен и др., 2018). Кроме того, известна роль данного вида киназ в устойчивости растений к *Pseudomonas syringae* (Gimenez-Ibanez et al., 2009), хотя соответствующий PAMP у данного патогена еще предстоит идентифицировать (Zhang et al., 2010).

Помимо рецептор-подобных киназ, в специфическом распознавании NF участвуют растительные лектины (агглютинины) (Bohlool, Schmidt, 1974), представляющие из себя особые углевод-связывающие белки. Как правило, лектины бобовых имеют схожее аминокислотное строение и свойства (Мельникова и др., 2009). Однако в литературе имеются данные о присутствии у некоторых видов бобовых нетипичных по структуре лектинов, обладающих дополнительной апиразной функцией (Roberts et al., 1999; 2013). Например, лектин-нуклеотид фосфогидролаза (Db-LNP), выявленная у бобового *Dolichos biflorus* (Etzler et al., 1999). По данным Etzler с соавт., Db-LNP преимущественно находятся на зарождающихся и молодых корневых волосках, а также на поверхности эпидермальных клеток корня в этих участках. Также данными авторами установлено, что уровень этого поверхностного белка уменьшается вдоль оси корня от области молодых корневых волосков до зоны созревания корневых волосков (Etzler et al., 1999). Кроме того, представляется интересным, что при инокуляции *Dolichos biflorus* ризобияльными штаммами происходило перераспределение Db-LNP к кончикам корневых волосков, чего не наблюдалось при заражении этого растения патогеном (Kalsi, Etzler, 2000).

При этом остается актуальным вопрос, каким образом бобовые отличают NF от хитиновых MAMP, характерных для патогенных грибов. Из литературных данных известно, что бобовые для рецепции хитиновых компонентов патогена используют отличные от симбиотических наборы LysM - рецепторов. Так, на примере CERK6 из *Lotus*, а также LYK9 и LYR4 из *Medicago* было показано, что эти белки ответственны за восприятие хитиновых олигомеров и индукцию защитных реакций в виде окислительного взрыва (Kelly et al., 2017). У мутантов *cerk6*, *lyk9* и *lyr4* наблюдается повышенная восприимчивость к патогенам, но сохраняется способность к неэффективной нодуляции, что говорит о том, что передача сигналов от хитиновых PAMP и NF этими рецепторами осуществляется отдельно. Также, было продемонстрировано, что белок Lys11 из *Lotus*, участвующий в распознавании симбионтов, специфически индуцировался во время формирования микоризы (Rasmussen et al., 2016), а при ризобияльном

симбиозе наблюдалась его сверхэкспрессия, которая восстанавливала способность к нодуляции у мутанта *nfr5* (Kelly et al., 2017).

Несмотря на наличие рецепторов, узконаправленных на распознавание либо симбионта, либо патогена, бобовые также могут обладать рецепторами, способными узнавать и различать как симбиотические NF и Мус-факторы, так и хитиновые олигомеры патогенных грибов. Например, у гороха имеется рецепторная киназа PsLYK9, способная распознавать низкополимерные Мус-факторы при формировании арбускулярной микоризы, а также олигомеры хитина с более высокой степенью полимеризации, характерные для грибов-патогенов (Леппянен, Долгих; 2015). Однако каким именно образом PsLYK9 отличает эти хитиновые олигомеры друг от друга, не установлено. Существует мнение, что данная киназа функционирует в комплексе с различными ко-рецепторами, выполняющими роль сигнальных регуляторов: β -субъединица G-белка, фосфолипаза C, аннексин D8, кальмодулин-зависимая киназа, протеинкиназа, взаимодействующая с кальцинерином В и т.д. У растений уже известны несколько G-белок-связанных рецепторов (Plakidou-Dymock et al., 1998; Hooley, 1999), а эксперименты, проведенные различными авторами, показали, что трансдукция NF сигнала опосредована гетеротримерными G-белками (Kelly, Irving, 2003). Также, по данным Леппянен с соавт. (2018), только при обработке Мус-факторами у гороха происходит увеличение синтеза β -субъединицы G-белка, в то время как при контакте с грибными патогенами этого не происходит (Леппянен и др., 2018).

1.2.5.3. Стадия инфицирования ризобиями

После распознавания NF, в клетках корней бобовых в течение нескольких минут возникает ряд ответных реакций, в частности деполяризация плазмалеммы корневых волосков (Ehrhardt, Atkinson, 1992; Felle et al., 1995), изменение транспорта ионов H^+ (Ehrhardt, 1996). Также NF индуцируют колебания кальция в клеточном ядре, которые являются отличительным признаком симбиотических сигналов на ранней стадии формирования симбиозов у различных видов бобовых

(*Pisum sativum*, *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus*) (Allen et al., 1994; Felle et al., 1995; Oldroyd, 2013).

Изменения, происходящие через несколько часов после распознавания растением NF, приводят к деформации корневых волосков (Kalsi, Etzler, 2000), их скручиванию в форме ручки зонтика, и делению клеток коры корня. Результатом этого становится формирование примордиев клубеньков (Цыганова, Цыганов, 2012; Turgeon, Bauer, 1982; Gage, 2004).

На следующей стадии инфицирования происходит непосредственное проникновение бактерий в ткани корневого волоска в месте сгиба. Важную роль при этом играют факторы вирулентности ризобий, аналогичные таковым у грамтрицательных фитопатогенов: третья и четвертая системы секреции, гидролитические ферменты, бактериальные полисахариды, МАР-соединения (ризобиальный флагеллин и грибной хитин). Ризобии проникают внутрь примордия посредством инфекционной нити – особой трубчатой структуры, окруженной клеточной стенкой и заполненной матриксом, состоящим в основном из арабиногалактанпротеинов – изкстензинов (Brewin, 2004). Большинство инфекционных нитей впоследствии абортируется (Vasse et al., 1993). Данный механизм срабатывает за счет избирательной способности растений инфицироваться определенными видами ризобий. Однако, в процессе эволюции ризобии выработали различные способы выживания в растительных тканях. В частности, некоторые виды ризобий способны блокировать защитные реакции растений с помощью NF, экзополисахаридов, а также специализированных белков, в частности NopL (nodulation protein L), блокирующего защитные системы растений (Zhang et al., 2011; Lehman, Long, 2013; Okazaki et al., 2013). Кроме того, некоторые виды ризобий ингибируют синтез этилена с помощью 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазы (D'Haese et al., 2003). Также не исключена способность клубеньковых бактерий снижать содержание активных форм кислорода (O_2^- и H_2O_2) в растительных тканях путем изменения активности супероксиддисмутазы и каталазы (Matamoros et al., 2003). Особо важную роль в подавлении иммунных механизмов растения играет липополисахаридный слой

ризобиальной клетки (Via et al., 2016). Есть данные о наличии у ризобий эффекторов, необходимых для подавления иммунных реакций у растения и передаче сигналов (Ratu et al., 2021).

Благодаря способности ризобий защищаться от иммунных ответов растений, из уцелевших и сформированных инфекционных нитей бактерии подвергаются эндоцитозу в местах истончения клеточной стенки, образуя так называемые инфекционные капли (Цыганова, Цыганов, 2012; Brewin, 2004). Учитывая, что имеется сходство между симбиотическими NF, хитином, и пептидогликаном, то представляет интерес вопрос, как растения контролируют запуск защитных или симбиотических реакций. Известно, что для распознавания грибных и ризобиальных симбионтов бобовые используют киназу LRR RLK (серинтреониновая рецепторная киназа с LRR-мотивом), которая необходима на начальных этапах формирования азотфиксирующего симбиоза при скручивании корневых волосков, а также формировании инфекционных нитей (Глянко, 2014; Ferguson et al., 2010; Gust et al., 2012). При запуске сигнальных процессов, приводящих к формированию клубенька, важную роль играет белок LysM (*lysine motive*) RLK, содержащий лизиновые мотивы во внеклеточном домене (Глянко, 2014; Ferguson et al., 2010; Gust et al., 2012; Kelly et al., 2017). LysM-мотивы в составе данного рецептора служат для связывания группировок, содержащих N-ацилглюкозамин – коровый компонент молекул хитина и NF (Долгих и др., 2010; Kelly et al., 2017). Важно отметить, что в *Lotus japonicus* была идентифицирована рецепторная LysM - киназа, EPR3, опосредующая прямое распознавание экзополисахаридов из совместимых ризобиальных штаммов (Gully et al., 2016). За синтез рецепторных белков отвечают симбиотические гены, получившие в литературе обозначение *Sym*. Эти гены также ответственны за запуск сигнального каскада при взаимодействии бобовых с ризобиями, а также регулируют процессы синтеза белков на уровне транскрипции в кортексе корня и в развивающихся клубеньках (Жуков и др., 2008).

На третьей стадии оказавшиеся в цитоплазме бактерии дифференцируются в бактериоиды – симбиотическую эндоплазматическую форму. Бактериоиды,

окруженные симбиосомной мембраной растительного происхождения, получили название симбиосом (Тихонович, 2007). Именно в данной форме бактерии способны восстанавливать молекулярный азот в аммонийную форму, используемую растениями. Со временем бактериоиды и сами клубеньки подвергаются старению и дегенерации, в связи с чем прекращается их азотфиксирующая активность (Серова, Цыганов, 2014).

1.2.5.4. Чувствительность корней бобовых к ризобияльной инфекции

Из ранних литературных источников известно, что у большинства бобовых наиболее восприимчивыми к инфицированию ризобиями являются участки корня, находящиеся между зоной растяжения и зоной зачатков корневых волосков (Акимова и др., 2002; Макарова и др., 2004; Макарова, Нурминский, 2005).

Так, на примере симбиоза между горохом посевным *Pisum sativum* и бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (*Rlv*) Г. П. Акимовой с соавторами (2002) было показано, что максимальное проникновение ризобий происходит на участке 5-15 мм от кончика корня (Акимова и др., 2002). Позднее, Г. Г. Васильевой с соавт. (2007) были исследованы различия между отдельными участками корня проростков гороха по способности *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* и *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*) вызывать образование АФК. Было показано, что при заражении *Psp* уже через час инкубирования происходило повышение концентрации O_2^- во всем корне и эпикотиле. А при контакте с ризобиями уровень O_2^- лишь незначительно повышался, причем только в эпикотиле, несмотря на то, что этот орган у растений невосприимчив к проникновению ризобий. При этом содержание H_2O_2 и активность растворимой пероксидазы при инокуляции ризобиями в невосприимчивых к ним зонах увеличивались, в то время как в восприимчивых – снижались (Васильева и др., 2007а, б; Глянько и др., 2007). Как предполагают авторы, данные различия в распределении АФК по участкам корня проростков гороха, отличных по восприимчивости к инфекции, обусловлены возможностью растений

препятствовать заражению патогеном и избирательно контролировать инфицирование мутуалистом определенных органов.

1.2.6. Взаимодействие растений с патогенными бактериями

1.2.6.1. Адгезия патогенов на ранних этапах растительно-микробных взаимодействий

Инфекционное заболевание растений представляет собой сложный молекулярный диалог с микроорганизмами, который начинается со стадии неспецифической адгезии микроорганизмов на растительных поверхностях.

Первичная адгезия бактерий включает в себя несколько стадий и зависит как от некоторых особенностей поверхности растительных клеток, так и от поверхностных и структурных детерминант бактерий (Серегина и др., 2008).

Ионные взаимодействия имеют важное значение на первом этапе адгезии. Известно, что растительные и бактериальные поверхности несут сеть отрицательных зарядов. По этой причине микробные клетки преодолевают его путем связывания соответствующих химических групп поверхностей между собой с помощью ионных и водородных связей, двухвалентных катионов, а также Вандерваальсовы силы (Romantschuk, 1992).

Кроме того, бактерии для прикрепления используют специальные структуры, такие как филаментные образования типа фимбрий и пилей. Фимбрии и пили представляют собой белковые нежгутиковые образования размерами от 0,2 до 20 мкм в длину и 3-14 нм в толщину. Состоят из спирально расположенных субъединиц основных белков размерами от 9 до 22 кД. Установлено семь типов фимбрий, однако в растительной адгезии могут принимать участие фимбрии 3-го типа с диаметром 70 Å. На конце филаментов локализованы минорные субъединицы, одна из которых функционирует в качестве адгезина, взаимодействующего с рецепторами на поверхности клетки. Фимбриальные адгезины обладают высокой углевод-связывающей специфичностью. На ультраструктурном уровне фимбрии часто выглядят как более короткие и более жесткие отростки, чем пили, которые обычно присутствуют в гораздо меньшем количестве на поверхности бактериальной клетки. Также, в первичной адгезии

участвуют целлюлозные фибриллы, присутствие которых приводит к индукции больших бактериальных кластеров, как было показано на агробактериях и ризобиях. Мутанты *Azotobacter tumefaciens*, лишенные целлюлозы, не способны образовывать большие бактериальные кластеры, хотя еще могут индивидуально связываться с растительными клетками (Matthysse, 1983). Целлюлозные фибриллы агробактерий могут индуцироваться только в присутствии растительной клетки, тогда как у ризобий они образуются постоянно (Smit et al., 1987). Еще одним немаловажным фактором, способствующим закреплению бактерий на растительной поверхности, являются кальцийзависимые белки, представителем которых является рикадгезин (Dazzo et al., 1984; Smit et al., 1987). Для симбионта гороха *Rhizobium leguminosarum* также характерен специфический белок RAPA 1, относящийся к семейству Rap-белков, способствующий адгезии бактерий к поверхности корневых волосков (Нигматуллина, 2015).

Также важную роль в способности фитопатогенов колонизировать поверхность растений играют бактериальные экзополисахариды (ЭПС). По химическому составу ЭПС могут быть гомополисахаридами (состоящими из однотипного сахара) или гетерополисахаридами (которые состоят из смеси комплексов сахаров в повторяющихся субъединицах) (Denny, 1995; Wang et al., 2006). Считается, что фитопатогенные бактерии, синтезирующие ЭПС, вызывают увядание (вилт) растений. В частности, это происходит из-за образования эмбол (Меликова, Горшков, 2016), закупоривающий сосуды растений. Известно, что бактерии, утратившие способность продуцировать ЭПС и изменять морфологию колоний, становятся авирулентными, теряют способность индуцировать реакцию сверхчувствительности на листьях табака. Также у них наблюдается снижение активности гидролитических ферментов, например, целлюлазы, увеличение подвижности, и др. (Желдакова, Мямин, 2005).

1.2.6.2. Элиситоры и супрессоры бактерий

Среди разнообразных метаболитов патогенов присутствуют как вещества-индукторы защитных реакций растений, элиситоры (Дмитриев, 2003; Соколов,

2014), так и молекулы, подавляющие фитоиммунитет, супрессоры. В роли элиситоров могут выступать некоторые метаболиты патогенов, например, секретлируемые полисахариды, гликопротеины, харпины и липополисахариды (Карпун и др., 2015).

Кроме того, элиситоры представлены фрагментами клеточных стенок растений, а также продуктами их гидролиза (эндогенные элиситоры). К ним относятся локализованные в клеточной стенке гидроксипролин-богатые белки, лектины, ферменты (хитиназы, глюканы, протеазы).

Деполимеразы клеточных стенок как грибов, так и растений сначала образуют более крупные фрагменты гидролиза, обладающие элиситорной активностью (олигосахарины), а затем эти продукты могут «дробиться» на мелкие части с выраженными супрессорными свойствами. Примерами таких супрессоров могут быть пектиназы, полигалактуроназы; а также различные токсины: вивотоксины (табтоксин, фазеолотоксин, тентоксин); мембраноактивные вещества (коронатин, сирингомицин), генераторы активных форм кислорода (пренилированные хиноны), а также ингибиторы синтеза белка (трихотиценовые токсины) (Gowthami, 2018). Чтобы избежать подавления защитных реакций, клетки растений продуцируют ингибиторы (белки, гликопротеины) деполимераз клеточных стенок.

В настоящее время некоторые элиситоры научились синтезировать искусственно (например, арахидоновую кислоту, продуцируемую фитофторой) и использовать в качестве стимуляторов иммунного ответа у растения-хозяина, в данном случае, картофеля (Gowthami, 2018).

1.2.7. Род *Pseudomonas*

Род *Pseudomonas* включает в себя патогенов животных, фитопатогенов, а также сапрофитов. Такое разнообразие рода *Pseudomonas* обусловлено его геномом, состоящим из одной большой кольцевой хромосомы с различными переменными регионами с высокой степенью пластичности (Kahlon, 2016).

Вид *Pseudomonas syringae* включает в себя фитопатогенов и классифицирован, по крайней мере, в 50 патоваров на основании разновидностей

растения-хозяина и признаков заболевания (Ichinose et al, 2013).

Pseudomonas syringae представляют собой слабо подвижные палочки (монотрихи), передвигающиеся посредством полярного жгутика, размером 0.6-0.8 × 1.1-3.2 мкм. Располагаются одиночно, попарно, цепочками или нитями. Спор и капсул не имеют, не кислотоустойчивые (Лазарев и др., 2015). Являются типичными представителями грамотрицательных бактерий. Наружная мембрана псевдомонад имеет асимметричную структуру, в которой внутренний слой состоит из фосфолипидов, аналогичных липидам двойной многослойной внутренней мембраны. Внешний слой состоит из липополисахарида, имеющего три субъединицы: гликолипида, липида А, который удерживает его в правильном положении, и основного полисахарида, который образует связь между липидом А и О-антигеном, который экспонирован наружу. Уникальность этих бактерий заключается в том, что они способны модулировать экспрессию генов в ответ на широкий диапазон условий окружающей среды, что обеспечивает необходимые им адаптации. Бактерии вида *Pseudomonas syringae* имеют ряд факторов вирулентности, таких как фитотоксины, сидерофоры, адгезины, внеклеточные полисахариды, пектолитические ферменты и другие эффекторные молекулы. Обладают системой секреции третьего типа, аналогичной с *Pseudomonas aeruginosa*, для введения нескольких эффекторных белков в клетки растения-хозяина и взаимодействия с белками-мишенями, а также для подавления механизмов фитоиммунитета и управления гормонами растений и/или индукции гибели клеток (Cunnac, 2009; Kahlon, 2016). Геном *Pseudomonas syringae* кодирует 57 семейств эффекторных белков, вводимых системой секреции третьего типа. *Pseudomonas syringae* продуцирует, главным образом, четыре токсина: коронатин, табтоксин, фазеолотоксин и липодепсинапептиды (сирингомицин и сирингопептин). Все токсины способствуют развитию хлороза или некрозов, а коронатин и фазеолотоксин способствуют распространению бактерий по растению. Коронатин производится многими патоварами *Pseudomonas syringae* и проявляет неспецифичность в отношении хозяина (Firdous, 2013).

У филогенетически различных штаммов присутствует набор эффекторов,

необходимых для процессов узнавания растения-хозяина (Lindeberg, 2012).

Немаловажным свойством бактерий *Pseudomonas syringae* является их способность синтезировать некоторые растительные гормоны, такие как этилен и абсцизовая кислота. Причем интенсивность синтеза этих гормонов различна среди патоваров и штаммов этих бактерий (Данкевич, 2013).

Из литературных данных известно, что *Pseudomonas syringae* имеет ферменты, инактивирующие АФК, продуцируемые растением, тем самым влияя на процессы окисления-восстановления в растительной клетке. Бактериальные супероксиддисмутаза и щелочная гидропероксидаза в состоянии облегчить окислительный взрыв, детоксифицируя АФК (Bile et al., 2014).

Типичным представителем рода *Pseudomonas syringae* является возбудитель бактериального ожога листа гороха - *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (рис. 3).



Рисунок 3. Горох, зараженный *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*
(http://www.croppro.com.au/crop_disease_manual/media/Figure%207_6%20Water%20soaked%20lesion%20spreading%20Bacterial%20blight_1000.jpg)

Бактериальный ожог листа гороха является широко распространенным заболеванием, причиняющим наибольший ущерб на территориях с влажным теплым климатом. Возбудителем данного заболевания является грамотрицательная бактерия *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*) (Martin-Sanz et al., 2012).

Pseudomonas syringae pv. *pisii* поражает стебли, черешки, листья, прилистники и бобы. Заражение происходит, как правило, через устьица или поранения. Затем под эпидермисом в паренхиме происходит размножение бактерий и их дальнейшее распространение по тканям. Когда инфекция достигает сосудистых пучков, наблюдается увядание растения. Внешне инфекция выглядит как темно-зеленые водянистые пятна на листьях, обычно с более темной серединой. На семенах очаги инфекции *Psp* выглядят как округлые желтые пятна (Лазарев и др., 2015).

1.2.8. *Clavibacter sepedonicus*

Бактерии рода *Clavibacter* вызывают серьезные инфекционные заболевания у широкого круга сельскохозяйственных культур. Единственный вид в составе данного рода, *Clavibacter michiganensis*, в зависимости от растения-хозяина и симптомов заболевания, разделяется на шесть подвигов: *Clavibacter michiganensis* spp. *michiganensis* – возбудитель бактериального рака у томатов; *C. michiganensis* spp. *sepedonicus* (*C. sepedonicus*), вызывающий кольцевую гниль у картофеля (рис. 4); *C. michiganensis* spp. *nebraskensis* – возбудитель вилта кукурузы; *C. michiganensis* spp. *tessellarius* – бактериальная мозаика у пшеницы; *C. michiganensis* spp. *insidiosus*, вызывающий увядание и остановку роста люцерны (Перфильева и др., 2013), а также *Clavibacter michiganensis* spp. *phaseoli subsp. nov.*, патоген бобов (Gonzalez, Trapiello, 2014).

Бактерии *C. sepedonicus* (*Cs*), как и все представители рода *Clavibacter*, представляют собой короткие прямые или слабоизогнутые палочки с округлыми краями размером 0.5-1 мкм. Могут располагаться поодиночно или соединяться попарно, либо в короткие цепочки. Аэробы. Лишены жгутиков, споры не образуют (Перфильева и др., 2013).

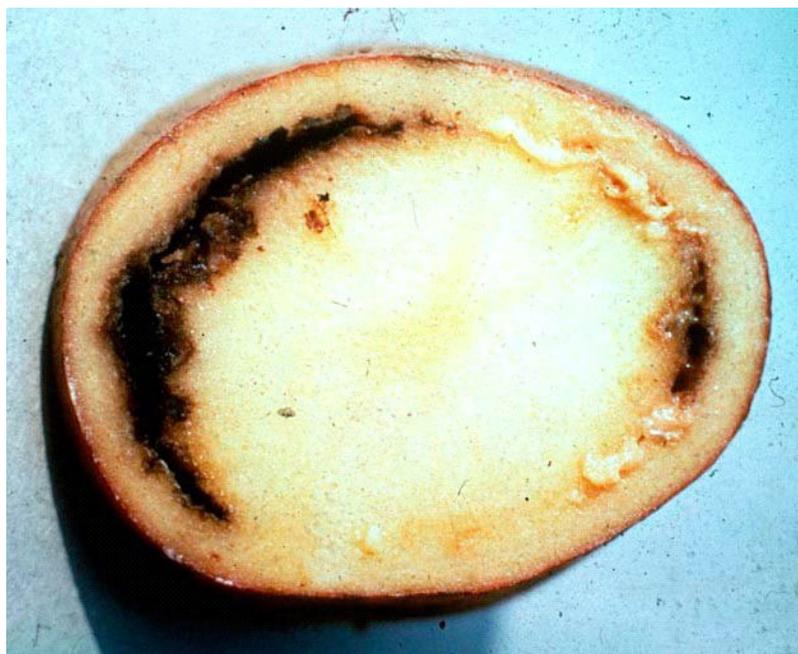


Рисунок 4. Клубень картофеля, инфицированный *Clavibacter sepedonicus* (<https://agroflora.ru/wp-content/uploads/2014/07/kolcevaya-gnil-kartofelia.jpg>)

Бактерии *Cs* (рис. 4) являются биотрофными фитопатогенами. По литературным данным *Cs* способны непродолжительное время существовать в свободном состоянии в почве в условиях теплой погоды с низкой влажностью. Заражение растений *Cs* происходит через поранения или при использовании непродезинфицированного инвентаря. Также существует мнение о способности данных бактерий инфицировать растение через листья (Романенко и др., 2002; Перфильева и др., 2013).

При инфицировании бактерии проникают в ксилему, где образуют особые структуры, несколько отличные от биопленок, так называемые эмболы, которые вызывают закупорку сосудов, и, в дальнейшем, увядание и вилт растения картофеля (Меликова, Горшков, 2016). На ранних этапах развития инфекции, вызванной *Cs*, возникает скрытая форма, так как симптомы заболевания развиваются медленно. По этой причине на данной стадии развития болезнь сложно диагностировать и контролировать. В скрытой форме инфекция может протекать в течение нескольких лет культивирования, способствуя тем самым распространению болезни. Интенсивность заражения картофеля кольцевой гнилью и развитие заболевания зависит от штамма бактерий и заражающей дозы, а также от сорта картофеля (Pietraszko et al., 2018).

На латентной стадии развития заболевания у верхнего побега желтеют листья и появляются темные пятна. Далее, патоген проникает в корни и клубни, вызывая размягчение тканей. Внешне очаг инфекции выглядит как кольцо, содержащее желтоватую лизированную массу (Перфильева и др., 2013).

Важными факторами вирулентности *Cs* являются экстраклеточные ферменты, такие как целлюлаза, пектиназа и амилаза (Шафикова и др., 2009; Ваер, Gudmestad, 1995).

Целлюлаза и пектиназа служат для облегчения проникновения бактерии внутрь растительной клетки а начальном этапе патогенеза Амилаза необходима для расщепление крахмала до сахаров, которые являются источником питания для самих бактерий на более поздних стадиях патогенеза (Metzler et al., 1997). По литературным данным, в мукоидном слое *Cs* также обнаружены протеолитические ферменты и термостабильный эффекторный белок (Шафикова и др., 2009; Омеличкина и др., 2017).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования служили трехсуточные проростки гороха (*Pisum sativum*, сорт Рондо) и планктонные культуры *Rhizobium leguminosarum* bv.vicea (*Rlv*) (эффективный по азотфиксации штамм RCAM 1022, неэффективные высококонкурентные штаммы RCAM 1064 и RCAM 1065), *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*) (вирулентный штамм 1845) и *Clavibacter sepedonicus* (*Cs*) (вирулентный, мукоидный штамм 6889). Штаммы *Rlv* были получены из Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ФГБНУ Всероссийского научно-исследовательского института сельского хозяйства, штамм *Psp* был получен из ФГБНУ Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии, штамм *Cs* получен из Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору г. Москва.

2.2. Проращивание гороха и инокуляция проростков бактериями

Семена гороха с. Рондо последовательно стерилизовали путем промыва в течение 30 мин в 94% этаноле, 5 мин в 3% перексиде водорода и 5 мин в 5% растворе перманганата калия. На конечном этапе отмывали стерильной водой и

замачивали в воде (56°С) на 4 часа. Затем семена проращивали в стерильных чашках Петри на увлажненной фильтровальной бумаге в течение 3 суток в темноте при 23-25°С. Далее проростки, имеющие длину корня примерно 35-40 мм, промывали стерильным 0.01% раствором нонидета (неионный детергент) для предотвращения попадания экзогенной микрофлоры, отмывали трижды стерильной дистиллированной водой и инокулировали одной из культур бактерий, находящихся на стационарной фазе роста. Для этого использовали суспензию бактерий с титром 10^7 кл./мл (Кузакова и др., 2019).

2.3. Культивирование бактерий

Бактериальные культуры выращивали в колбах на жидкой среде, содержащей для *Rlv* и *Psp* просветленный гороховый отвар, для *Cs* – 10 г/л диализата дрожжевого экстракта. Для всех культур добавляли 15 г/л глюкозы, рН 7.0. Титр планктонной культуры бактерий определяли на планшетном спектрофотометре «АИФР-01 Униплан» (ФГУП Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений, Москва) при длине волны 655 нм (Кузакова и др., 2019).

2.4. Определение интенсивности адгезии бактерий

После окончания инкубации корней проростков с соответствующими видами бактерий корни отделяли от горошины, промывали в стерильном 0.01% растворе нонидета (детергента) для удаления слабосвязанных бактерий и промывали трижды в стерильной воде. Затем, как было предложено ранее (Макарова, Нурминский, 2005), на основании данных световой микроскопии нарезали на отрезки: I – меристема, 2 мм; II – зона без корневых волосков, 2-7 мм; III – зона, содержащая зачатки корневых волосков, 7-12 мм; IV – зона молодых корневых волосков, 12-17 мм; V – зона закончивших рост корневых волосков, 17-22 мм от кончика корня (рис. 5) (Акимова и др., 2004; Ломоватская и др., 2018). Каждый образец растирали в стерильной воде, после чего делали серии разведений гомогената для получения рассеянного посева на чашки Петри с агаризованной средой, аналогичной по составу жидкой среде культивирования бактерий. Через 3

суток подсчитывали колониобразующие единицы (КОЕ). В экспериментах использовали по 10 проростков.

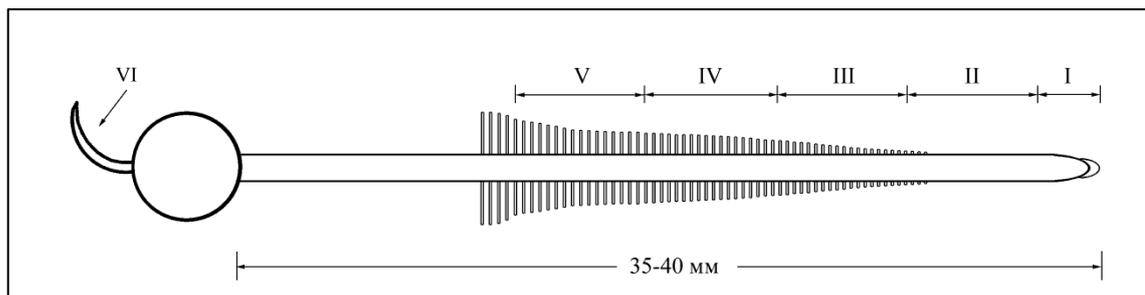


Рисунок 5. Схема деления проростков гороха на участки, составленная на основании литературных данных (Макарова, Нурминский, 2005; Но, 1994). I — меристема (0-2 мм); II — участок, содержащий зачатки корневых волосков — 2-7 мм; III — зона молодых корневых волосков — 7-12 мм; IV — зона сформированных корневых волосков — 12-17 мм; V — зона старых корневых волосков — 17-22 мм; VI — эпикотиль.

2.5. Инкубация проростков гороха с *n*-бутирил-цАМФ

Для увеличения внутриклеточного уровня цАМФ в корнях проростков гороха, эти проростки инкубировали 10 мин с различными концентрациями *n*-бутирил-цАМФ (5/10/30/50 нМ). После окончания экспозиции проростки промывали водой и, в одном варианте опыта сразу анализировали содержание эндогенного H_2O_2 , в другом корни проростков инкубировали еще 5 мин с одной из культур бактерий (Ломоватская и др., 2020).

Во всех случаях корни делили на вышеупомянутые зоны и в каждой из них определяли концентрацию внутриклеточного H_2O_2 и цАМФ.

Влияние *n*-бутирил-цАМФ (опыт) оценивали, сравнивая с соответствующим результатом у проростков, экспонированных на воде (контроль). В случае *n*-бутирил-цАМФ + бактерии (опыт) в качестве контроля служил вариант с соответствующей концентрацией *n*-бутирил-цАМФ (без бактерий) (Ломоватская и др., 2020).

2.6. Инкубация проростков гороха с сурамином

Для уменьшения концентрации внутриклеточного цАМФ проростки гороха на 30 мин помещали в 800 мкМ раствор сурамина, ингибитора трансмембранной аденилатциклазы (Шпаков и др., 2008), приготовленный на 0.3% растворе диметилсульфоксида (для облегчения проникновения). Далее проростки

отмывали водой и в первом случае сразу использовали для определения концентрации пероксида водорода и цАМФ, во втором случае 5 мин инкубировали с суспензией одного из видов бактерий, а затем делили на зоны и проводили анализ на содержание эндогенного H_2O_2 и цАМФ. Результаты выражали в процентах к контролю. Влияние сурамина (опыт) определяли, сравнивая с соответствующим результатом у проростков, экспонированных на воде (контроль); последовательное влияние сурамина + бактерии (опыт) – принимая за контроль вариант “сурамин” без бактерий (Ломоватская и др., 2020).

2.7. Определение активности компонентов аденилатциклазной сигнальной системы

Для определения активности компонентов аденилатциклазной сигнальной системы корни проростков (после коинкубации с бактериями и отмывания) фиксировали в жидком азоте, разрезали на соответствующие отрезки, которые затем растирали в среде выделения следующего состава: 0.02 М фосфатный буфер, рН 7.2; 10 мМ теофиллин (ингибитор 3',5'-цАМФ фосфодиэстеразы); 1 мМ дитиотрейтол; 10 мкг/мл фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ, ингибитор протеаз); 50 мкг/мл гидроксимеркурийбензоат (ГМБ, ингибитор протеаз); 1 мкг/мл лейпептин (ингибитор протеаз). Гомогенат центрифугировали при 16 000 g в течение 20 мин (“Allegra 64 R”). Полученный супернатант центрифугировали при 105 000 g 90 мин (“Sorvall Discovery 90 SE”). Осадок был примерно на 75% обогащен плазмалеммой, в нем определяли активность трансмембранной аденилатциклазы (тАЦ), в супернатанте, свободном от мембран – активность растворимой аденилатциклазы (рАЦ) и концентрацию цАМФ. Образцы для определения цАМФ нагревали до 100°C в течение 3 мин для инактивации ферментов (Ломоватская и др., 2018).

2.7.1. Определение активности тАЦ и рАЦ

Реакцию начинали с внесения растительного образца в количестве 100-150 мкг белка/г сырой массы в 500 мкл инкубационной среды в пробирки типа Эппендорф: 50 мМ трис-НСl, рН 7.2, 0.1 мМ теофиллин, 1 мМ дитиотрейтол, 0.5 мМ АТФ (“Sigma”, США). В пробы, содержащие осадок, добавляли 3 мМ

MgSO₄ («Реахим» Россия) в качестве кофактора тАЦ, а в пробы, содержащие супернатант для активации рАЦ добавляли 3 мМ MnCl₂ («Реахим», Россия) – для активации рАЦ. Реакцию проводили при 27°С в течение 30 мин и останавливали кипячением в течении 3 мин на водяной бане. Об активности обеих форм аденилатциклазы судили по концентрации цАМФ в пробе, которую рассчитывали по калибровочной кривой и выражали в нМ цАМФ/мг белка в мин. Количество цАМФ определяли иммуноферментным анализом (ELISA) (Ломоватская и др., 2018).

2.7.2. Очистка образцов от примесей других циклических нуклеотидов с помощью нейтральной окиси алюминия

Нейтральным оксидом алюминия заполняли колонку толщиной слоя 1 см³, затем уравнивали буфером для выделения. После этого наносили 1 мл раствора, содержащий супернатант или осадок. Осадок ресуспендировали в буфере для выделения, состав которого приведен выше. Элюирование проводили тем же буфером. Анализ спектра веществ осуществляли с помощью хроматографического оборудования (“Uvicord”, Швеция), при длине волны 276 нм. Стандартами служили аденозин, 5'-АМФ, цАМФ, цГМФ, цТМФ, цЦМФ (“Sigma”, США) в концентрации 100 пМ. Следует отметить, что элюирование цАМФ проходило раньше других соединений. Его можно было обнаружить во втором миллилитре элюата, что соответствовало литературными данными (White, Zenser, 1971). Общий объем элюата составлял около 8 мл. Далее элюат упаривали на ротаторном испарителе (Rotavapor® R-300), сухой остаток растворяли в 100% диметилсульфоксиде («Реахим», Россия). Затем центрифугировали при 20000g в течение 5 мин. Диметилсульфоксид из осадка удаляли ацетоном («Экос-1», Россия). Пробу высушивали на воздухе при комнатной температуре. Количество цАМФ определяли с помощью иммуноферментного анализа (Ломоватская и др., 2005).

2.7.3. Иммуноферментный анализ (ИФА)

Анализ начинали с иммобилизации антигена на поверхности планшета. С этой целью в лунки полистироловых планшетов для ИФА («Ленинградский

ЗМП», Россия, ТУ 64-2-278-79) вносили по 0.1 мл смеси следующего состава: 1 мл исследуемого образца + 0,08 мл 25%-ного глутарового альдегида («Sigma», США) + 1 мг/мл БСА («Sigma», США). Планшеты инкубировали 15 часов при 37°C и лунки трижды промывали буфером ФТБС (0.02 М Na-фосфатный буфер, 0.1 М NaCl («Реахим», Россия), 0.3 % Твин-20 («Ferak», Германия), pH 7.0). Затем для предотвращения неспецифического связывания антител с твердым носителем в каждую лунку добавляли по 0.1 мл лошадиной сыворотки («Аллерген», Россия), разведенной 1:10 ФБС (ФТБС без твина) и планшеты выдерживали 1 ч при 37°C. После этого в лунки вносили по 0.1 мл первичных кроличьих антител, специфичных против цАМФ («Sigma», США), разведенных в ФБС (в соотношении 1:10000). Материал инкубировали 2 ч при 37°C и промывали трижды ФТБС. Затем повторяли обработку образцов лошадиной сывороткой. Далее в лунки вносили по 0.1 мл меченых пероксидазой вторичных козьих антител («Sigma», США), разведенных в 0.1 М карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 8.3) и через 1 ч инкубации при комнатной температуре отмывали трижды ФТБС. После этого осуществляли трехразовое промывание лунок планшетов 0.1 М фосфатно-цитратным буфером (pH 5.6) для удаления детергента, создающего высокий фон неспецифического окрашивания. Затем в каждую лунку добавляли 0.1 мл 0.16% ортофенилендиамина («Sigma», США), растворенного в фосфатно-цитратном буфере pH 5.3 и 3 мкл 3% пероксида водорода. Реакция на пероксидазу развивалась в течение 20 мин. Её останавливали с помощью 4 N серной кислоты («Реахим», Россия), 100 мкл/на лунку. Интенсивность поглощения света определяли на планшетном спектрофотометре «АИФР-01 Униплан» (ФГУП Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений, Москва) при длине волны 490 нм. Контролем служил буфер для выделения без растительных образцов. Калибровочную кривую строили, используя разные концентрации цАМФ («Sigma», США). За нижний предел чувствительности описанного выше метода брали 10 пМоль цАМФ на одну пробу (Ломоватская и др., 2005; 2018).

2.8. Определение влияния пероксида водорода на активность трансмембранной (тАЦ) и «растворимой» (рАЦ) аденилатциклазы из клеток корня проростков гороха

Для исследования использовали целые корни проростков гороха. Контролем служили проростки, экспонированные на воде, тогда как опытным вариантом служили проростки, инокулированные в течение 5 мин одним из видов бактерий.

Гомогенизацию отсеченных корней проводили по стандартной вышеприведенной схеме (п. 2.6). Далее к растительным образцам, содержащим рАЦ / тАЦ, включающим 100-150 мкг белка /г сырой массы в 500 мкл инкубационной среды, состав которой приведен выше (п. 2.6.1.), добавляли H_2O_2 в конечной концентрации 100 нМ / 260 нМ / 2.6 мкМ /26 мкМ. Реакцию проводили при 27°C в течение 30 мин, затем останавливали кипячением в течение 3 мин на водяной бане.

Содержание цАМФ в клетках корня проростков гороха выражали в нМ цАМФ/мг белка. Белок в пробе определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

2.9. Определение концентрации пероксида водорода в корнях проростков гороха

Концентрацию эндогенного H_2O_2 определяли в гомогенате отрезков корней проростков гороха FOX-методом, основанном на изменении окраски ксиленолового оранжевого (Galletti et al., 2008). Для этого использовали реакционную среду, состоящую, из двух растворов. Раствор 1: 25мМ $FeSO_4$; 25мМ $(NH_4)_2SO_4$; 2.5М H_2SO_4 . Раствор 2 включал 125 мкМ ксиленола оранжевого и 100 мМ сорбита. Растворы 1 и 2 смешивали непосредственно перед анализом в пропорции 1:100, соответственно. Затем к растительному образцу добавляли полученную смесь в пропорции 1:10, соответственно, и инкубировали 30 мин в темноте, после чего измеряли концентрацию пероксида водорода на планшетном спектрофотометре «АИФР-01 Униплан» (ФГУП Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений, Москва) при длине волны 595 нм. Концентрацию пероксида водорода выражали в нМоль на мг белка.

Для анализа использовали 1 г корней проростков гороха. Калибровочную кривую строили по различным концентрациям пероксида водорода (Кузакова и др., 2019). Концентрацию пероксида водорода выражали в относительных единицах, нМоль H_2O_2 на мг белка. Для анализа использовали 1 г корней проростков гороха. Калибровочную кривую строили, используя разные концентрации пероксида водорода (Кузакова и др., 2019).

2.10. Статистическая обработка данных

Исследования проводили в 3 биологических повторностях. Определение КОЕ бактерий проводили в 4 аналитических повторностях, биохимические анализы (определение концентрации цАМФ и H_2O_2 , активности тАЦ и рАЦ) в 8 аналитических повторностях.

Для статистической обработки результатов использовали программу Sigma-Plot, с помощью которой вычисляли общепринятые показатели: среднее арифметическое значение, среднее квадратическое отклонение, однофакторный дисперсионный анализ для независимых выборок, критерии Ньюмена-Кейсла (q) и Даннета (q'), коэффициент корреляции (r). Значимость различий между вариантами опыта (P) при числе степеней свободы $n' = n - 1$, где n – количество биологических повторностей эксперимента (Ильин, 2011; Гланц, 1999). Графики и диаграммы построены с помощью пакета программ Microsoft Excel. На графиках приведены средние значения и среднеквадратическое отклонение.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Особенности адгезии патогенов *P. syringae* pv. *pisi* и *C. sepedonicus*, а также штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae*, отличающихся по эффективности симбиоза на различных участках корня проростков гороха

Особенностью бобовых является то, что не весь корень проростков обладает восприимчивостью к ризобиям, а только его отдельные участки, отличающиеся по степени сформированности корневых волосков, т.е. присутствию на них зачатков, молодых или зрелых корневых волосков (Но et al., 1994). В настоящей работе на основании данных световой микроскопии с привлечением литературных данных (Макарова, Нурминский, 2005) первичный корень проростка гороха длиной 35-40 мм делили на пять участков в соответствии со схемой, представленной на рис. 5 раздела 2.4. и исследовали на них интенсивность адгезии следующих видов бактерий: *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (*Rlv*) – симбиотического азотфиксатора, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*) – возбудителя бактериального ожога гороха, *Clavibacter sepedonicus* (*Cs*) – бактериального возбудителя кольцевой гнили картофеля. Причем *Rlv* были представлены тремя штаммами: 1022 – эффективный по азотфиксации, 1064 и 1065 – неэффективные по этому показателю и конкурентноспособные по инфицированию (Паспорт бактериальной культуры ВКМ).

Чтобы выявить различия между адгезией симбиотических азотфиксаторов и фитопатогенами на ранних этапах взаимодействия с корнем проростков гороха, интенсивность этого процесса у эффективного штамма *Rlv* 1022, а также патогенов *Psp* и *Cs* в различных участках корня проростков гороха исследовали через 5, 15, 120 и 360 минут инокуляции.

Проведенные исследования показали, что через 5 мин инкубации наибольшее количество колониеобразующих единиц (КОЕ) *Rlv* (штамм 1022) наблюдалось в III, IV и V зонах роста корня (рис. 6). Через 15 мин интенсивность адгезии в тех же зонах возрастала, а заметное количество КОЕ наблюдалось и во II зоне, содержащей зачатки корневых волосков. Через 120 мин интенсивность этого процесса продолжала возрастать, в наибольшей степени в зоне IV (рис. 6).

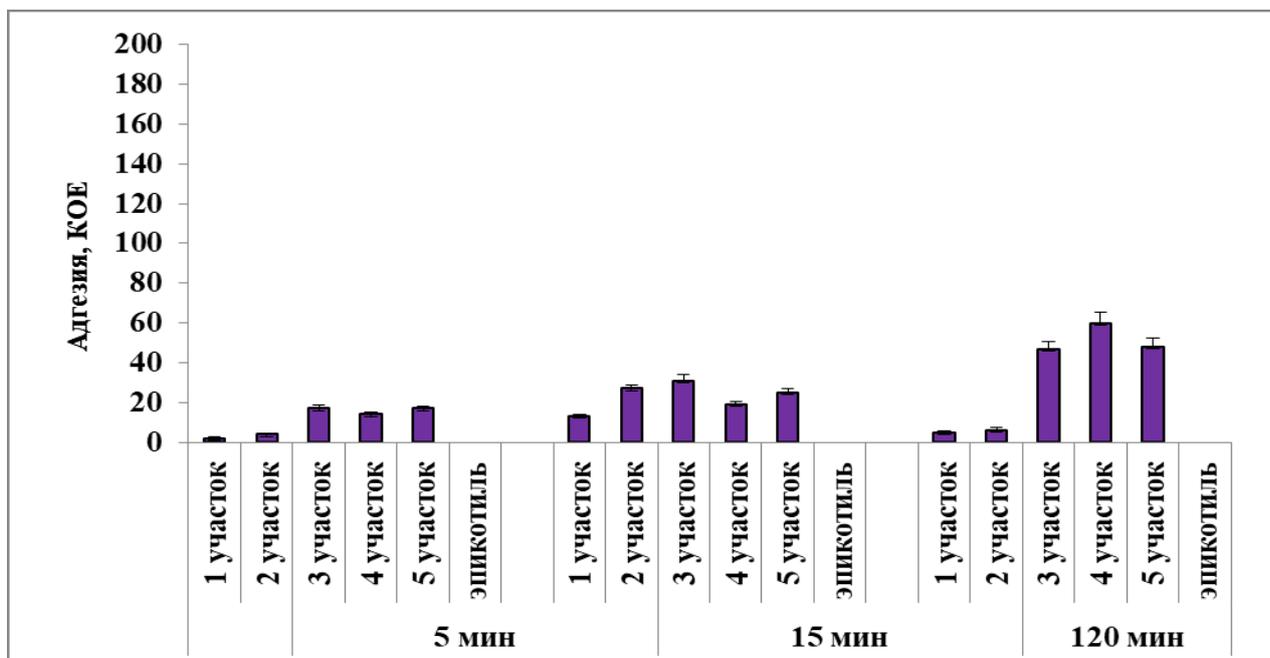


Рисунок 6. Интенсивность адгезии *R. leguminosarum* bv. *viciae* (эффективный штамм 1022) в зонах роста корня проростков гороха. $n = 3$, $m \pm S.E.$

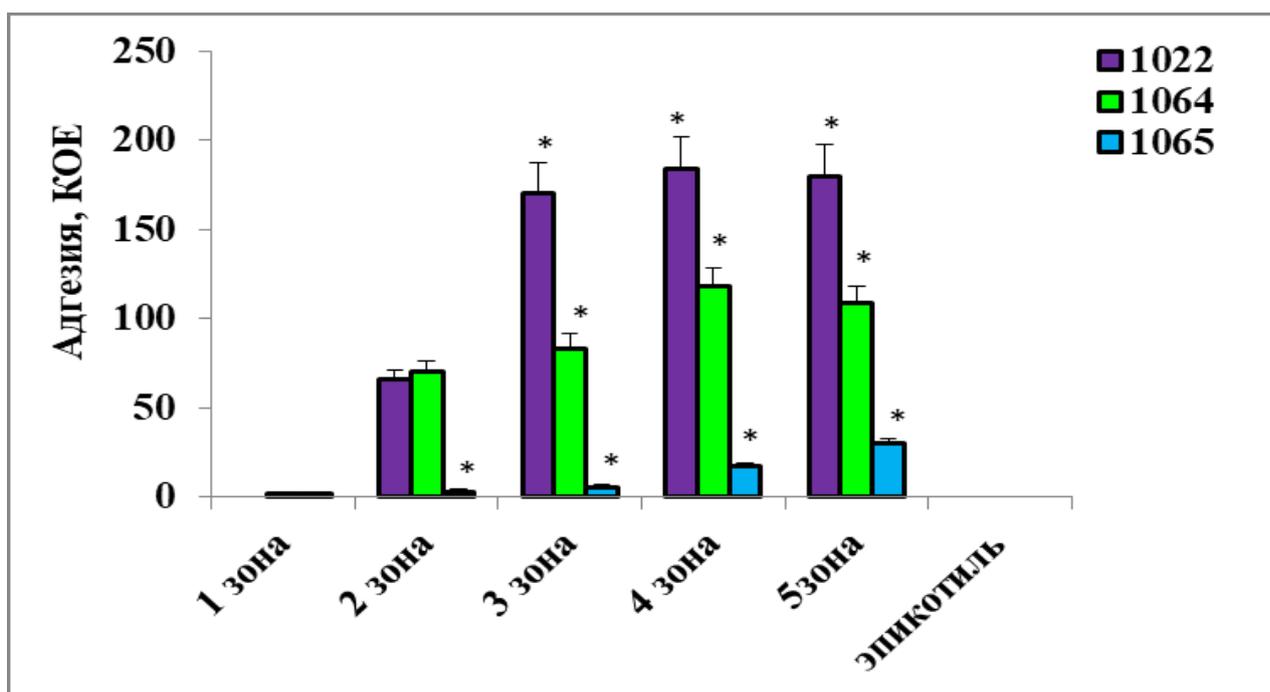


Рисунок 7. Интенсивность адгезии различных штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* в зонах роста корня проростков гороха через 360 мин коинкубации с корнями проростков гороха. $n = 3$, $m \pm S.E.$

* - различия статистически значимы ($P \leq 0.01$) при сравнении между собой групп «*Rlv* 1022», «*Rlv* 1064», «*Rlv* 1065» по критерию Ньюмена-Кейсла.

Через 360 мин адгезия *Rlv* была наиболее интенсивной в III-V участках корня, содержащих корневые волоски разной длины (рис. 7).

Интересно, что за 360 минут инкубации, несмотря на усилившуюся

адгезию, *Rlv* не оказали влияния на рост корней проростков гороха в длину (табл. 1).

Исходя из результатов исследования по адгезии эффективного по симбиотической азотфиксации штамма ризобий (1022), эксперименты с неэффективными штаммами *Rlv* (1064 и 1065) проводили только через 360 минут инокуляции. Результаты проведенных исследований показали существенные различия по интенсивности адгезии через 360 мин после инокуляции: количество необратимо прикрепившихся к поверхности корня бактерий штамма *Rlv*1065 было значительно меньше, чем бактерий штамма 1064 (рис. 7). В наибольшей степени адгезия неэффективных штаммов ризобий наблюдалась в III-V зонах корня, аналогично с эффективным штаммом. В эпикотиле, как в органе, не контактирующем с бактериями, адгезии не наблюдалось (рис. 7).

Патоген, специфический для гороха, *Psp*, продемонстрировал отличную от ризобий динамику адгезии (рис. 8). В течение 5-15 мин инкубации наибольшее количество КОЕ *Psp* наблюдалось во II, III, IV и V участках (5-15 мин), как и у эффективного штамма *Rlv*, причем интенсивность адгезии *Psp* была выше (рис. 8). Однако через 120 мин интенсивность этого процесса у *Psp* резко снижалась почти во всех участках, а через 360 мин адгезия этого фитопатогена уже полностью отсутствовала на всех участках корня гороха (рис. 8). Влияния на рост корней проростков гороха за 360 минут инкубации *Psp* не оказывал, аналогично *Rlv*1022 (табл. 1).

Так как горох не является растением-хозяином для *C. sepedonicus*, инкубацию проростков с этим патогеном проводили только в течение 5 и 15 мин. Исследования показали, что адгезия *Cs* полностью отсутствовала на всех участках корня. По этой причине график адгезии *Cs* не представлен.

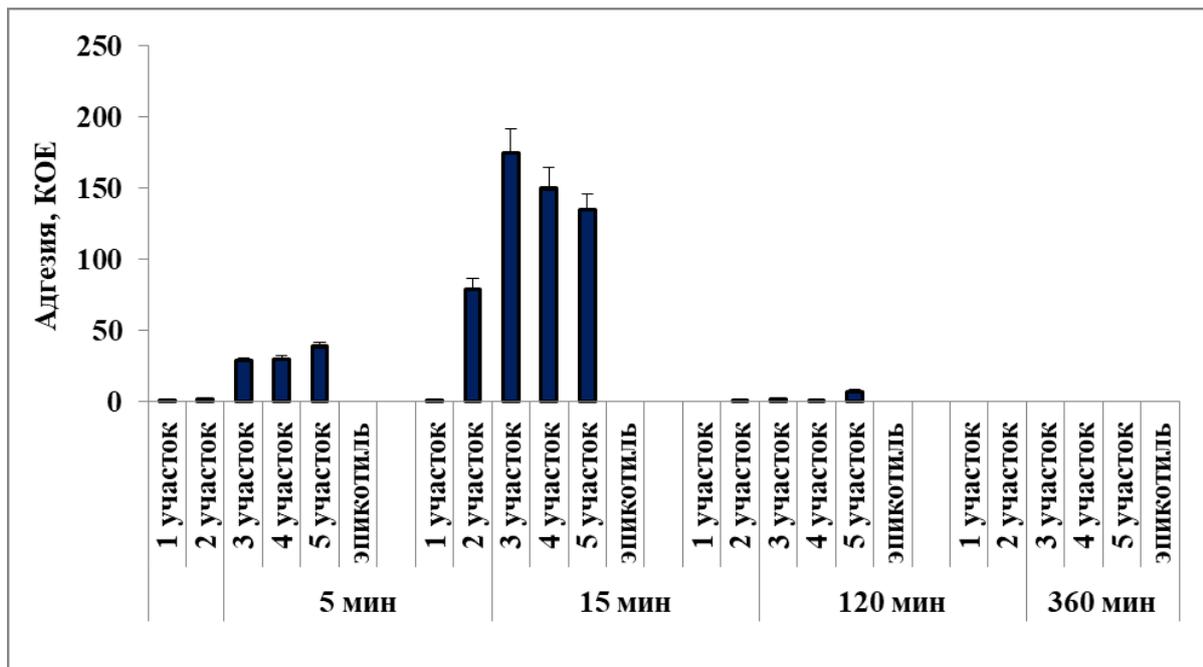


Рисунок 8. Интенсивность адгезии *P. syringae* pv. *pisi* в зонах роста корня проростков гороха. n = 3, m ± S.E.

Таблица 1

Влияние *Rlv* и *Psp* на длину корней проростков гороха через 360 минут после инокуляции

Вариант	Исходная длина корней, мм	Длина корней через 360 мин инкубации, мм	Прирост корня, мм	Критерий Стьюдента, t
Контроль	35.1 ± 2.7	37.4 ± 3.6	2.3	
<i>Rlv</i>	34.7 ± 2.5	37.3 ± 3.6	2.6	1.5 Различия недост
<i>Psp</i>	35.8 ± 2.3	37.8 ± 3.7	2.4	0.6 Различия недост

«*Rlv*» - проростки гороха, инокулированные *R. leguminosarum* bv. *viciae*

«*Psp*» - проростки гороха, инокулированные *P. syringae* pv. *pisi*

В качестве контроля были взяты проростки, инкубированные на воде. Критерий Стьюдента рассчитывали при сравнении группы «*Rlv*»/«*Psp*» с контрольной.

n=5; m ± S.E. P ≤ 0.01.

В природе неспецифическая стадия адгезии бактерий на поверхности клеток растений обусловлена физико-химическими параметрами и при благоприятных обстоятельствах переходит в специфическую фазу (Звягинцев и др., 2005). По литературным данным (Звягинцев и др., 2005), присоединение друг к другу, а затем и образование микроколоний бактерий занимает от нескольких минут до 2-4 часов (Turgeon, Bauer, 1982), когда в процесс прикрепления со стороны бактерий включаются экзополисахариды, фимбрии IV и V типов, различные адгезины и флагеллины (Bhuvaneswari, 1980). Адгезины и флагеллярные белки

представляют собой неспецифические факторы вирулентности, присутствуют практически у всех видов грамтрицательных бактерий, независимо от специализации (Серегина и др., 2008) и обеспечивают неспецифическую адгезию, которая наблюдалась в наших экспериментах при кратковременном, в течение 5-15 мин, взаимодействии корней проростков гороха с *Rlv*, а также с *Psp*, несмотря на то, что объектами инфицирования этого патогена являются листья, стручки и семена гороха, но не корни. При этом почти полное отсутствие адгезии *Psp* в участках корня проростков гороха через 120 мин свидетельствует об окончании стадии неспецифической адгезии. В отличие от псевдомонад, для *Rlv* корни проростка гороха являются естественной нишей обитания и усиление адгезии этих бактерий через 120 и 360 мин после инокуляции свидетельствует о переходе к специфической стадии взаимодействия с проростками гороха. В ряде работ показано, что ризобии уже через 180 мин после инокуляции проникают в участок корня, содержащий зачатки корневых волосков (Акимова и др., 2002; Bhuvaneshwari et al., 1980). В наших исследованиях инокуляция бактериями производилась на 3-е сутки роста, что соответствовало началу стационарной стадии. Ранее было показано, что именно на этом этапе у *Rlv* возрастала активность целлюлазы и пектиназы (Ломоватская и др., 2015), которые необходимы бактериям для проникновения в корневые волоски гороха (Robledo et al., 2012). Таким образом, ризобии довольно быстро включаются в процесс адгезии и проникновения может начинаться гораздо раньше, чем отмечено в литературе. При этом усилившаяся адгезия *Rlv1022* через 120 мин и, наиболее интенсивная, через 360 мин в III-V зонах обусловлена прикреплением бактерий в зонах более длинных корневых волосков.

Следует заметить, что неэффективные по азотфиксации штаммы *Rlv* (1064, 1065) проявляли более низкую интенсивность адгезии, чем эффективный штамм *Rlv1022* что, возможно, связано с отличиями в составе их экзополисахаридов, липополисахаридов и глюканов (Антипчук, Косенко, 2004; Castellani et al., 2021). Известно, что штаммы ризобий, дефектные по составу экзополисахаридов и липополисахаридов, отличаются пониженной адгезией на корнях бобовых и

формируют неэффективные клубеньки (Антипчук, Косенко, 2004). Инокуляция штаммами *Rlv1064* и *1065* приводит к образованию клубеньков, которые не фиксируют азот (Паспорт бактериальной культуры ВКМ).

Также немаловажную роль в процессе адгезии ризобий играют молекулы и структуры, входящие в состав клеток корневых волосков бобовых. В частности, у эукариот, в том числе и растений, недавно были выявлены особые белки плазматической мембраны – тетраспанины, способные взаимодействовать с липидами и белками, включая рецепторы, а также ферментами, синтезирующими сигнальные молекулы. Таким образом, эти белки регулируют многие клеточные процессы. Кроме того, тетраспанины могут использоваться бактериями в процессах адгезии и инфицирования клеток хозяина (Karam et al., 2020). В клетках корней бобовых эти белки индуцируются в ответ на инокуляцию специфическими штаммами ризобий или на Nod-факторы (Jimenez-Jimenez et al., 2019). При этом, тетраспанины в наибольшей концентрации сосредоточены в участках, содержащих молодые и зрелые корневые волоски, в то время как в области зачатков корневых волосков присутствуют лишь в небольшом количестве (Jimenez-Jimenez et al., 2019).

Возбудитель кольцевой гнили картофеля, *Cs*, обладает довольно широким спектром экзополисахаридов и интенсивно секретирует их во внешнюю среду (Shafikova et al., 2006), однако это не способствовало его адгезии на поверхности корня гороха. Для *Cs* экзополисахариды (ЭПС) являются одним из основных факторов вирулентности, а фимбрии и пили, характерные для этого вида и участвующие в прикреплении, индуцируются при контакте с растением-хозяином – картофелем (Chalupowicz et al., 2012). Очевидно, что ЭПС *Cs* некомплементарны лектинам гороха, что связано с его неспецифичностью к этому растению и это предотвращает его адгезию на корне.

Таким образом, представленные результаты позволяют сделать вывод о том, что факт бактериальной адгезии, а также ее обратимость/необратимость определяются типами взаимоотношений между бактериями и растением, специфичностью органа инфицирования, а в случае взаимодействия с *R.*

leguminosarum bv. *viciae* – особенностями штамма.

3.2. Изменение активности трансмембранной и растворимой форм аденилатциклазы в зонах роста корня проростков гороха под влиянием *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *P. syringae* pv. *pisi* или *C. sepedonicus*

Известно, что бактерии способны вызывать различные физиологические эффекты у растений. В частности, адгезия бактерий может модулировать активность сигнальных систем растений (Аленькина и др., 2014).

Известно, что аденилатциклазная сигнальная система (АСС) играет важную роль в устойчивости растений к биотическим стрессам. Синтез цАМФ, вторичного мессенджера АСС, обеспечивается работой аденилатциклазы (АЦ), присутствующей в трансмембранной (тАЦ) и «растворимой», цитозольной формах (рАЦ).

При инокуляции эффективным штаммом *Rlv1022* характер изменения активности тАЦ и рАЦ практически совпадал между собой в различных зонах корня гороха через 5 и 15 мин после инокуляции (рис. 9). При этом активность этих форм фермента незначительно превышала контроль во всех зонах корня и оставалась близкой к контролю в эпикотиле. Только через 120 мин активность рАЦ в III и IV зонах корня возрастала более значительно. Наиболее контрастные изменения наблюдались в активности обеих форм АЦ через 360 мин инфицирования: весьма значительная активация ферментов наблюдалась во II и III зонах корня, ингибирование – в IV и V зонах. Активность тАЦ и рАЦ в эпикотиле только через 120 мин превышала контроль, но снижалась через 360 мин на 50% (рис. 9).

Pseudomonas syringae pv. *pisi* также оказывал эффект на активность тАЦ и рАЦ клеток различных зон корня (рис. 9). В большинстве случаев динамика тАЦ и рАЦ имела противоположную направленность. Исключение составляет вариант «360 мин», когда характер изменений этих форм АЦ не столь принципиально отличался между собой. Причем динамика уровня обеих форм АЦ во всех участках была близка к таковой в варианте с *Rlv1022* «360 мин», однако активность этого фермента под воздействием *Psp* возрастала в гораздо меньшей

степени. Интересно, что в эпикотиле наиболее высокий уровень активности обеих форм фермента регистрировался через 120 мин, и только 360 мин происходило незначительное снижение (на 13%) активности рАЦ (рис. 9).

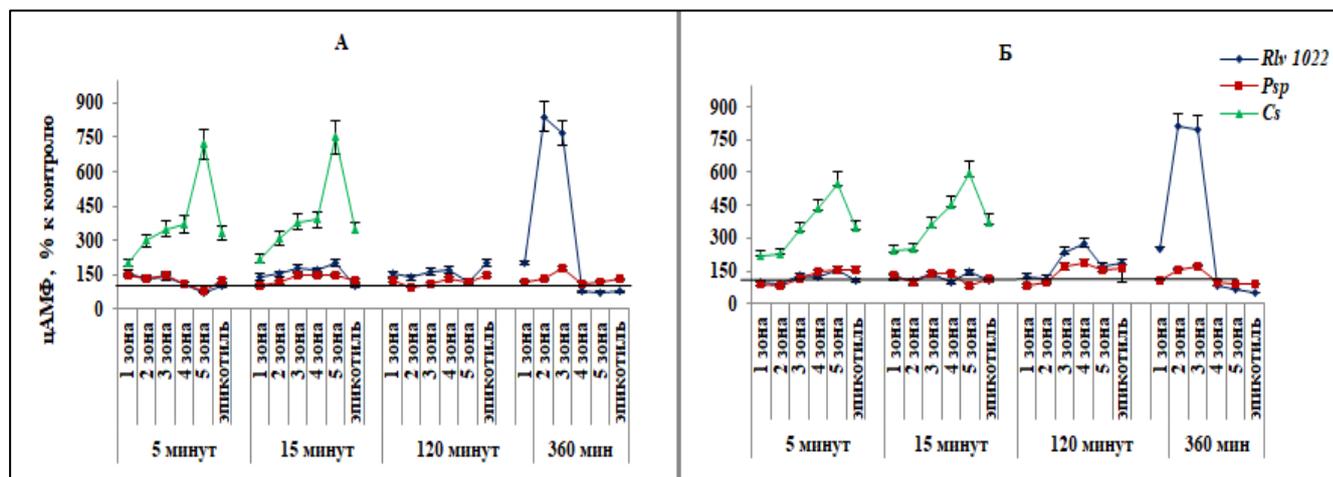


Рисунок 9. Динамика изменения активности тАЦ и рАЦ в зонах роста корня проростков гороха под воздействием эффективного штамма *Rlv1022/Psp/Cs*. Контролем служили проростки, инкубированные на питательной среде без бактерий. А – тАЦ, Б – рАЦ. $n = 3$, $m \pm S.E.$

Напротив, при инокуляции *Cs* в течение 5-15 мин происходила активация обеих форм АЦ во всех зонах корня и в эпикотиле. Самый высокий ее уровень наблюдался в V зоне (рис. 9).

Известно, что как бактериальные мутуалисты, так и патогены, оказывают влияние на различные физиологические процессы растений. Это происходит как за счет РАМР, так и за счет способности бактерий секретировать различные биологически активные молекулы. В частности, на примере бобово-ризобиального симбиоза показано усиление роста корней проростков гороха в длину через 24 часа после инокуляции эффективным по азотфиксации штаммом *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* (Акимова и др., 2014; Akimova et al., 1999). В наших экспериментах инокуляция *Rlv*, а также *Psp* в течение 360 минут не оказала влияния на рост корня гороха (табл. 1). Вероятно, эффект от инокуляции на рост следует ожидать на более поздних этапах взаимодействия.

Однако изменения в работе АСС в клетках корней проростков гороха были выявлены уже в первые минуты после инокуляции. При взаимодействии с *Rlv* и *Psp* изменения в активности обеих форм аденилатциклаз носили схожий характер в первые 5-15 минут (рис. 9). Это явление можно объяснить тем, что на ранних

этапах симбиоза и патогенеза защитные реакции растений во многом сходны (Gourion et al., 2015). Частично это связано с набором бактериальных молекул – PAMPs, которые распознаются растениями и включают флагеллин, фактор удлинения Tu (EF-Tu), липополисахариды и пептидогликаны (Couto, Zipfel, 2016). С другой стороны, у растений в этом процессе принимают участие рецепторные киназы NFP (Nod factor perception) (Klaus-Heisen et al., 2011; Sulima et al., 2017), участвующие в восприятии, в том числе, Nod-факторов. Для гороха на эту роль рассматриваются протеинкиназы Sym10, Sym37 и K1 (Долгих и др., 2010, 2017). Показано, что такие рецепторные киназы обладают высоким сродством не только к Nod-факторам, но и, например, к хитину фитопатогенов (Жуков и др., 2008; Fliegmann, Vono, 2015).

Таким образом, в узнавание Nod-факторов бобовых вовлечены различные рецепторные комплексы, отличающиеся гетерогенностью (Долгих и др., 2017). Киназный домен NFP позволяет выполнять ему двойную роль в симбиозе и патогенезе, фосфорилируя расположенные дальше в сигнальном каскаде специфические белки. В частности, NFP взаимодействует с малой Rho-like ГТФ-азой, участвующей в позитивной регуляции азотфиксирующего симбиоза *Lotus japonicus* (Gourion et al., 2015). Полагают, что это является результатом конвергентной эволюции, при которой различные эпитопы бактериальных факторов вирулентности могут распознаваться различными рецепторами растений (Zipfel, Oldroyd, 2017). В этой связи вполне уместно предположить, что одним из звеньев такой сигнальной цепи является трансмембранная аденилатциклаза. Есть сведения, что рецепторы к Nod-факторам локализованы не только на поверхности клеток, но и в цитоплазме, а Nod-факторы весьма гетерогенны по составу у различных штаммов ризобий (Nelson, Sadowsky, 2015). С этим могут быть связаны специфические изменения в активности тАЦ, а затем и в уровне цАМФ в зонах зачатков и молодых корневых волосков проростков гороха при инфицировании эффективным штаммом ризобий (рис. 10). При этом различия в изменениях активности тАЦ между участками корня проростков гороха, различающихся по степени сформированности корневых волосков, могут

быть обусловлены неравномерным распределением рецепторных молекул, распознающих Nod-факторы. Так, у бобовых были выявлены участвующие в специфической рецепции Nod-факторов лектины (Roberts et al., 1999), которые в наибольшем количестве локализованы именно на зарождающихся и молодых корневых волосках (Etzler et al., 1999), локализация которых соответствует II и III зонам корня проростка гороха в наших экспериментах.

В литературе предлагаются модели участия рецепторных киназ в сигнальных событиях с привлечением кальция и пероксида водорода. В частности, в трансдукции ядерных сигналов при развитии патогенеза и азотфиксирующего симбиоза показана роль Ca^{2+} -зависимой рецепторной киназы (Zipfel, Oldroyd, 2017). Несмотря на то, что у растений до сих пор не доказано существование цАМФ-зависимых протеинкиназ, есть сведения, что в арабидопсисе были выявлены нуклеотид-связывающие белки, обладающие различными функциями, в том числе регулирующие концентрацию пероксида водорода в ответ на атаку *Pseudomonas* (Donaldson et al., 2016). Гипотетически возможен еще один механизм участия тАЦ в трансдукции селективных сигналов: показано, что в арабидопсисе имеется белок At3g14460, который содержит несколько лейциновых повторов и обладает аденилатциклазной активностью. При этом он активируется и производит цАМФ при инфицировании арабидопсиса биотрофным грибом *Golovinomyces orontii* и бактериальным патогеном *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, но не меняет активность при заражении грибом-некротрофом *Botrytis cinerea* (Biancheta et al., 2019).

Под воздействием *Psp* характер изменений активностей тАЦ и рАЦ незначительно отличался от варианта с эффективным штаммом ризобий в первые минуты воздействия. Активность обеих форм фермента в каждой временной точке существенно отличалась по зонам, колеблясь от 90 до 150%. Возможно, их активность во времени менялась под воздействием разнообразного набора факторов вирулентности патогена: экзополисахаридов, флагеллинов, эффекторных белков и токсинов (Ichinose et al., 2013). Со стороны растения такие детерминанты-индукторы неспецифического иммунитета могут восприниматься

сложными молекулярными димерами, например, обнаруженным в арабидопсисе AtLRRAC1-белком, содержащим домен LRR-NB-ARC с лейцин-обогащенными повторами, характерными для рецепторов (LRR) и сайтом связывания с нуклеотидами (NB). Этот белок совмещает в себе функции рецептора к флагеллину FLS2 *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* и аденилатциклазы. Показано, что этот рецепторный белок участвует в индукции паттерн-индуцированного, то есть неспецифического иммунитета (PTI) (Biancheta et al., 2019).

Интересно, что несмотря на отсутствие адгезии, кратковременный (5-15 мин) контакт корней проростков гороха с *Cs* также вызывал весьма интенсивную реакцию тАЦ и рАЦ (рис. 9). Так как горох не является растением-хозяином для данного патогена, его восприятие, вероятно, происходит без участия рецепторов. Известно, что мукоидные штаммы *Cs* содержат, по сравнению с *Rlv* и *Psp*, много экзополисахаридов, имеющих низкий рН (4.5). Благодаря этому, *Cs* способен подкислять среду инкубации и приводить к изменению рН-гомеостаза околочлещной среды, в частности, у растений картофеля *in vitro* (Романенко и др., 1996). Именно это явление могло быть причиной активации тАЦ в корнях проростков гороха, поскольку рН среды инкубации *Cs* составлял 5.0-5.2. Аналогичный эффект в эпикотиле является проявлением системного сигнала, когда изменение гомеостаза клеток корня индуцирует ответные реакции в надземной части проростка.

По литературным данным, у животных рАЦ весьма чувствительна к повышенным концентрациям ионов кальция, который повышает сродство фермента к субстрату (Ломоватская и др., 2011). Для растений показано, что рАЦ из вакуолей клеток свеклы также проявляла чувствительность к различным концентрациям ионов кальция (Ломоватская и др., 2014). Поэтому, возможный механизм активации рАЦ в клетках корня проростков гороха может быть связан с изменением уровня ионов кальция в органеллах, который присутствует в довольно высоких концентрациях (Швартау и др., 2014). Кроме того, кратковременное возрастание уровня кальция в клетке при инфицировании может происходить в результате активации неселективных кальциевых каналов на

плазмалемме (Ma et al., 2013), что может приводить к активации рАЦ. В соответствии с существующей на сегодняшний день гипотезой о сигнальных микродоменах (Willoughby, Cooper, 2007), рАЦ в органеллах осуществляет регуляцию локального уровня цАМФ, что особенно важно для ядра, митохондрий и хлоропластов растений – геном содержащих органелл.

В результате проведенных исследований можно сделать вывод о том, что степень модуляции активности обеих форм аденилатциклазы в клетках участков корня проростков гороха, различающихся по степени сформированности корневых волосков, зависит от специализации и типов взаимоотношений бактерий с растением. Как упоминалось выше, инфицирование *Rlv* приводило к изменению активности обеих форм АЦ во всех зонах корня, причем наибольшая активация наблюдалась через 360 минут после инокуляции во II и III участках, которые являются предпочтительными для проникновения данного мутуалиста.

Патоген гороха *Psp* вызывал меньшую, по сравнению с мутуалистом, активацию АЦ. По литературным данным, *Psp* секретирует токсины, способные модулировать ионный транспорт в клетках растений (Atkinson, Baker, 1987; Hutchison, Gross, 1997), что может влиять на активность обеих форм АЦ в участках корня проростков гороха, различающихся по степени сформированности корневых волосков. Можно предположить, что повышенная активность АЦ в зонах зачатков и молодых корневых волосков (II-III зоны) связана со структурными особенностями клеток этих участков (Иванов, 1974).

Фитопатоген картофеля, чужеродный для гороха, несмотря на отсутствие адгезии, вызывал более значительную, по сравнению со специфическими для гороха бактериями, активацию обеих форм АЦ во всех участках корня проростков гороха. Такое явление могло быть вызвано подкислением среды инкубации проростков гороха кислыми ЭПС, характерными для *Cs*. При контакте с неспецифичным патогеном происходила более интенсивная активация аденилатциклазы, чем при инокуляции специфичным.

Таким образом, кратковременная инокуляция (5 мин) всеми видами бактерий вызывала неспецифическую активацию обеих форм АЦ во всех зонах

корня, что, вероятно, связано с воздействием бактериальных МAMPs. Однако через 360 минут после инокуляции *Rlv*, в отличие от *Psp*, наблюдалась более интенсивная активация АЦ во II-III зонах, что свидетельствует об участии обеих форм этого фермента в развитии бобово-ризобияльного симбиоза.

3.3. Изменение концентрации цАМФ в различных участках корня проростков гороха под влиянием инокуляции *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *P. syringae* pv. *pisi* или *C. sepedonicus*

Предыдущие эксперименты показали, что инокуляция различными по специализации и специфичности к гороху бактерий, модулировала активность АЦ во всех участках корня проростков гороха и эпикотиле. Следующим этапом работы было изучение влияния данного феномена на изменение концентрации продукта реакции АЦ – цАМФ.

Предварительные исследования корней проростков гороха, инкубированных в питательной среде без бактерий, показали, что содержание цАМФ незначительно отличалось во всех участках, за исключением I зоны (меристемы), где данный показатель был выше (табл. 2). В дальнейших экспериментах данные образцы служили контролем.

От 5 до 120 мин инокуляции эффективным штаммом (1022) ризобий концентрация цАМФ возрастала до 150-200% и не очень существенно отличалась во всех зонах корня (рис. 10). Однако через 360 мин наиболее высокий уровень этой сигнальной молекулы наблюдался во II и III зонах, а наиболее низкий – в IV и V. В клетках эпикотиля концентрация цАМФ также изменялась во времени. Наиболее высокий уровень цАМФ в нем наблюдался через 15 и 120 мин инфицирования, но через 360 мин воздействия *Rlv*1022 его концентрация падала ниже контроля (рис. 10).

В то же время через 360 мин инокуляции неэффективными штаммами *Rlv* (1064 и 1065) динамика уровня цАМФ существенно отличалась от таковой с эффективным штаммом 1022 (рис. 11): под влиянием обоих штаммов (1064 и 1065) уровень цАМФ очень незначительно и почти равномерно возрастал во всех зонах корня и в эпикотиле (рис. 11).

Интересно, что под воздействием *Psp* в течение 5-15 мин динамика концентрации цАМФ мало отличалась от таковой в варианте с эффективным штаммом *Rlv1022* (рис 10). Через 120 мин уровень цАМФ во всех зонах падал и был близок к контролю, что совпадало с моментом значительного снижения адгезии этого фитопатогена (рис. 8). К 360 мин воздействия, когда адгезия *Psp* отсутствовала, концентрация цАМФ, тем не менее, возрастала во II и III зонах, но не столь значительно, как в варианте с эффективным штаммом *Rlv*. При этом в эпикотиле данный показатель приближался к контролю (рис. 10).

Под воздействием *C. sepedonicus* концентрация цАМФ уже через 5 мин возрастала во всех исследуемых участках корня и в эпикотиле, при этом через 15 мин коинкубации оставалась почти на том же уровне (рис. 10).

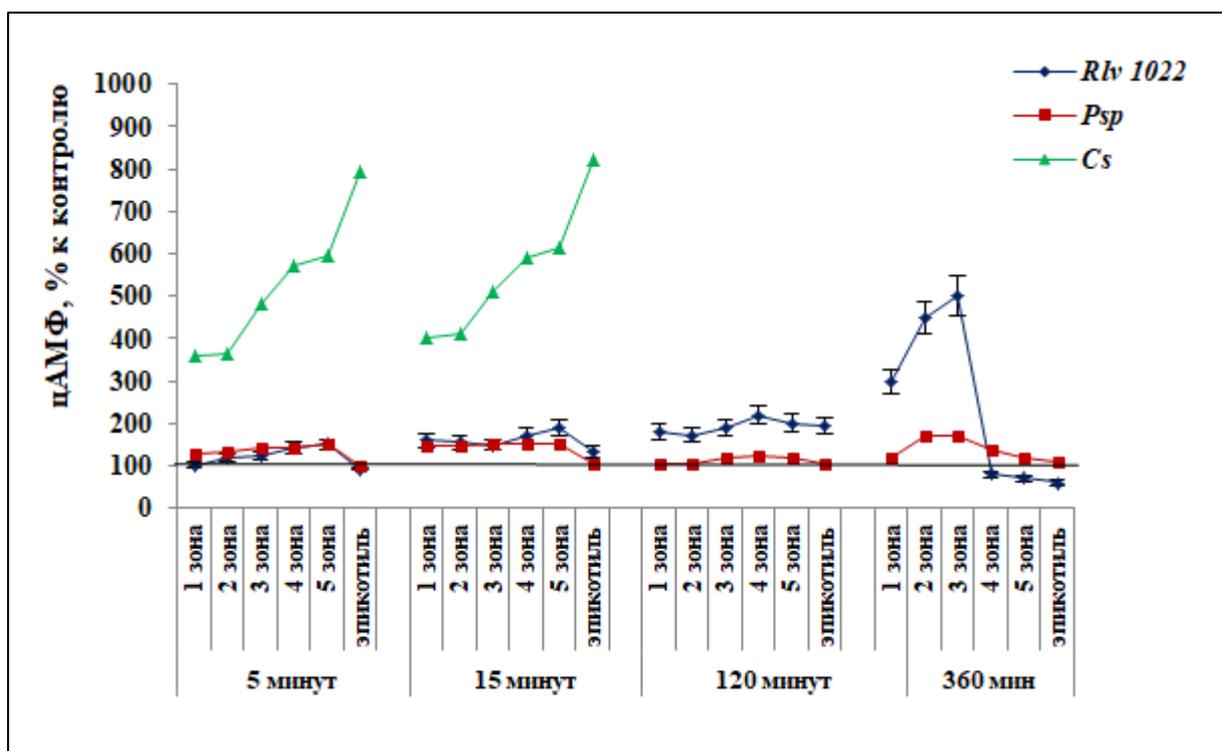


Рисунок 10. Динамика изменения концентрации цАМФ в зонах роста корня проростков гороха под воздействием *Rlv1022/Psp/Cs*. В качестве контроля (100%) были взяты проростки, инкубированные на питательной среде без бактерий. $n = 3, m \pm S.E.$

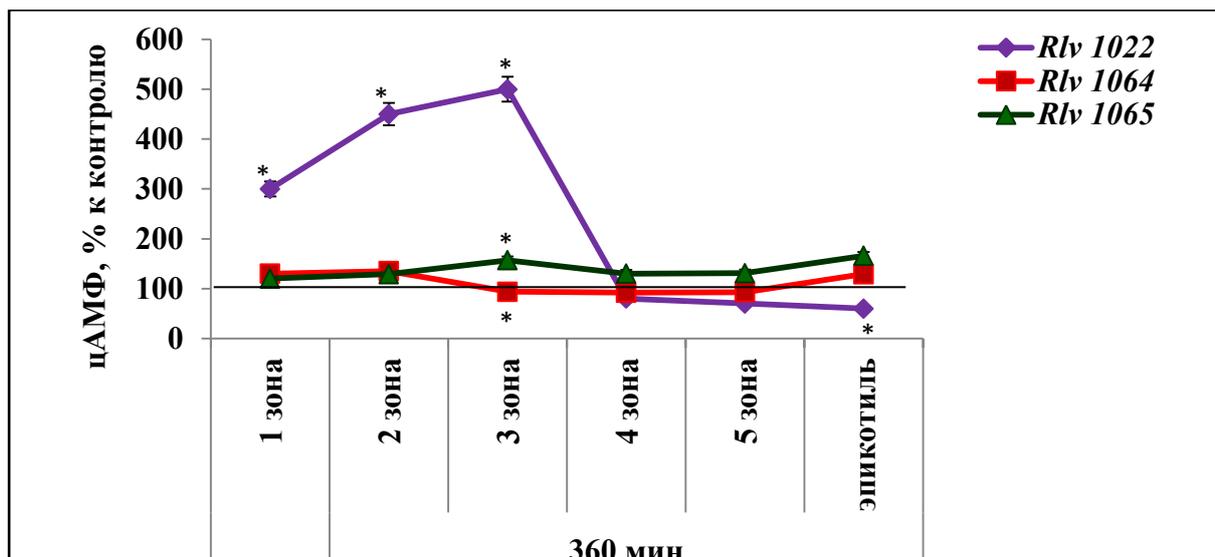


Рисунок 11. Динамика изменения концентрации цАМФ в зонах роста корня проростков гороха под воздействием различных по эффективности симбиоза штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* через 360 мин. инокуляции. В качестве контроля (100%) были взяты проростки, инкубированные на питательной среде без бактерий. n = 3, m ± S.E.

* - различия статистически значимы ($P \leq 0.01$) при сравнении между собой групп «Rlv 1022», «Rlv 1064», «Rlv 1065» по критерию Ньюмена-Кейсла

При любых типах отношений между растениями и бактериями (патогенез, мутуализм) важны самые ранние этапы, когда растительные сигнальные системы индуцируют новые, соответствующие типу взаимодействия, метаболические программы (Zipfel, Oldroyd, 2017).

Сравнение ранних ответных реакций растений на атаки фитопатогенов и мутуалистов в первые часы после инокуляции показало, что некоторые метаболические перестройки одинаковы при обоих типах воздействий (Eaton et al., 2010). Это касается, в частности, кратковременного повышения концентраций активных форм кислорода и азота (Santos et al., 2001; Ferrarini et al., 2008; Nanda et al., 2010; Torres, 2010), Ca^{2+} , и фитогормонов (Пятыгин, 2007, 2008б; Felle, Zimmermann, 2007). При этом изменения концентраций сигнальных молекул у растений под влиянием бактерий во времени и локализации в органах происходят неравномерно. Например, на кончиках молодых активно растущих корневых волосков *Medicago truncatula* при воздействии Nod-факторов наблюдается более длинный временной период между пиками цитозольного кальция, чем в старых (Miwa et al., 2006).

цАМФ также играет важную роль в мобилизации защитных ответов

растений при биотических стрессах (Ломоватская и др., 2018; Jiang et al., 2005; Suzuki, Katano, 2018). В ходе данной работы было установлено сходство в реакции основных компонентов АСС на воздействие *Psp* и эффективного штамма *Rlv*, наблюдаемое в первые 5-15 мин после инокуляции (рис. 9, 10). Вероятно, это обусловлено PAMPs, характерными для обоих видов бактерий (Шафикова, Омеличкина, 2015; Fliegmann, Vono, 2015). Как говорилось выше, растения для распознавания PAMPs используют различные рецепторные молекулы. В частности лектины, выполняющие функции рецепторов, а также комплексы рецепторных киназ на клеточной поверхности. Например, у *Lotus japonicus* метаболиты ризобий на самых ранних этапах взаимодействия воспринимаются рецепторной киназой *LjNFR1*, которая опосредует экспрессию защитных генов растения (Gough, Jacquet, 2013). Еще одной важной рецептор-подобной киназой, участвующей в распознавании растениями патогенных и мутуалистических организмов на самых ранних этапах взаимодействия, является CERK1 (chitin elicitor receptor kinase 1). Известно, что у патогенов и мутуалистов основными мишенями для узнавания CERK1 служат хитоолигосахариды различной степени полимеризации, в том числе Nod-факторы ризобий (Miya et al., 2007). На примере *Lotus* и *Medicago* показана функциональная связь CERK1 с рецепторами Nod-факторов при взаимодействии со специфическими видами ризобий (Gimenez-Ibanez et al., 2009). Кроме того, помимо распознавания хитиновых олигомеров, CERK1 играет важную роль в процессе взаимодействия растений с бактериями семейства *Pseudomonas syringae* (Gimenez-Ibanez et al., 2009). Несмотря на то, что *Pseudomonas syringae* лишены хитоолигосахаридов, в составе их клеточной оболочки присутствуют другие углеводсодержащие молекулы, родственные хитину и способные влиять на растение в качестве PAMPs, например, пептидогликаны. Также подобные углеводные структуры бактерий содержатся в периплазме и биопленках (Gimenez-Ibanez et al., 2009; Ichinose et al., 2013). Кроме того, *Pseudomonas syringae* обладают особым эффекторным белком AvrPtoB, необходимым для подавления у растений РТI путем ингибирования активности или полной дегградации CERK1 (Gimenez-Ibanez et al., 2009). У *Pisum sativum*

представителем класса CERK1 является рецепторная киназа *PsLYK9*, недавно обнаруженная и изученная И. В. Леппянен с соавт. (2016). Авторами была показана важная роль *PsLYK9* в распознавании хитоолигосахаридов, а также ее регуляция β -субъединицей G-белка (Леппянен и др., 2016; Леппянен и др., 2018; Zhang et al., 2010). Вероятно, *PsLYK9* может рассматриваться в качестве одного из общих механизмов распознавания и передачи сигналов в первые минуты взаимодействия гороха как с *Rlv*, так и *Psp*.

Далее, на более поздних этапах развития растительно-микробных взаимодействий различия в реакциях растительных сигнальных систем становятся более очевидными. По литературным данным, при инокулировании корней *Lotus japonicus* специфическими ризобиями *Mesorhizobium loti* наблюдалось временное индуцирование продукции NO через 240 минут. Напротив, инокуляция неспецифическими для *L. japonicus* ризобиями *Sinorhizobium meliloti* и *Bradyrhizobium japonicum* не вызывала возрастания уровня NO. Когда *L. japonicus* инокулировали патогенами (*Ralstonia solanacearum* или *Pseudomonas syringae*), в корнях наблюдали непрерывную продукцию NO (Nagata et al., 2008).

По результатам наших экспериментов, различия в реакции АСС корней проростков гороха при взаимодействии с мутуалистом и специфическим патогеном наблюдались через 120 минут после инокуляции: под воздействием *Rlv* уровень цАМФ оставался повышенным, в то время как в варианте с *Psp* концентрация этой сигнальной молекулы снижалась практически до уровня контроля (рис. 10), что совпадало с уменьшением интенсивности адгезии данного фитопатогена (рис. 8).

Однако через 360 мин после инокуляции *Psp* снова происходило незначительное возрастание уровня цАМФ, причем во II и III зонах (рис. 10), аналогично с вариантом «горох+ *Rlv*» (рис. 10). Поскольку адгезия *Psp* на данном этапе полностью отсутствовала, в качестве индукторов ответов АСС гороха следует рассматривать только внеклеточные факторы вирулентности бактерий. К ним относятся, прежде всего, немногочисленные экзополисахариды, которые у *Psp* представлены альгинатом и леваном (Ichinose et al., 2013). Показано, что

они могут ингибировать Ca^{2+} -опосредованные защитные ответы путем хелатирования этой сигнальной молекулы, что может приводить к изменению активности тАЦ, поскольку показано, что она является чувствительным к кальцию ферментом (Филинова и др., 2018). Кроме того, большой вклад в вирулентность *Psp* вносят его фитотоксины: коронатин, сириngoлин и др. (Ichinose et al., 2013). Пути их воздействия на взрослые растения весьма разнообразны, начиная от стимуляции открытия устьиц и заканчивая разрушением хлорофилла в листьях (Ichinose et al., 2013). Однако одним из наиболее эффективных механизмов патогенности с их участием является стимуляция синтеза жасмоновой кислоты (Ichinose et al., 2013), которая, в свою очередь, является ингибитором синтеза салициловой кислоты – индуктора защитных ответов растений (Zheng et al., 2012).

Таким образом, тенденции изменения уровня цАМФ в участках корня проростков гороха, различающихся по степени сформированности корневых волосков, только в первые минуты воздействия *Psp* и *Rlv* носят схожий характер: наиболее чувствительными являются участки корня, содержащие зачатки и молодые корневые волоски.

Значительные отличия в реакциях основных компонентов АСС наблюдались через 360 мин после инокуляции в зонах зачатков и молодых корневых волосков (рис. 9, 10). Как известно, именно эти зоны являются областью максимального проникновения ризобий (Акимова и др., 2002). Активация АЦ с последующим возрастанием уровня цАМФ на данном этапе взаимодействия с *Rlv* могло быть вызвано действием специфических NF, в то время как *Psp* вызывал лишь незначительный всплеск уровня этой сигнальной молекулы. Так как *Psp* способен инфицировать горох только через лист или семена, причиной его влияния на активность АСС в корнях могут быть секретлируемые им токсины, в частности, сириngoмицин. По литературным данным, сириngoмицин нарушает работу ионных каналов в мембране растительной клетки, в том числе, влияет на транспорт Ca^{2+} (Takemoto et al.; 1991; Hutchison et al., 1995). Так как аденилатциклазы растений являются Ca^{2+} -

зависимым ферментом (Филинова и др., 2018), можно предположить, что сириномицин опосредовано модулирует их активность в участках корня проростков гороха, различающихся по степени сформированности корневых волосков. Возможно, что клетки корней, только что перешедшие к растяжению, обладают большей проницаемостью. Таким образом, можно сделать вывод, что *Rlv* и *Psp*, как специфические для гороха виды бактерий, только на первый взгляд вызывают схожие реакции АСС. Причем только в первые минуты взаимодействия за счет характерных для всех граммотрицательных бактерий РAMPs. На более поздних этапах (через 360 минут взаимодействия) секретируются специфические для каждого вида бактерий активные молекулы, поэтому реакции АСС в участках корня проростков гороха различаются в зависимости от взаимодействия с мутуалистом или патогеном.

Как известно из литературных данных, различные штаммы ризобий отличаются по составу и содержанию липополисахаридов, что определяет их сродство к лектинам гороха, выступающих в качестве рецепторов (Антипчук, Косенко, 2004; Аленькина и др., 2014; Libault et al., 2010).

Циклический аденозинмонофосфат, как часть этой сигнальной сети, напрямую не может оказывать защитный эффект, но способен вызывать модуляцию активности других вторичных мессенджеров, например пероксида водорода (Bindschedler et al., 2001), роль которого в регуляции численности ризобий в корнях бобовых хорошо изучена (Глянько и др., 2005; Jamet et al., 2007).

В ходе настоящей работы было показано, что только эффективный штамм *Rlv* (1022) через 360 мин после инокуляции вызывал существенный подъем уровня цАМФ (около 500% от контроля) в зонах корневых бугорков и коротких корневых волосков (7-12 мм – что соответствует II-III зонам), то есть в тех участках, которые являются наиболее чувствительными к инфицированию ризобиями (Акимова и др., 2002). Неэффективные по азотфиксации штаммы *Rlv* (1064 и 1065) не индуцировали таких резких всплесков цАМФ в зонах корня. Помимо корней, изменение концентрации цАМФ также наблюдалось и в

эпикотиле проростков гороха. Есть сведения, что липополисахариды ризобактерий, в зависимости от вариабельности O-антигенной углеводной боковой цепи, могут стимулировать в растениях системную устойчивость, которая сопровождается генерацией активных форм кислорода и внеклеточным подщелачиванием среды (Van Loon et al., 1998). Очевидно, это сказывается и на уровне цАМФ в этом органе, где более высокая концентрация этой молекулы, наблюдаемая через 15-120 мин взаимодействия, чем в корне, также опосредованно защищает эпикотиль от заражения, что, в противном случае, может привести только к ослаблению растительного организма.

Весьма интересным выглядит повышение концентрации цАМФ в корнях проростков гороха после кратковременного (5 и 15 мин) контакта с *Cs*, несмотря на абсолютное отсутствие его адгезии, как уже указывалось в разделе 3.1. Очевидно, что активация компонентов АСС гороха носит неспецифический характер и, возможно, связана с воздействием ЭПС *Cs*. Мукоидные штаммы этого патогена весьма интенсивно синтезируют кислые ЭПС, являющиеся их основными факторами вирулентности. По данным Т. Wroblewski с соавторами (2009), виды растений-нехозяев реагируют на многие факторы вирулентности более часто и более интенсивно, чем виды растений-хозяев. На основании этого было высказано предположение, что представители таких факторов вирулентности могут взаимодействовать с общими мишенями или воздействовать на одинаковые (сигнальные, метаболические) пути растений (Романенко, Ломоватская, 2017; Wroblewski et al., 2009). Это тем более интересно, поскольку в составе экзометаболитов данного возбудителя присутствуют молекулы эффекторной природы, например, сериновые протеиназы, которые могут блокировать развитие паттерн-активируемого иммунитета путем разрушения рецепторов PRR (Омеличкина и др., 2017).

Следует заметить, что повышение уровня цАМФ в модельной системе «горох-*Cs*» происходило постепенно в каждой из вышерасположенных зон корня. Представляется, что это может быть связано с количеством и длиной корневых волосков в каждой из зон. Поскольку ЭПС *Cs* обладают довольно низким рН (4.5-

5.0), они могут неспецифически довольно быстро подкислять внеклеточное пространство корневых волосков (Романенко и др., 1996). Это, в свою очередь, может приводить к сдвигу электрохимического потенциала (Холманский, Кожевников, 2016), индукции «кальциевой волны» и дистанционной передаче сигнала (Shine et al., 2019), что в наших экспериментах выразилось в повышении концентрации цАМФ в эпикотиле до 300% и выше.

В результате проведенных исследований можно сделать вывод о том, что в клетках участков корней проростков гороха, различных по степени сформированности волосков, работа основных компонентов АСС модулируется под воздействием бактерий, различных по специфичности и специализации. Однако степень изменения активности АСС между участками корня проростков гороха, отличающихся по степени сформированности корневых волосков в различные промежутки времени индивидуальна для каждого типа взаимодействия.

Таким образом, инокуляция всеми видами бактерий, независимо от их специализации и эволюционной близости к растению, в первые 5-15 минут вызывала повышение уровня цАМФ во всех зонах корней проростков гороха. Специфические различия наблюдались лишь через 120 минут, когда взаимодействие с мутуалистом вызывало повышение уровня цАМФ в корнях с последующим интенсивным возрастанием в зонах зачатков и молодых корневых волосков к 360 мин. В тоже время при контакте с патогеном, специфичным для гороха, но неспособным инфицировать корень, уровень цАМФ незначительно колебался в период 120-360 мин: снижался до уровня контроля через 120 минут и незначительно возрастал через 360 минут после инокуляции.

3.4. Влияние инокуляции *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *P. syringae* pv. *pisi* или *C. sepedonicus* на изменение концентрации эндогенного H_2O_2 в различных зонах корня проростков гороха и в эпикотиле

Реализация защитных механизмов у растений при инфицировании мутуалистическими или патогенными бактериями связана с синтезом активных форм кислорода (АФК) (Donaldson et al., 2016). Одной из наиболее хорошо

изученных АФК является пероксид водорода (Креславский и др., 2012). В частности, большое количество работ посвящено изменению концентрации этой сигнальной молекулы на продвинутых стадиях бобово-ризобиального симбиоза спустя 24 часа и более (Васильева и др., 2005; Cardenas et al., 2008a). По литературным данным, в клетках целых корней проростков *Pisum sativum* возрастание концентрации H_2O_2 происходило через 30 минут после инокуляции эффективным штаммом *Rlv* (Митанова, 2010). Через 24 и 48 ч уровень H_2O_2 снижался в зонах молодых и зрелых корневых волосков (Васильева и др., 2007б; Глянко и др., 2007). Однако, концентрационная динамика АФК и, в частности, этого вторичного мессенджера в различных зонах корня на более ранних этапах взаимодействия с ризобиями, отличающимися по эффективности, и фитопатогенными бактериями, различными по типам взаимоотношений бактерий с горохом, остается малоизученной. На примере *Phaseolus vulgaris* было продемонстрировано резкое и временное повышение уровня АФК в клетках активно растущих корневых волосков в течение нескольких секунд после воздействия Nod-факторов *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, что отличалось от реакции растения на добавление хитиновых олигомеров (Cardenas, 2008a).

Проведенные нами эксперименты позволили установить, что у неинокулированных корней проростков гороха наиболее высокий базальный уровень эндогенного H_2O_2 наблюдался в зонах зрелых и старых корневых волосков (IV-V) и эпикотиле. Наименьший – в зонах зачатков и молодых корневых волосков (II-III) (табл. 2). В дальнейших исследованиях данные образцы служили в качестве контроля.

Таблица 2

Содержание эндогенного H_2O_2 в зонах роста и эпикотиле неинокулированных корней проростков гороха.

Вариант	Зоны корня					эпикотиль
	I	II	III	IV	V	
Концентрация H_2O_2 (мкМ/мг белка)	13.4 ± 1.1	11.4 ± 1.3	12.7 ± 1.0	17.4 ± 1.6	15.7 ± 1.5	64 ± 5.3

Примечание: n = 10, m ± S.E.

Кратковременная инокуляция, в течение 5 мин, эффективным штаммом *Rlv* (1022) вызывала наиболее усиленную генерацию АФК, в частности, эндогенного H_2O_2 , во II и III зонах, тогда как в I, IV и V зонах концентрация пероксида возрастала менее интенсивно (рис. 12). Под воздействием *Psp* и *Cs* концентрация H_2O_2 была ниже, чем с *Rlv*, незначительно отличалась под влиянием обоих видов бактерий и мало отличалась по зонам корня. При этом во всех вариантах эксперимента в эпикотиле проростков концентрация H_2O_2 снижалась практически одинаково примерно на 20% от контроля (рис. 12).

На следующем этапе сравнивали изменения в концентрации H_2O_2 в таких же зонах корня проростков гороха при более длительной инокуляции (360 мин) штаммами *Rlv*, различающимися по эффективности азотфиксирующего симбиоза. В этих условиях только в I зоне эффективный штамм вызывал повышение уровня H_2O_2 в сравнении с контролем, тогда как во всех остальных зонах инокуляция всеми тремя штаммами приводила к снижению уровня пероксида водорода на 10-30%. При этом в эпикотиле только неэффективные штаммы (1064 и 1065) вызывали повышение концентрации H_2O_2 на 15-25% (рис. 13).

Известно, что АФК необходимы растениям как для защиты от патогенов, так и для формирования азотфиксирующего симбиоза. Как сигнальная молекула H_2O_2 может активно влиять на деятельность сигнальных каскадов, активируя работу MAP-киназ, фосфатаз и протеинкиназ (Креславский и др., 2012). При этом имеет значение как концентрация пероксида водорода, так и его временные колебания. Показано, что последние необходимы для процессов, ведущих к скручиванию корневых волосков и последующей инвазии клубеньковых бактерий (Lohar, 2007; Cardenas, 2008a), а слишком интенсивная деградация H_2O_2 при инфицировании вызывает пониженное количество клубеньков, как показано на мутанте люцерны *S. meliloti* (Luo, Lu, 2014).

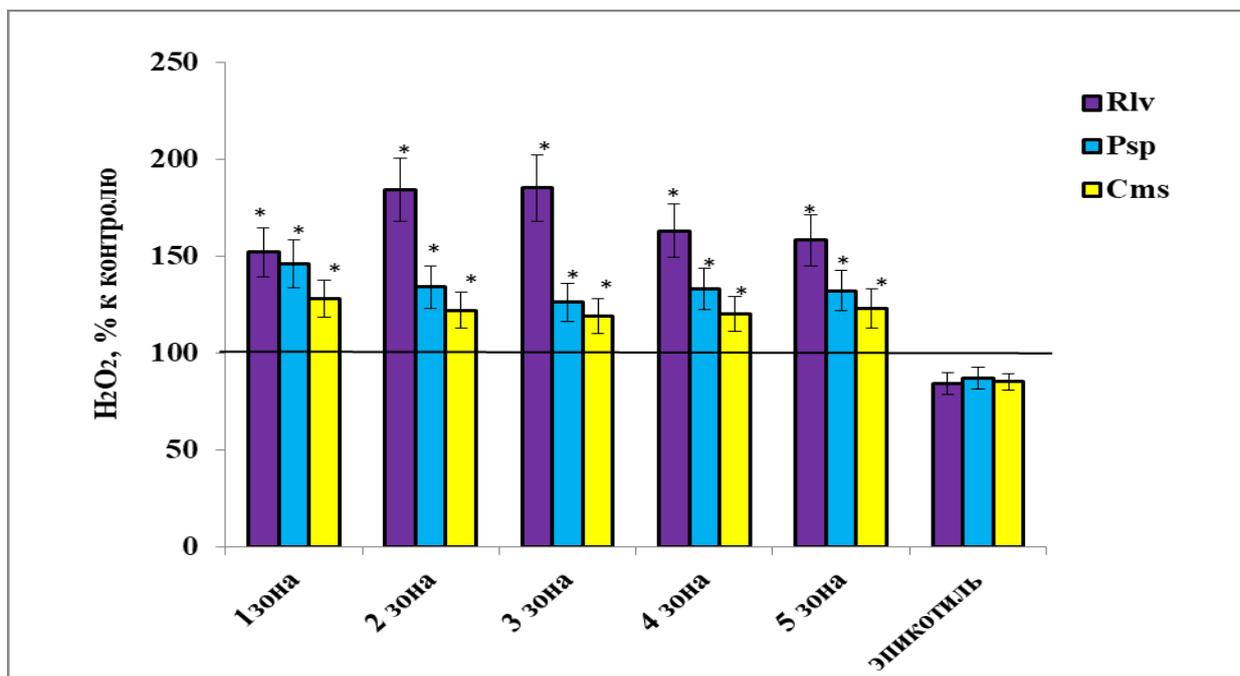


Рисунок 12. Изменение концентрации H_2O_2 в зонах роста корня проростков гороха при инокуляции в течение 5 мин *R. leguminosarum* bv. *vicia*, *P. syringae* pv. *pisi*, *C. sepedonicus*. В качестве контроля (100%) были взяты проростки, инкубированные на питательной среде без бактерий. $n = 3$, $m \pm S.E.$

* - различия статистически значимы ($P \leq 0.01$) при сравнении между собой групп «*Rlv* 1022», «*Psp*», «*Cs*» по критерию Ньюмена-Кейсла

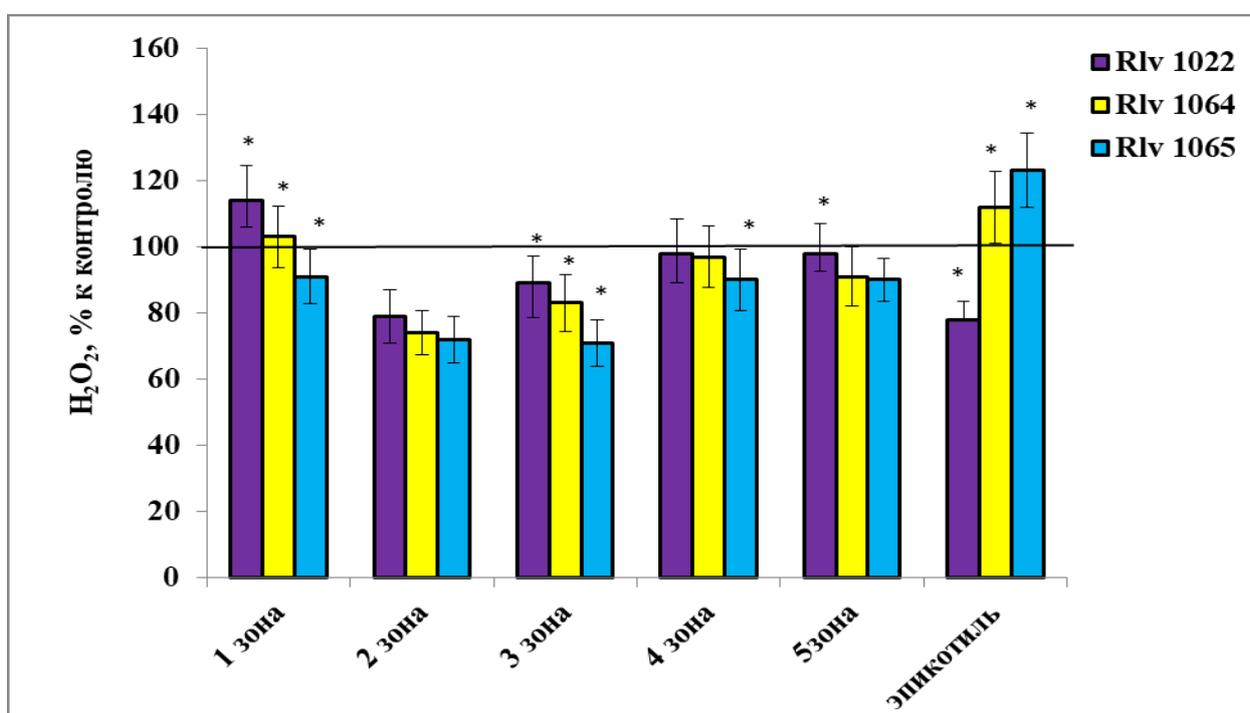


Рисунок 13. Изменение концентрации H_2O_2 в зонах корня проростка гороха через 360 минут после инокуляции различными по азотфиксации штаммами *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia*. В качестве контроля (100%) были взяты проростки, инкубированные на питательной среде без бактерий. $n = 3$, $m \pm S.E.$

* - различия статистически значимы ($P \leq 0.01$). при сравнении между собой групп «*Rlv* 1022», «*Rlv* 1064», «*Rlv* 1065» по критерию Ньюмена-Кейсла

Кроме того, резкое возрастание уровня O_2^- и пероксида водорода наблюдается при заражении как специфическими, так и неспецифическими патогенами. Причем взаимодействие с неспецифическими патогенами вызывало более интенсивную продукцию АФК в инфицированных органах растений в более поздние периоды времени (Cheng et al., 2012; Hafez, 2015; Ketta, 2015).

По литературным данным, на начальных этапах симбиотических взаимодействий генерация АФК является более сильной и продолжительной, чем при инфицировании патогенами (Peleg-Grossman, Melamed-Book, 2012). Подобное явление в нашей работе наблюдалось в участках корня проростков гороха, различающихся по степени сформированности корневых волосков, через 5 минут инфицирования эффективным штаммом *Rlv*. При этом, воздействие *Psp* и *Cms* вызывало меньшее возрастание уровня H_2O_2 . При формировании БРС подавление защитных механизмов растений может включаться как на начальных этапах симбиоза, как показано на модели *M. truncatula* (Lohar et al., 2006), так и на его более поздних стадиях (Bourcy et al., 2013; Berrabah et al., 2014). Первый пик возрастания уровня АФК в клетках кончиков активно растущих корневых волосков бобовых происходит уже через несколько секунд после добавления ризобияльных NF и длится до трех минут (Cardenas et al., 2008б). Причем, этот процесс носит системный характер. Так, кратковременный пик генерации АФК был обнаружен в листьях сои после 30 мин инокуляции корней *B. japonicum* (Fernandez-Göbel et al., 2019). При взаимодействии азотфиксирующих микросимбионтов с бобовыми у последних наблюдается только один пик возрастания уровня H_2O_2 (Lohar et al., 2007). Тогда как при бактериальных патогенезах пероксид водорода выполняет защитные функции и нарастание его концентрации происходит в две фазы, разделенные во времени (Bolwell et al., 2002).

Считается, что окислительная вспышка на ранних этапах симбиоза способствует передаче внутриклеточных сигналов и зависит от рецепторов к Nod-факторам, локализованным в плазмалемме клеток корня бобовых (Долгих и др., 2010; Fernandez-Göbel et al., 2019). Очевидно, что это является началом более

специфического процесса направления бактерий к сайтам инокуляции.

Через 360 мин при инфицировании ризобиями это явление в участках корня проростков гороха, различающихся по степени сформированности корневых волосков, становится выраженным и понижение уровня этой сигнальной молекулы в зонах адгезии и проникновения (II–III зоны) способствует повышенной колонизации и вторжению ризобий в эти участки корня (рис. 17). Вероятно, в этом случае пероксид водорода, наряду с сигнальной ролью, выполняет функции антибактериального агента, регулируя инфекционную нагрузку по зонам корня. По сравнению с эффективным штаммом *Rhizobium leguminosarum*, под влиянием неэффективных штаммов через 360 мин инокуляции уровень H_2O_2 становился ниже контроля. Исключение составлял эпикотиль, где уровень H_2O_2 значительно превышал контроль, что свидетельствует о развитии системного защитного сигнала. Возможно, это единственное проявление стрессового сигнала тревоги проростка при инокуляции неэффективным штаммом ризобий, отличающего реакцию при воздействии эффективным штаммом ризобий. Штаммы 1064 и 1065, являясь неэффективными на конечных стадиях бобово-ризобиального симбиоза, по характеристике обладают повышенной конкурентноспособностью (Паспорт культур). Конкурентноспособность ризобиальных бактерий определяется многими факторами, в частности, их возможностями усваивать питательные вещества, синтезировать необходимые аминокислоты и азотистые основания, размножаться, передавать сигналы. Как было показано на мутантах *Sinorhizobium meliloti*, наибольшей нодулятивной конкурентноспособностью обладают бактерии со сниженной интенсивностью деления и миграционной активностью (Онищук и др., 2001). Кроме того, важную роль играет антибиоз в отношении остальных микроорганизмов, включая другие ризобиальные штаммы (Онищук, 2017). Вероятно, по этой причине штаммы 1064 и 1065, несмотря на менее интенсивную, по сравнению с эффективным штаммом, адгезию, приводили к понижению уровня H_2O_2 почти во всех зонах корня, что может облегчать их проникновение.

Представляет интерес изменение концентрации H_2O_2 в эпикотиле (рис. 12,

13). Так как данный орган проростков не контактировал с бактериями, то изменение уровня пероксида водорода свидетельствует о развитии системного сигнала. Снижение уровня H_2O_2 , причем, примерно в равной степени при взаимодействии с эффективным штаммом ризобий и патогенами в течение 5 мин (рис. 12), могло быть вызвано сигнальными событиями, являющимися следствием возникшего потенциала действия (ПД). Известно, что ПД у высших растений является неспецифическим и информации о природе раздражителя не несет. Однако он способен вызывать неспецифический функциональный ответ в различных органах растения (Пятыгин и др., 2008б). Однако через 360 минут снижение уровня H_2O_2 в эпикотиле при взаимодействии с эффективным штаммом *Rlv* и повышение в варианте с неэффективными (рис. 13), хотя также является проявлением системного сигнала, но вызвано различиями по составу Nod-факторов, индивидуальных для каждого штамма *Rlv* (Heidstra, Bisseling, 1996). Nod-факторы, взаимодействуя с рецепторами клеток корня гороха (Жуков и др., 2008), вероятно, активируют тАЦ, что приводит к изменению ионных потоков и индукции ПД.

Таким образом, кратковременная инокуляция (5 мин) эффективным штаммом ризобий в большей степени повышает концентрацию пероксида водорода по сравнению с обоими видами патогенов (*P. syringae* pv. *pisi*, *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*), особенно в зонах, содержащих зачатки и молодые корневые волоски. Через 360 мин взаимодействия со всеми штаммами *R. leguminosarum* происходило снижение уровня H_2O_2 в этих участках корня проростков гороха (зачатки и молодые корневые волоски). Вероятно, это явление способствует повышенной колонизации и вторжению мутуалиста в эти участки корня (рис. 13).

3.5. Влияние n-бутирил-цАМФ и сурамина на изменение концентрации эндогенного H_2O_2 в зонах роста корня и в эпикотиле при воздействии *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *P. syringae* pv. *pisi* или *C. sepedonicus*

Сигналинг в растительных клетках обеспечивается взаимодействующими каскадами различных сигнальных систем (Mazars et al., 2010; Saxena, et al., 2016).

При этом важны самые ранние изменения в сигнальном статусе растительных клеток, потому что в этот период происходит перепрограммирование генома, соответствующее стрессовой нагрузке (Mazars et al., 2010). Немаловажным является способность вторичных мессенджеров оказывать влияние на активность компонентов других сигнальных систем.

Исходя из этого, представляло интерес исследовать возможную роль цАМФ в регуляции концентрации H_2O_2 в зонах роста корня проростков гороха, в том числе при кратковременном воздействии *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *P. syringae* pv. *pisii* или *C. sepedonicus*. Для этого был проведен модельный эксперимент с использованием аналога цАМФ *n*-бутирил-цАМФ – жирорастворимого цАМФ (*б*-цАМФ), легко проникающего через клеточную стенку и мембрану.

У неинокулированных бактериями проростков гороха инкубация в течение 10 мин на растворах, содержащих различные концентрации *n*-бутирил-цАМФ, привела к дозозависимому изменению уровня внутриклеточного цАМФ во всех зонах проростков гороха и выявила концентрационную зависимость в изменении содержания H_2O_2 (табл. 3; рис. 14).

У неинокулированных корней проростков гороха под влиянием *б*-цАМФ в концентрациях 5 и 10 нМ уровень H_2O_2 повышался примерно одинаково во всех зонах роста и, в меньшей степени, в эпикотиле. *n*-*б*-цАМФ в концентрации 30 нМ не оказывал никакого эффекта, а при более высокой концентрации (50 нМ *n*-*б*-цАМФ) способствовал снижению уровня H_2O_2 в зонах роста корня (рис. 14).

Для дальнейшего изучения влияния бактерий на фоне повышенного содержания цАМФ в клетках корней проростков гороха были выбраны концентрации 10 и 50 нМ *n*-бутирил-цАМФ, как оказавшие стимулирующий и ингибирующий эффекты, соответственно (рис. 14).

Кратковременная инокуляция, в течение 5 мин, эффективным штаммом *Rlv* 1022 индуцировала снижение уровня H_2O_2 во всех зонах при действии *n*-бутирил-цАМФ в концентрациях 10 и 50 нМ, кроме эпикотиля в варианте «*Rlv*+ 10 нМ *n*-бутирил-цАМФ». При этом при использовании 10 нМ *n*-бутирил-цАМФ наиболее интенсивно уровень H_2O_2 падал во II и III зонах, а при 50 нМ *n*-бутирил-цАМФ

ингибирование уровня H_2O_2 было примерно равным во всех зонах (рис. 15).

Таблица 3

Влияние п-бутирил-цАМФ и инокуляции бактериями (*Rlv*, *Psp*, *Cs*) на содержание цАМФ в клетках зон корня проростков гороха.

Вариант	Зоны корня					эпикотиль
	I	II	III	IV	V	
контроль	4.9 ± 0.5	3.9 ± 0.3	3.6 ± 0.3	3.4 ± 0.3	3.5 ± 0.3	3.4 ± 0.3
<i>Rlv</i>	5.3 ± 0.5	5.0 ± 0.5	4.8 ± 0.4	5.0 ± 0.4	5.2 ± 0.4	3.3 ± 0.2
<i>Psp</i>	4.3 ± 0.3	5.0 ± 0.5	4.3 ± 0.3	4.9 ± 0.4	5.0 ± 0.5	3.5 ± 0.3
<i>Cs</i>	18.8 ± 1.6	21.6 ± 1.9	17.2 ± 1.5	19.3 ± 1.8	21.2 ± 1.9	26.9 ± 2.1
5 нМ б-цАМФ	5.8*±0.6	5.3*±0.5	4.8*±0.5	4.7*±0.4	4.6*±0.4	3.9±0.4
10 нМ б-цАМФ	5.9*±0.6	5.5*±0.5	5.1*±0.5	4.9*±0.5	4.8*±0.5	3.8±0.4
30 нМ б-цАМФ	6.3*±0.5	6.0*±0.4	6.0*±0.2	6.0*±0.3	5.9*±0.4	3.6±0.3
50 нМ б-цАМФ	7.2*±0.6	6.3*±0.6	6.1*±0.6	6.1*±0.5	6.2*±0.5	4.3*±0.4
10 нМ б-цАМФ + <i>Rlv</i>	7.9*±0.7	6.5*±0.6	6.4*±0.6	6.7*±0.6	6.8*±0.6	4.2±0.4
10 нМ б-цАМФ + <i>Psp</i>	7.1*±0.7	6.9*±0.7	6.9*±0.7	7.1*±0.7	7.2*±0.7	4.3±0.4
10 нМ б-цАМФ + <i>Cs</i>	21.3*±2.1	24.9*±2.2	22.2*±2.2	22.5*±2.9	23.2*±2.5	28.1*±2.9
50 нМ б-цАМФ + <i>Rlv</i>	8.4±0.7	7.2±0.7	7.1±0.7	7.1±0.6	7.3±0.6	4.8±0.5
50 нМ б-цАМФ + <i>Psp</i>	7.4±0.7	7.3±0.7	6.9±0.7	6.8±0.6	7.0±0.7	4.7±0.5
50 нМ б-цАМФ + <i>Cs</i>	21.0*±2.0	23.0*±2.3	22.0*±2.0	21.8*±2.0	24.2*±2.4	28.0*±2.5

Примечание: в качестве контроля взяты проростки гороха, инкубированные на воде.

«*Rlv*» – проростки, инокулированные *Rhizobium leguminosarum* в течение 5 мин.; «*Psp*» – проростки, инокулированные *Pseudomonas syringae* в течение 5 мин.; «*Cs*» – проростки, инокулированные *Clavibacter sepedonicus* в течение 5 мин. «нМ б-цАМФ» – проростки, инкубированные с указанной концентрацией (нМ) б-цАМФ (10 мин.); «б-цАМФ+бактерии» – проростки, инкубированные с указанной концентрацией б-цАМФ (10 минут) и последующей инокуляцией соответствующим видом бактерий в течение 5 мин.

* - различия статистически значимы ($P \leq 0.05$). при сравнении групп «5 нМ п-б-цАМФ», «10 нМ п-б-цАМФ», «30 нМ п-б-цАМФ», «50 нМ п-б-цАМФ» с общей группой «контроль», в качестве которой использовали проростки, инкубированные на воде; при сравнении групп «10 нМ п-б-цАМФ+*Rlv*», «10 нМ п-б-цАМФ+*Psp*», «10 нМ п-б-цАМФ+*Cs*» с общей контрольной «10 нМ п-б-цАМФ»; при сравнении групп «50 нМ п-б-цАМФ+*Rlv*», «50 нМ п-б-цАМФ+*Psp*», «50 нМ п-б-цАМФ+*Cs*» с общей контрольной «50 нМ п-б-цАМФ»; по критерию Даннета.

n = 3, m ± S.E.; P ≤ 0.05.

Под воздействием *Psp* и *Cs* концентрация H_2O_2 также снижалась во всех участках и эпикотиле при обеих концентрациях *n*-бутирил-цАМФ, причем в большей степени, чем с *Rlv*. При этом в варианте «10 нМ *n*-бутирил-цАМФ + *Cs*» концентрация H_2O_2 в I зоне и в эпикотиле была ниже, чем в 10 нМ *n*-бутирил-цАМФ + *Psp*», во II, III зонах – выше. В IV и V зонах уровень H_2O_2 был примерно одинаковым при воздействии обоих видов патогенов (рис. 15). В случае предварительной инкубации корней проростков гороха с 50 нМ *n*-бутирил-цАМФ при воздействии обоими видами патогенов происходило снижение уровня H_2O_2 примерно в равной степени, кроме меристемы (I участок) (рис. 15).

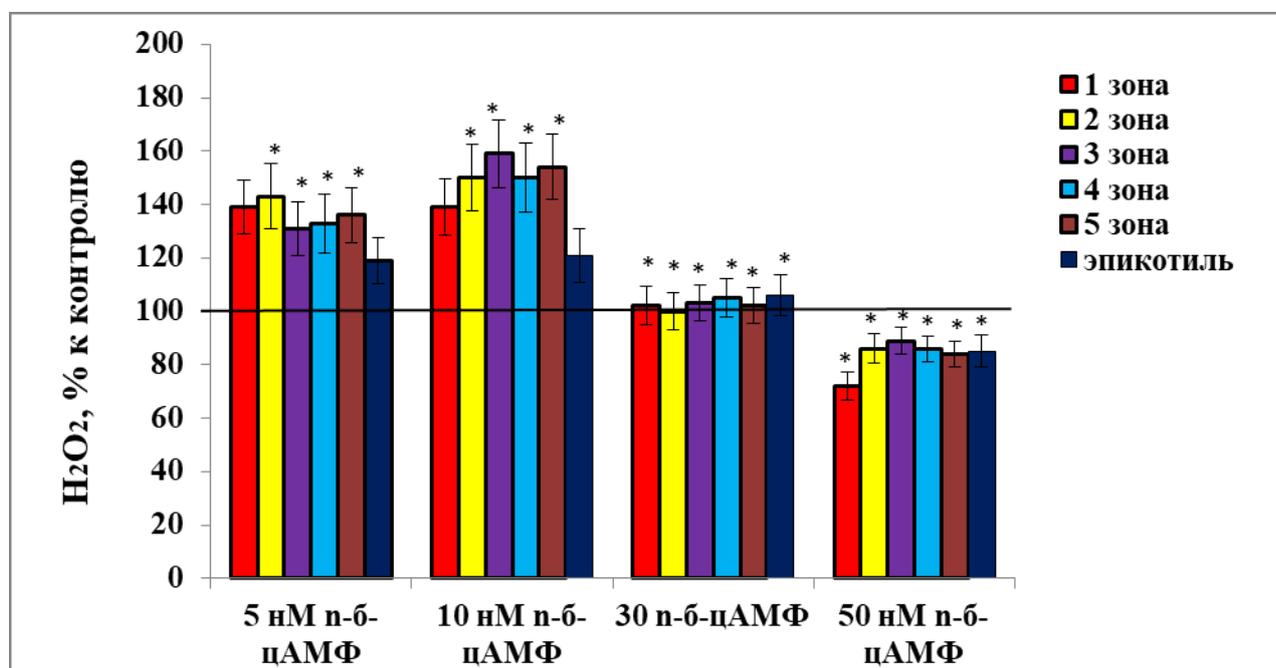


Рисунок 14. Влияние различных концентраций *n*-бутирил-цАМФ на изменение уровня H_2O_2 в зонах роста корня и эпикотиле неинокулированных бактериями проростков гороха. В качестве контроля (100%) были взяты проростки, инкубированные на воде. $n = 3$, $m \pm S.E.$
 * - различия статистически значимы ($P \leq 0.01$) при сравнении между собой групп «участок+5 нМ *n*-бутирил-цАМФ», «участок+10 нМ *n*-бутирил-цАМФ», «участок+30 нМ *n*-бутирил-цАМФ», «участок+50 нМ *n*-бутирил-цАМФ» по критерию Ньюмена-Кейсла.

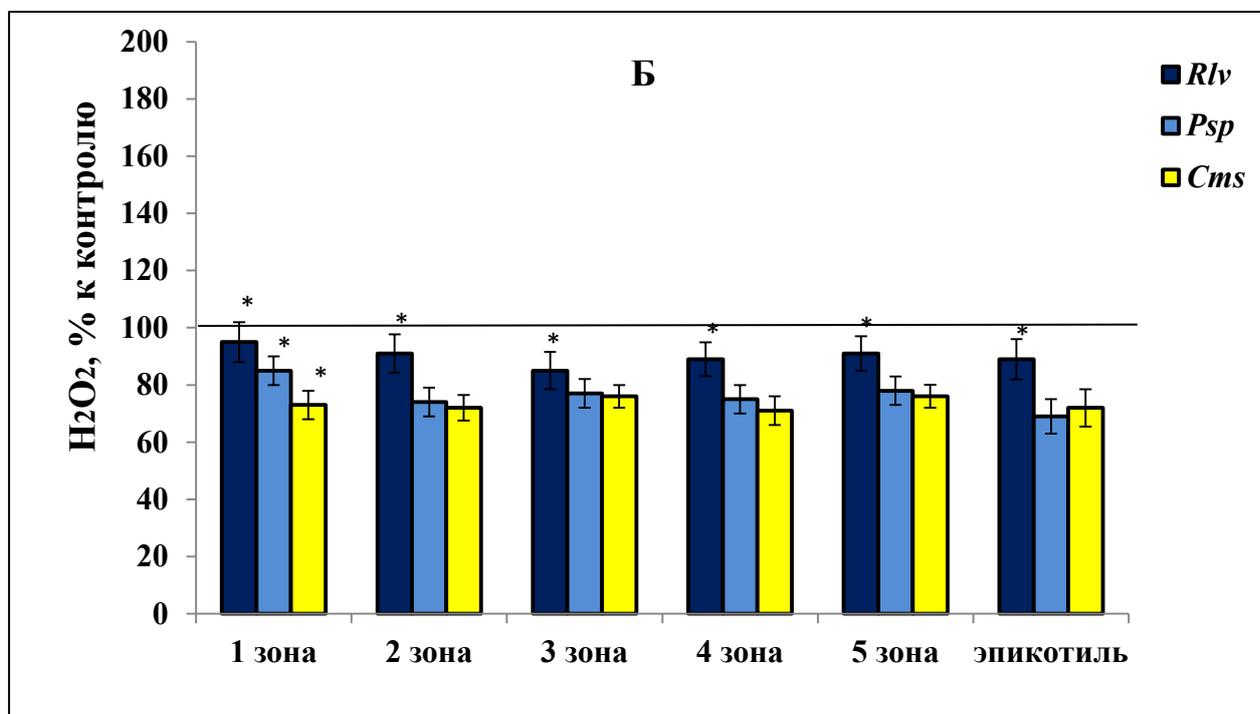
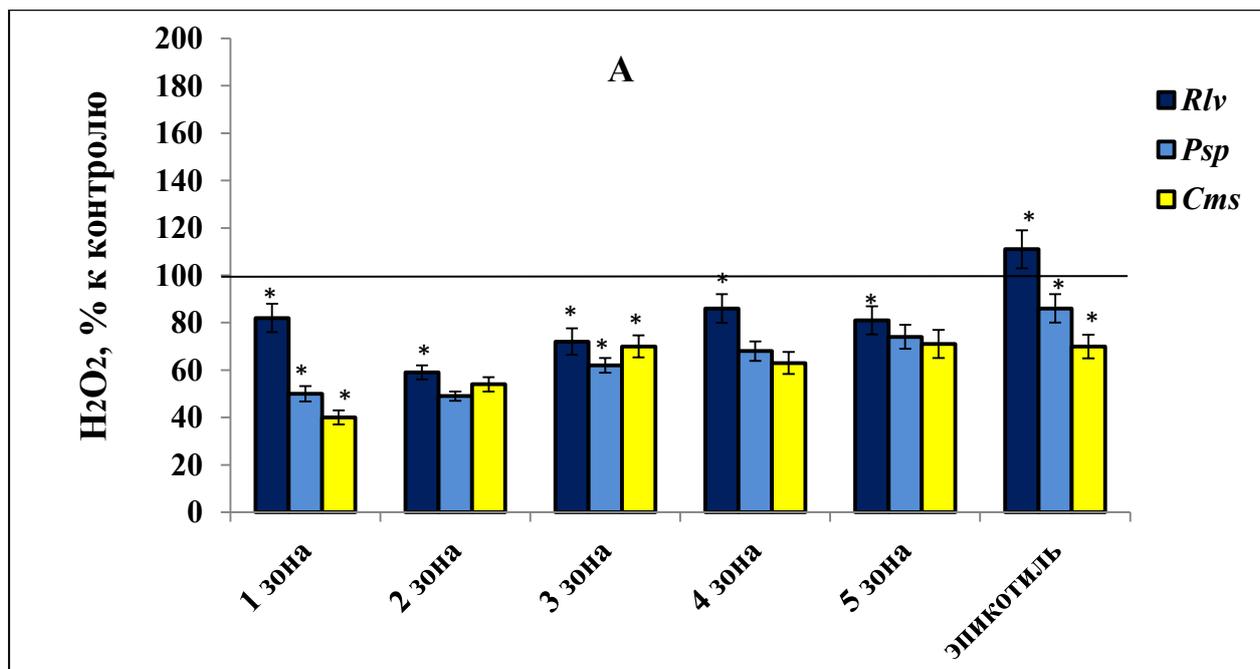


Рисунок 15. Влияние инокуляции *R. leguminosarum* bv.vicea/*P. syringae* pv. *psi*/*C. sepedonicus* на изменение концентрации H_2O_2 в зонах роста корня проростков гороха после на фоне воздействия п-бутирил-цАМФ:

А – бактерии + 10 нМ п-бутирил-цАМФ»; в качестве контроля (100%) принят вариант «неинокулированные бактериями проростки гороха + 10 нМ п-бутирил-цАМФ»

Б – бактерии + 50 нМ п-бутирил-цАМФ»; в качестве контроля (100%) принят вариант «неинокулированные бактериями проростки гороха + 50 нМ п-бутирил-цАМФ».

n = 3, m ± S.E.

* - различия статистически значимы ($P \leq 0.05$) при сравнении между собой групп «*Rlv* 1022+п-бутирил-цАМФ», «*Psp*+п-бутирил-цАМФ», «*Cs*+п-бутирил-цАМФ» по критерию Ньюмена-Кейсла.

Для более полного доказательства участия цАМФ в регуляции внутриклеточного уровня H_2O_2 были проведены эксперименты с участием сурамина, ингибитора тАЦ, в растворе которого инкубировали проростки гороха в течение 30 мин, после чего определяли концентрацию цАМФ и H_2O_2 . Исследования показали, что под его воздействием концентрация цАМФ в зонах роста корня снижалась примерно на 40%, а содержание H_2O_2 во всех зонах корня и эпикотиле возрастало (табл.4; рис. 16).

Таблица 4

Влияние сурамина (800 мкМ) и последующей инокуляции бактериями на изменение содержания цАМФ в клетках зон корня проростков гороха, нмоль/мг белка.

Вариант	Зоны					
	I	II	III	IV	V	Эпикотиль
Контроль	5.2 ± 0.5	4.2 ± 0.38	3.6 ± 0.31	3.4 ± 0.32	3.5 ± 0.33	3.4 ± 0.31
Сурамин	2.2 ± 0.21	1.3 ± 0.15	1.2 ± 0.12	1.7 ± 0.14	1.8 ± 0.13	3.4 ± 0.3
Сурамин + <i>Rlv</i>	2.7* ± 0.21	2.0* ± 0.18	1.6* ± 0.11	1.6 ± 0.12	1.8 ± 0.12	3.5 ± 0.3
Сурамин + <i>Psp</i>	2.2 ± 0.21	2.1* ± 0.18	1.9* ± 0.15	1.5 ± 0.15	1.3* ± 0.1	3.3 ± 0.2
Сурамин + <i>Cs</i>	2.4* ± 0.1	2.3* ± 0.2	1.9* ± 0.18	1.9 ± 0.17	1.8 ± 0.16	3.6 ± 0.29

Примечание: в качестве контроля взяты проростки гороха, инкубированные на воде.

«сурамин» – проростки, инкубированные с 800 мкМ сурамина (30 минут) «сурамин+*Rlv*» – проростки, инкубированные с 800 мкМ сурамина (30 минут) с последующей инокуляцией *Rhizobium leguminosarum* в течение 5 мин.; «сурамин +*Psp*» – проростки, инкубированные с 800 мкМ сурамина (30 минут) с последующей инокуляцией *Pseudomonas syringae* в течение 5 мин.; «сурамин +*Cs*» – проростки, инкубированные с 800 мкМ сурамина (30 минут) с последующей инокуляцией *Clavibacter sepedonicus* в течение 5 мин.

* - различия статистически значимы ($P \leq 0.05$) при сравнении групп «сурамин+*Rlv* 1022», «сурамин+*Psp*», «сурамин+*Cs*» с общей контрольной группой «сурамин» по критерию Даннета.

n = 3, m ± S.E.

Последовательная инкубация проростков с сурамином, а затем 5 мин с соответствующими микроорганизмами незначительно снизила концентрацию H_2O_2 (рис. 17).

При искусственном понижении концентрации цАМФ с дальнейшим воздействием *Rlv* содержание H_2O_2 в участках корня проростков гороха оставалось на уровне контроля (V зона и эпикотиль), либо незначительно снижалось (I-IV зоны) в сравнении с вариантом «сурамин» (рис. 17).

Под влиянием *Psp* уровень внутриклеточного H_2O_2 в зонах роста корня

значительно снижался во всех участках корней проростков гороха (рис. 17). Инокуляция *Cs* также значительно снижала уровень H_2O_2 во всех участках корней проростков гороха, аналогично с вариантом «*Psp*» (рис. 17).

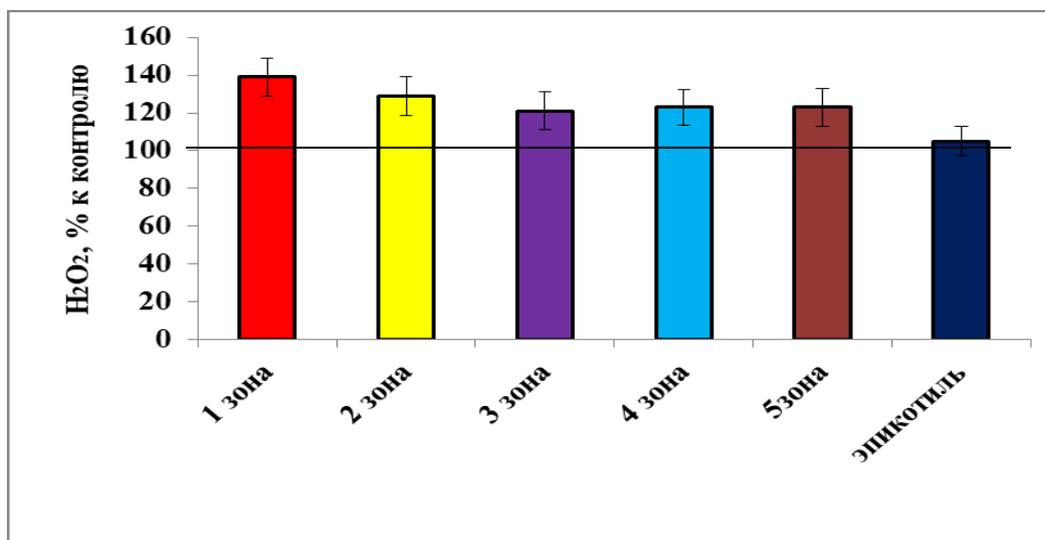


Рисунок 16. Влияние сурамина на концентрацию H_2O_2 в зонах роста корня неинокулированных бактериями проростков гороха. В качестве контроля приняты корни проростков гороха, инкубированные на воде.
 $n = 3$, $m \pm S.E.$

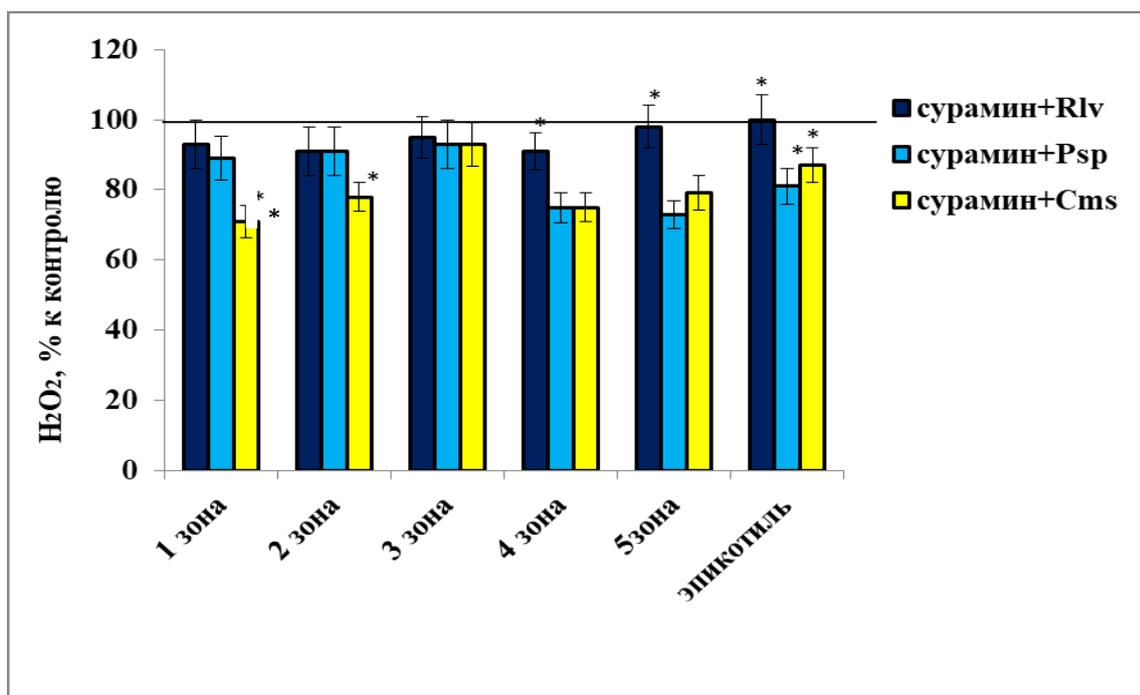


Рисунок 17. Влияние сурамина на концентрацию H_2O_2 в зонах роста корня проростков гороха при инокуляции *R. leguminosarum* bv. *vicea*, *P. syringae* pv. *pisii*, *C. sepeдонicus* в течение 5 минут. В качестве контроля (100%) приняты корни проростков гороха, инкубированные в 800 мкМ сурамина в течение 30 минут.
 $n = 3$, $m \pm S.E.$

* - различия статистически значимы ($P \leq 0.05$) при сравнении между собой групп «сурамин+*Rlv*», «сурамин+*Psp*», «сурамин+*Cs*» по критерию Ньюмена-Кейсла

По литературным данным, цАМФ может быть одним из триггеров, запускающих молекулярные механизмы, способствующие повышению уровня АФК, главным образом, внутриклеточного пероксида водорода (Bindschedler et al., 2001; Sabetta et al., 2016, 2019). В мутантах арабидопсиса, отличающихся избыточным содержанием внутриклеточного цАМФ, при инфицировании *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* задерживалось развитие реакции сверхвысокой чувствительности (СВЧ), а также понижались уровни внутриклеточного кальция и пероксида водорода (Sabetta et al., 2019). Наши данные подтверждают, что как повышенный, так и пониженный уровни цАМФ оказывают влияние на концентрацию H_2O_2 в клетках корня проростков гороха. Наблюдаемый эффект в изменении уровня H_2O_2 от последовательного насыщения клеток корня гороха цАМФ и дальнейшей инокуляции бактериями можно объяснить тем, что под их воздействием увеличивалось содержание цАМФ в клетках, которое «накладывалось» на уже имеющийся повышенный вследствие инокуляции бактериями уровень эндогенного цАМФ. Снижение концентрации внутриклеточного цАМФ на 40% в зонах роста корня стимулировало повышение уровня H_2O_2 , что также служит доказательством влияния цАМФ на изменение концентрации АФК, в том числе H_2O_2 . Очевидно, что данный феномен должен затрагивать как пероксид-производящие, так и пероксид-утилизирующие ферменты. Представляется, что цАМФ может оказывать на активность таких ферментов опосредованное влияние, например, через нуклеотид-зависимые кальциевые ионные каналы в клетках корня гороха. Существование таких каналов у многих видов и в различных органеллах растительных клеток показано в литературе (Романенко, Ломоватская, 2017; Ordoñez et al., 2014). Изменение концентрации внутриклеточного цАМФ стимулирует деятельность кальциевых каналов, что приводит к повышению уровня внутриклеточного кальция и может модулировать, например, НАДФН-оксидазу (Poovaiah et al., 2002) и каталазу (Васильева и др., 2007а). Следующее за этим изменение концентрации пероксида водорода может оказывать влияние на пероксид-зависимые кальциевые каналы (Demidchik, 2018), что дополнительно приводит к изменению активности многих

кальций-зависимых ферментов (Васильева и др., 2007а). Например, в модельной системе горох – *R. leguminosarum* в чувствительных к инфицированию зонах было зафиксировано снижение уровня H_2O_2 и $O_2^{\cdot-}$ (Saeki, 2011) наряду с осцилляциями внутриклеточного кальция (Granqvist et al., 2015).

Проведенные нами эксперименты позволяют заключить, что концентрация H_2O_2 , в том числе внутриклеточного пероксида водорода, в клетках корня проростков гороха и эпикотиле зависит, в том числе, от изменения концентрации эндогенного цАМФ.

Причем воздействие *Rlv* приводило к менее интенсивному снижению уровня H_2O_2 по сравнению с инокуляцией *Psp* как в условиях искусственного избытка, так и недостатка концентрации цАМФ. В то же время, инокуляции патогеном картофеля *Cs* и специфическим для гороха патогеном *Psp* примерно в равной степени значительно снижали уровень H_2O_2 во всех участках корней проростков гороха (рис. 17).

3.6. Влияние экзогенного H_2O_2 на активность тАЦ и рАЦ, выделенных из клеток корней проростков гороха после инокуляции эффективным штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *P. syringae* pv. *pisi*, *C. sepedonicus*

Регуляция сигнальной сети растений осуществляется, в том числе, за счет модулирующей активности вторичных мессенджеров, оказывающих активирующий/ингибирующий эффект на ферменты первого порядка сигнальных систем. Поэтому было изучено влияние пероксида водорода на активность тАЦ и рАЦ, выделенных из клеток корня проростка гороха.

В экспериментах применяли несколько концентраций пероксида водорода: 100 и 260 нМ, 2.6 мкМ и 26мкМ (рис. 18). Пероксид водорода оказывали дозозависимый ингибирующий эффект на активность рАЦ (коэффициент корреляции $r=(-0.37)$ при $P\leq 0.05$), а также тАЦ (коэффициент корреляции $r=(-0.68)$ при $P\leq 0.05$) (рис. 18 А).

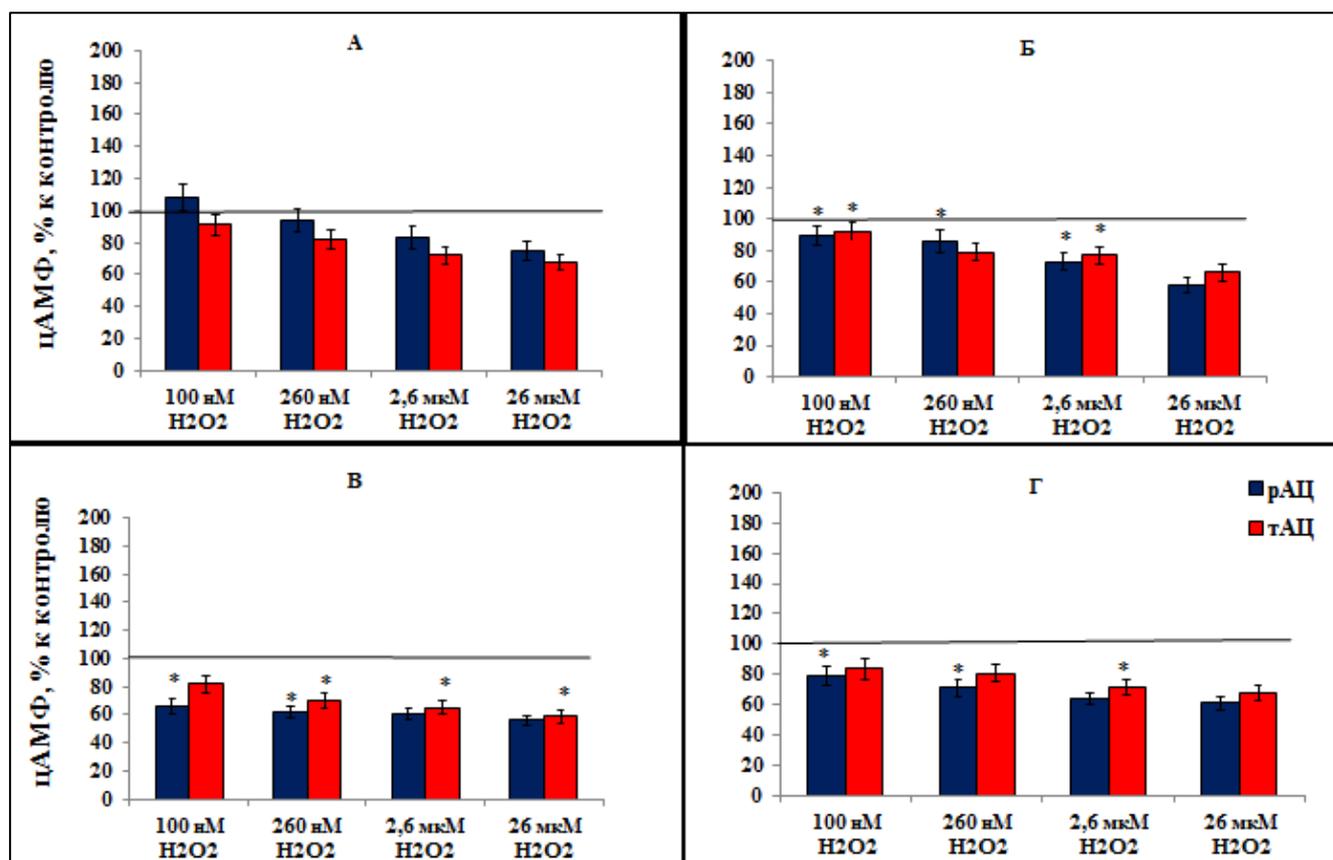


Рисунок 18. Влияние различных концентраций H_2O_2 и инокуляции бактериями на активность тАЦ и рАЦ в корнях проростков гороха: А – неинокулированные проростки + H_2O_2 ; Б – $H_2O_2 + Rlv1022$; В – $H_2O_2 + Psp$; Г – $H_2O_2 + Cs$. Контролем для варианта «А» служили проростки, инкубированные на питательной среде без бактерий. Контролем для вариантов «Б, В, Г», служили образцы из варианта «А». $n = 3$, $m \pm S.E.$ * - различия статистически значимы ($P \leq 0.05$) при сравнении между собой групп «Б», «В», «Г» по критерию Ньюмена-Кейсла.

Очевидно, что существует отрицательная корреляция воздействия экзогенного H_2O_2 в различных концентрациях на активность обеих форм аденилатциклазы. Аналогичное явление наблюдалось при предворительном инокулировании корней проростков гороха всеми видами испытуемых бактерий (табл. 5).

После инокуляции проростков гороха эффективным штаммом *Rlv* в течение 5 мин из корней получали гомогенат, содержащий тАЦ и рАЦ. Добавление к нему пероксида водорода приводило к существенному ингибированию активности обеих форм аденилатциклазы (при воздействии на тАЦ ($r = -0.79$) при $P \leq 0.05$), рАЦ ($r = -0.91$) при $P \leq 0.05$) причем ингибирование также было дозозависимое: наибольшая концентрация H_2O_2 вызывала самое сильное ингибирование (рис. 18 Б). После воздействия *Psp* активность обеих форм АЦ снижалась (при воздействии на тАЦ ($r = -0.69$) при $P \leq 0.05$; при воздействии на рАЦ ($r = -0.74$) при

$P \leq 0.05$) в большей степени, чем при воздействии *Rlv*, при всех концентрациях экзогенного H_2O_2 (рис. 18 В). Аналогичный ингибирующий эффект наблюдался после инокуляции *Cs*: активность рАЦ ($r = -0.65$) при $P \leq 0.05$) и тАЦ ($r = -0.73$ при $P \leq 0.05$) (рис. 18 Г).

Таблица 5

Зависимость активности тАЦ и рАЦ, выделенных из корней проростков гороха, от концентраций экзогенного H_2O_2

Варианты	H_2O_2		<i>Rlv</i> + H_2O_2		<i>Psp</i> + H_2O_2		<i>Cs</i> + H_2O_2	
	тАЦ	рАЦ	тАЦ	рАЦ	тАЦ	рАЦ	тАЦ	рАЦ
Коэффициент корреляции, <i>r</i>	-0.68	-0.73	-0.79	-0.91	-0.69	-0.74	-0.73	-0.65
Величина случайной ошибки, $t_{набл}$	2.89	3.35	4.1	6.8	2.99	3.47	3.357	2.67
	знач	знач	знач	знач	знач	знач	знач	знач
Теснота связи	заметная, обратная	высокая, обратная	высокая, обратная	весьма высокая, обратная	заметная, обратная	высокая, обратная	высокая, обратная	заметная, обратная

Примечание: « H_2O_2 » – АЦ неинокулированные корни проростков гороха.

«*Rlv*+ H_2O_2 » – корни проростков гороха, инокулированные *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia*.

«*Psp*+ H_2O_2 » – корни проростков гороха, инокулированные *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*.

«*Cms*+ H_2O_2 » – корни проростков гороха, инокулированные *Clavibacter sepedonicus*.

$n = 10$, $m \pm S.E.$, $P \leq 0.05$.

Взаимовлияние вторичных мессенджеров различных сигнальных систем имеет важное значение во многих метаболических процессах растений. Известно, что существует тесное взаимодействие пероксида водорода с Ca^{2+} и NO в онтогенезе растений и при формировании защитного ответа. Установлена способность H_2O_2 опосредованно влиять на синтез эндогенного NO (Lin et al., 2012; Shi et al., 2015). Также известна роль пероксида водорода в регуляции уровня Ca^{2+} (Wu et al., 2010). В частности, V. Demidchik с соавт. (2007) показали, что экзогенный H_2O_2 приводит к дозозависимому временному увеличению уровня Ca^{2+} в эпидермисе корня *Arabidopsis thaliana* (Demidchik et al., 2007).

Исходя из того, что пероксид водорода в высоких концентрациях может влиять на функциональную активность мембранных белков (Веселов и др., 2001; Лукаткин, 2002), в настоящих экспериментах использовали более низкие экзогенные концентрации H_2O_2 (нано- и микромолярные): 100 и 260 нМ, 2.6 мкМ и 26 мкМ. По результатам проведенных исследований, экзогенный H_2O_2 вызывал

подавление активности обеих форм аденилатциклазы (рис. 18).

Можно предположить, что влияние опытных концентраций H_2O_2 на активность рАЦ было связано с конформационными изменениями активного центра этого фермента. В пользу этого свидетельствует дозозависимый эффект от влияния различных концентраций пероксида водорода на изменение активности АЦ (рис. 18). Кроме того, по литературным данным, пероксид водорода может окислять некоторые аминокислоты (Arg, Pro, Lys, Met, Cys, Tyr, His) в составе активного центра ферментов (Stadtman, Levine, 2003), что приводит к изменению их активности. Следует отметить, что к обратимому окислению способны только серусодержащие аминокислоты (Kemp et al., 2008). Несмотря на то, что аминокислотная последовательность АЦ растений полностью не расшифрована, есть отдельные работы, посвященные выяснению первичной структуры фрагментов рекомбинантных белков, обладающих аденилатциклазной активностью, а также расшифрована нуклеотидная последовательность их каталитического центра (Al-Younis et al., 2015; Chatukuta et al., 2018). Проведенный нами подсчет аминокислотных последовательностей каталитического центра АЦ (AtKUP71-100) в составе мультибелкового комплекса K^+ -зависимой пермеазы 7 (AtKUP7) (Al-Younis et al., 2015), а также аденилатциклазы (AtLRRAC1), в комплексе с рецептором (NBS-LRR) (Chatukuta et al., 2018), показали наличие 27% и 28% аминокислот соответственно, которые, согласно литературным данным (Stadtman, Levine, 2003) могут подвергаться окислению пероксидом водорода. Весьма интересно, что в их число входит и аминокислотная пара Lys-Arg, которая в каталитическом центре АЦ отвечает за конверсию АТФ в цАМФ (Gehring, 2010). Таким образом, с большой долей вероятности можно полагать, что пероксид водорода оказывает влияние на каталитические функции этого фермента. Дополнительные подтверждающие данные могут быть получены в дальнейшем при исследовании кинетических параметров АЦ под влиянием пероксида водорода.

Как было показано ранее, кратковременное инокулирование корней проростков гороха *Rlv*, *Psp* или *Cs* приводило к модуляции активности тАЦ и рАЦ

и, соответственно, к изменению концентрации внутриклеточного цАМФ (рис. 9, 10).

Таким образом, в настоящих экспериментах из инокулированных корней проростков гороха были выделены тАЦ и рАЦ с уже модифицированной активностью. Кроме того, аденилатциклазы, выделенные из инокулированных тканей, уже испытали воздействие пероксида водорода, поскольку в этом варианте детектировался повышенный уровень H_2O_2 в клетках корня проростков гороха. В связи с этим можно полагать, что снижение активности тАЦ и рАЦ в этом случае связано с аддитивным комплексным эффектом эндогенного и экзогенного H_2O_2 . Можно предположить, что за весьма короткий промежуток времени, 5 мин, активность тАЦ могла быть модифицирована неспецифическими факторами вирулентности *Rlv* и *Psp*, такими как некоторые полисахариды и поверхностные белки бактерий, имеющие много общего у грамотрицательных бактерий (Chang et al., 2014). Кроме того, при инфицировании *Rlv* в клетках бобовых возникает кратковременный потенциал действия, запускающий новые метаболические программы у растений (Cooper, 2007). При этом модуляция активности рАЦ может осуществляться только опосредованно, вероятно, за счет других вторичных мессенджеров. Например, ранее была показана активация рАЦ из вакуолей клеток свеклы ионами кальция (Ломоватская и др., 2014). Очевидно, что локальное повышение концентрации пероксида водорода не только приводит к модуляции активности этой формы фермента (рис. 18), но также вызывает изменение концентрационного статуса других сигнальных молекул, в частности, ионов кальция. Это следует из литературных данных о пероксид-зависимых кальциевых ионных каналах, которые были обнаружены у многих видов растений, в том числе у гороха (Demidchik, 2018).

При инокулировании *Cs* и последующего влияния экзогенного пероксида водорода также наблюдался ингибирующий эффект на активность тАЦ и рАЦ. Проведенные ранее эксперименты показали, что инокуляция *Cs* приводила к сильной активации тАЦ и рАЦ (рис. 9) и незначительному увеличению уровня H_2O_2 в зонах роста корня проростков гороха (рис. 12). Это могло явиться

основной причиной «предварительной» модификации АЦ *in vivo*, что в дальнейшем отразилось на чувствительности АЦ к дополнительным концентрациям пероксида водорода *in vitro* (рис. 18 Г). Кроме этого, не следует забывать об особенностях действующего биотического фактора: как упоминалось ранее, кислые экзополисахариды Cs способны приводить к изменению электрохимического потенциала клеточной стенки и плазмалеммы клеток растений (Пятыгин, 2007). Интенсивность возникающего при этом потенциала действия индуцирует активацию различных ионных каналов, в том числе и кальциевых (Swarbreck et al., 2013). Очевидно, что при этом формируется индивидуальный пул ионов кальция, который и оказывает дополнительное влияние на активность тАЦ и рАЦ. Можно предположить, что в этом процессе могут участвовать и другие вторичные мессенджеры, например оксид азота, перекрестное взаимодействие которого с пероксидом водорода и кальцием уже показано в литературе (Mazars et al. 2010; Saxena et al., 2016).

Таким образом, активность тАЦ и рАЦ из клеток корня проростков гороха может модулироваться пероксидом водорода, а биотические стрессоры оказывают дополнительный эффект на этот феномен.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что на ранних этапах взаимодействия мутуалистические и фитопатогенные бактерии вызывают сходные реакции сигнальных систем растений. При этом, немаловажным является способность вторичных мессенджеров влиять на работу других сигнальных систем. Наиболее исследованной в становлении бобово-ризобиального симбиоза и в защитных реакциях при патогенезе является роль только некоторых вторичных мессенджеров, например, пероксида водорода, ионов кальция и NO. В тоже время участие в этих процессах компонентов аденилатциклазной сигнальной системы (АСС) и, в частности, цАМФ остается почти не изученной.

Поэтому цель данного исследования состояла в изучении активности компонентов АСС, а также их взаимосвязи с H_2O_2 в зонах корня проростков гороха, отличающихся по степени сформированности корневых волосков, на этапах адгезии бобово-ризобиального симбиоза и при инокуляции бактериальными патогенами различной специфичности.

Прикрепление бактерий к растительным клеткам является одним из самых ранних этапов взаимодействий, который сопровождается индукцией сигнальных событий. Поэтому на первом этапе был проведен сравнительный анализ интенсивности адгезии штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (*Rlv*), отличающихся по эффективности азотфиксирующего симбиоза, а также *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*) – патогена гороха; и *Clavibacter sepedonicus* (*Cs*) – патогена картофеля, в участках корня проростков гороха, различающихся по степени сформированности корневых волосков и эпикотиле.

По некоторым данным, особенности штаммов ризобий могут проявляться уже на этапе адгезии. В наших экспериментах необратимый характер адгезия *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* приобретала в участках корней, содержащих волоски различной степени зрелости, к 360 минутам взаимодействия, и была наиболее интенсивной у эффективного, по сравнению с неэффективными по азотфиксации штаммами.

Адгезия патогена гороха *Psp* достигала максимума к 15 минутам инкубации

в аналогичных с эффективным штаммом ризобий участках. Однако через 120 минут ее интенсивность снижалась, а к 360 минутам уже полностью исчезала, что свидетельствует об отсутствии специфических взаимодействий *Psp* с клетками корня гороха на данном этапе.

Адгезия патогена, чужеродного для гороха, *Cs*, полностью отсутствовала во всех зонах роста корня гороха как через 5 мин, так и через 15 мин инкубации. Поэтому эксперимент был ограничен этими временными точками.

Очевидно, что плотный контакт микроорганизмов с поверхностью корня проростков гороха может вызывать изменения в скорости роста, а также активности сигнальных систем растения. По результатам проведенных исследований, через 360 мин взаимодействия мутуалист и специфический патоген не оказывали существенного влияния на рост корней проростков гороха.

При этом, ризобии и патогены оказывали различный эффект на активность трансмембранной и «растворимой» форм аденилатциклаз (тАЦ, рАЦ) и, соответственно, уровень цАМФ в различных участках корня проростков гороха. Так, при кратковременном воздействии (5 мин-120 мин) эффективным штаммом *Rlv* и патогеном гороха *Psp* происходила активация тАЦ и рАЦ во всех зонах корня проростков гороха примерно в полтора-два раза, что во всех случаях приводило к повышению уровня цАМФ, за исключением варианта «*Psp* 120 мин». Однако, более длительная инокуляция эффективным штаммом *Rlv* (360 минут) вызывала резкое возрастание уровня цАМФ в участках с зачатками и молодыми корневыми волосками, в отличие от воздействия неэффективных по азотфиксации штаммов ризобий, а также *Psp*. Интересно, что из всех исследованных видов бактерий, наибольшую активацию тАЦ и рАЦ и возрастание уровня цАМФ во всех зонах роста корня вызывал неспецифический для гороха патоген *Cs* уже в первые 5-15 минут после инокуляции, несмотря на полное отсутствие адгезии. Таким образом, можно сделать вывод о важной роли эндогенного цАМФ в регуляции ранних стадий бобово-ризобиального симбиоза и защитных реакциях при патогенезе.

Пероксид водорода также относится к сигнальным молекулам растений.

Большое количество работ посвящено изучению его роли на поздних стадиях бобово-ризобиального симбиоза (24-48 часов). Наши исследования показали, что кратковременная инокуляция эффективным штаммом *Rlv*, 5 мин, индуцировала наиболее высокий уровень H_2O_2 во всех участках корня проростков гороха по сравнению с воздействием *Psp* и *Cs*.

Однако через 360 мин воздействия в вариантах с различными по азотфиксирующей эффективности штаммами *R. leguminosarum* уровень H_2O_2 опускался ниже контроля в зонах зачатков и молодых корневых волосков. При этом в эпикотиле при воздействии обоими неэффективными штаммами уровень H_2O_2 был намного выше контроля по сравнению с эффективным штаммом. Интересно, что на данном этапе при взаимодействии проростков гороха с эффективным штаммом ризобий изменения уровня H_2O_2 в зонах проникновения (зачатки и молодые корневые волоски) имело противоположную направленность по сравнению с цАМФ: если уровень цАМФ интенсивно возрастал, то концентрация пероксида водорода снижалась.

До сих пор остаются малоисследованными механизмы взаимовлияния компонентов одних сигнальных систем растений на другие, особенно под воздействием стрессоров различной природы.

Поэтому в следующей серии экспериментов исследовали возможную взаимосвязь между изменением уровней эндогенных цАМФ и H_2O_2 в зонах роста гороха, а также влияние на этот процесс воздействия бактериальными мутуалистами и фитопатогенами.

В результате проведенных исследований впервые показано, что как избыток, так и недостаток внутриклеточного цАМФ оказывает влияние на изменение концентрации эндогенного пероксида водорода в зонах роста корня проростков гороха. Так, экзогенный *n*-бутирил-цАМФ, аналог цАМФ, легко проникающий в растительные клетки, в низких концентрациях (5 и 10 нМ), способствовал повышению уровня H_2O_2 во всех участках корней проростков гороха, тогда как 30 нМ не оказывали эффекта, а 50 нМ снижали этот показатель во всех зонах. В тоже время снижение концентрации внутриклеточного цАМФ с

помощью сурамина, ингибитора тАЦ, приводило к возрастанию концентрации H_2O_2 во всех зонах корня.

Для дальнейших исследований были выбраны 10 и 50 нМ *n*-бутирил цАМФ, как оказавшие самый заметный эффект. Последующее за воздействием *n*-бутирил-цАМФ кратковременное (5 минут) инокулирование бактериями оказало неодинаковое влияние на содержание H_2O_2 : инфицирование *Rlv* после воздействия б-цАМФ в обеих концентрациях почти в одинаковой степени снизило концентрацию H_2O_2 во всех зонах, за исключением эпикотилия в варианте «10 нМ*n*-бутирил-цАМФ». Инокуляция обоими видами патогенов вызвала более значительное, по сравнению с *Rlv*, снижение уровня H_2O_2 в зонах роста корня проростков гороха.

Инокуляция *Rlv* после искусственного понижения концентрации цАМФ приводила к незначительному снижению содержания H_2O_2 в I-IV зонах корня проростков гороха. Воздействие *Psp* и *Cs* служило причиной более интенсивного, по сравнению с ризобиями, подавления уровня H_2O_2 в участках корней, содержащих сформированные корневые волоски, а также в эпикотиле.

Таким образом, проведенные исследования показали, что уровень эндогенного пероксида водорода в клетках проростков гороха зависит от изменения концентрации внутриклеточного цАМФ.

На следующем этапе были проведены исследования по влиянию экзогенного пероксида водорода на активность тАЦ и рАЦ в гомогенате, полученном из корня проростка гороха. В экспериментах применяли несколько концентраций пероксида водорода: 100 и 260 нМ, 2.6 мкМ и 26 мкМ. Было показано, что экзогенный пероксид водорода подавлял активность аденилатциклаз, причем эффект был дозозависимым. Так как используемые в экспериментах концентрации H_2O_2 (нано- и микромолярные) были недостаточно велики для того, чтобы вызывать повреждение мембраны, то вероятно, наблюдаемый эффект экзогенного H_2O_2 связан с конформационными изменениями активного центра тАЦ и рАЦ, локализованного в цитоплазме. Более существенное дозозависимое ингибирование активности обеих форм

аденилатциклазы в гомогенате наблюдалось после предварительной инокуляции целых корней проростков *Rlv*. При инокуляции *Psp* и *Cs* снижение активности рАЦ и тАЦ было более интенсивным, чем в варианте с *Rlv*. Наблюдаемый эффект, вероятно, связан с аддитивным комплексным действием эндогенного и экзогенного H_2O_2 , поскольку из инокулированных бактериями корней проростков гороха были выделены тАЦ и рАЦ с модифицированной активностью, которые уже испытали воздействие эндогенного пероксида водорода.

На основании результатов проведенного исследования, а также с привлечением литературных данных, можно представить следующую схему активации аденилатциклазной системы и ее взаимодействия с пероксидом водорода в клетках корня проростков гороха на ранних стадиях инокуляции азотфиксирующими симбиотическими или фитопатогенными бактериями (рис. 19).

По нашему мнению, цАМФ может быть опосредованным индуктором окислительной вспышки в клетках растений, что подтверждается некоторыми литературными данными. При инокулировании бактериями возрастание уровня цАМФ происходит в результате рецептор-опосредованной или неспецифической активации тАЦ, вероятно за счет PAMPs, Nod-факторов и других экзометаболитов бактерий. Изменение внутриклеточного пула цАМФ может оказывать регуляторный эффект на активность нуклеотид-активируемых кальциевых каналов, приводя к кратковременному повышению концентрации этой сигнальной молекулы в цитоплазме.

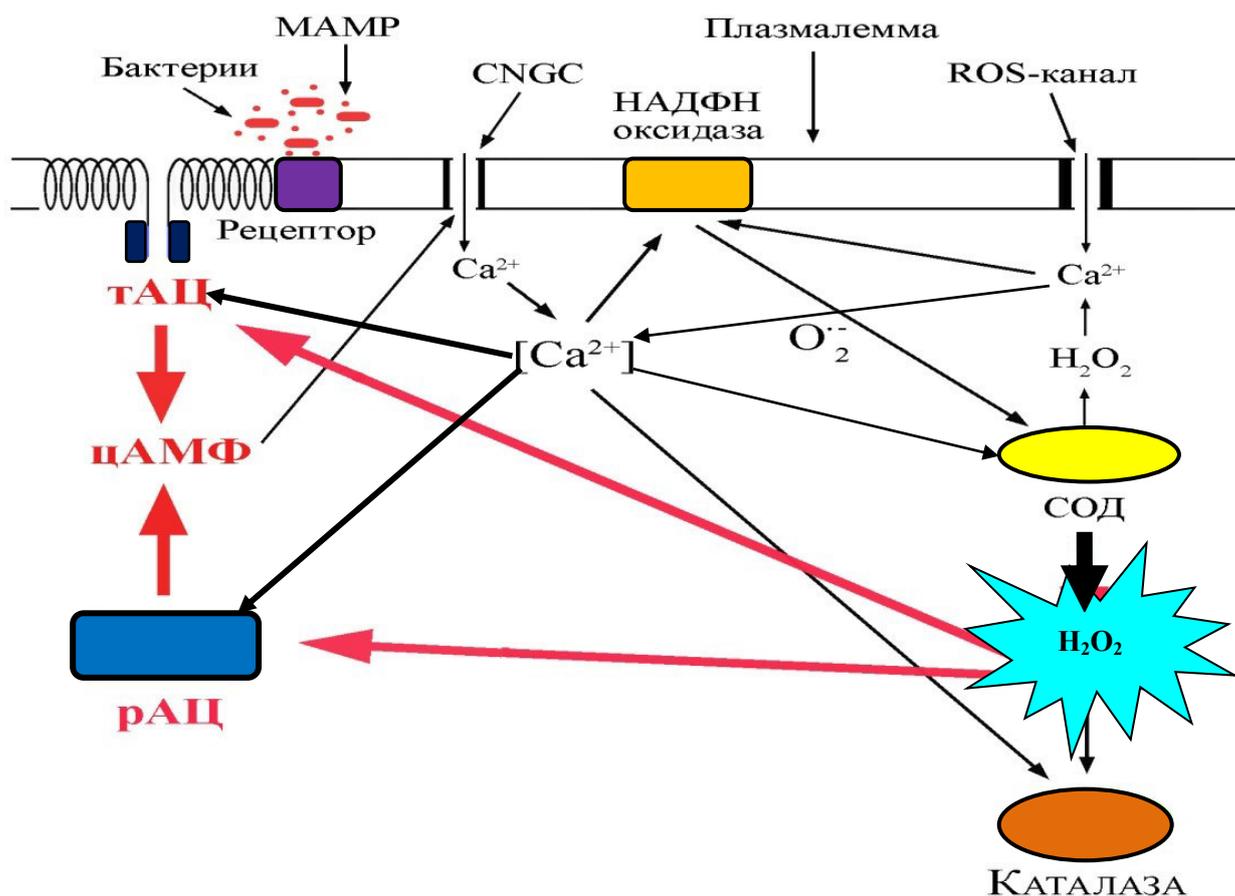


Рисунок 19. Схема активации аденилатциклазной и супероксидсинтазной сигнальных систем в клетках корней проростков гороха на ранних стадиях взаимодействия с *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *P. syringae* pv. *pisi* и *C. sepedonicus*.

СОД-супероксиддисмутаза

CNGC (cyclicnucleotide-gatedchannels) - регулируемые циклическими нуклеотидами ионные каналы.

MAMP (microbial associated molecular patterns) – микробныемолекулярныепаттерны

ROS-каналы – ионные каналы, зависимые от АФК

Это, в свою очередь, может привести к активации НАДФН-оксидазы и СОД. Локальное изменение концентрации вторичных мессенджеров могут оказывать активирующий/ингибирующий эффект на ферменты первого порядка сигнальных систем. Как отмечалось выше, кальций может модулировать активность НАДФН-оксидазы, СОД и каталазы, а по некоторым данным, и активность ГАЦ из клеток растений картофеля.

Таким образом, модуляция компонентов аденилатциклазной сигнальной системы в клетках корней проростков гороха в первые минуты взаимодействия как с бактериальным мутуалистом, так и со специфическим патогеном, носят

схожий характер. Различия в активности этой сигнальной системы происходят через несколько часов после инокуляции и, вероятно, направлены на запуск у гороха характерных для каждого типа взаимодействия процессов. Наиболее интенсивная, по сравнению с *Rlv* и *Psp* активация АЦ и наиболее высокий уровень цАМФ при взаимодействии корней проростков гороха с неспецифическим патогеном *Cs* может быть обусловлена характерными для данного штамма экзометаболитами.

Повышение уровня H_2O_2 в первые минуты взаимодействия с бактериями происходили во всех участках корней, независимо от их специфичности и специализации.

ВЫВОДЫ

1. В участках корня проростков гороха, различных по степени сформированности волосков, необратимая адгезия наблюдается только при инокуляции *R. leguminosarum* bv. *viciae*, причем ее интенсивность, вероятно, зависит от состава экзометаболитов штамма. Адгезия *P. syringae* pv. *pisi* исчезает через 360 минут после инокуляции, что указывает на ее обратимость, а адгезия *C. sepedonicus* отсутствует как через 5, так и через 15 минут взаимодействия.
2. В различных участках корня проростков гороха не выявлена взаимосвязь между возрастанием активности компонентов АСС (тАЦ, рАЦ, цАМФ) и интенсивностью адгезии *Clavibacter sepedonicus* и *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. При инокуляции *R. leguminosarum* bv. *viciae* наблюдается наиболее интенсивная активация обеих форм АЦ и возрастание уровня цАМФ в зонах зачатков и молодых волосков, что свидетельствует об участии АСС в развитии бобово-ризобиального симбиоза.
3. Инокуляция *R. leguminosarum* bv. *viciae*/*P. syringae* pv. *pisi*/*C. sepedonicus* вызывает изменение активности тАЦ и рАЦ и уровня цАМФ, а также H_2O_2 в эпикотиле проростков гороха, что является проявлением системного сигнала.
4. Инокуляция проростков гороха эффективным штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* 1022 в течение 5 минут вызывает более интенсивное, по сравнению с патогенами (*P. syringae* pv. *pisi* и *C. sepedonicus*) повышение уровня H_2O_2 во всех участках корня.
5. Воздействие в течение 360 мин штаммами *R. leguminosarum* bv. *viciae*, независимо от их эффективности по азотфиксации, вызывает снижение уровня H_2O_2 в восприимчивых для ризобиальной инфекции участках корня проростков гороха.
6. Уровень H_2O_2 в корнях проростков гороха зависит от концентрации эндогенного цАМФ. Экзогенный пероксид водорода ингибирует рАЦ и тАЦ из тканей корней проростков гороха. Предварительная инокуляция *R. leguminosarum* bv. *viciae*/*P. syringae* pv. *pisi*/*C. sepedonicus* усиливает ингибирующий эффект на активность тАЦ и рАЦ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акимова Г. П. Peroксидаза во взаимодействиях растений гороха с *Rhizobium* / Г. П. Акимова, М. Г. Соколова, Л. В. Нечаева, Г. Б. Лузова, Н. Г. Мартынова, Р. К. Салаяев, К. К. Сидорова // Доклады РАН. – 2002. – Т. 385. – №. 2. – С. 276-278.
2. Акимова Г. П. Изменение активности и каталитических свойств пероксидазы корней гороха на начальных этапах инфицирования *Rhizobium leguminosarum* // Агрoхимия. – 2004. – №. 1. – С. 86-90.
3. Акимова Г. П. Гормональный статус растений гороха при инфицировании бактериями *Rhizobium leguminosarum*/Г. П. Акимова, М. Г. Соколова, В. В. Верхотуров, С. Л. Белопухов // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2014. – №. 2.– С. 50-54.
4. Аленькина С. А. Сравнительная оценка индуктивного воздействия различных по антигенным свойствам лектинов азоспирилл на сигнальные системы корней проростков пшеницы / С. А. Аленькина, Л. П. Петрова, М. К. Соколова, М. П. Чернышова, К. А. Трутнева, В. А. Богатырев, В. Е. Никитина // Микробиология. – 2014. – Т 83, № 3. –С. 336-345.
5. Альбертс Б. Молекулярная биология клетки / Б. Альбертс, Д. Брей, Д. Льюис, М. Рэфф, К. Робертс, Д. Уотсон // М.: Мир. – 1994. – 768 с.
6. Антипчук А. Ф. Влияние липополисахаридов и глюканов двух штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* на формирование и эффективность их симбиоза с растениями гороха / А. Ф. Антипчук, Л. В. Косенко // Микробиология. – 2004. – Т. 73, №. 1. – С. 62-67.
7. Бовин А. Д. Роль гетеротримерных G-белков в сигнальной регуляции у растений / А. Д. Бовин, Е. А. Долгих // Экологическая генетика. – 2019. – Т. 17, №. 2. – С. 43-54.
8. Васильева Г.Г. / Г.Г. Васильева, А.К. Глянько, Н.В. Миронова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41, № 6. – С. 621-625.

9. Васильева Г. Г. Активность НАДФН-оксидазы в зонах корня проростков гороха, различающихся по чувствительности к ризобийной инфекции / Г. Г. Васильева, А. К. Глянько, А. А. Ищенко, Н. В. Миронова, Т. Е. Путилина // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія: Біологія. – 2007а. – № 2. – С. 34-42.
10. Васильева Г. Г. Содержание пероксида водорода и активность каталазы в участках корней гороха, проявляющих разную чувствительность к ризобийной инфекции / Г. Г. Васильева, А. К. Глянько, А. В. Миронова, В. Н. Шмаков // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія: Біологія. – 2007б. – В. 1 (10). – С. 59-64.
11. Вахрушева О. А. Система врожденного иммунитета у растений / О. А. Вахрушева, С. А. Недоспасов // Молекулярная биология. – 2011. – Т. 45, № 1. – С. 20-29.
12. Веселов А. П. Влияние экзогенного пероксида водорода на липопероксидацию и ферменты антиоксидантной защиты изолированных хлоропластов гороха / А. П. Веселов, Е. А. Чуманкина, И. В. Маркина // Вестник Нижегородского университета им. НИ Лобачевского. Серия: Биология. – 2001. – С. 164-167.
13. Воденеев В. А. Обратимое изменение внеклеточного рН при генерации потенциала действия у высшего растения *Cucurbita pepo* / В. А. Воденеев, В. А., С. С. Пятыгин // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, № 4. – С. 538-545.
14. Волин М. С. Механизмы передачи сигнала оксидант-оксид азота в сосудистой ткани / М. С. Волин, К. А. Дэвидсон, П. М. Камински, Р. П. Фейнгерш, К. М. Мохазаб // Биохимия. – 1998. – Т. 63. – С. 958-965.
15. Выскребенцева Э. И. Аденилатциклаза корнеплода сахарной свеклы: локализация и некоторые свойства / Э. И. Выскребенцева, Г. Г. Иванов // ДАН СССР. – 1981. – Т. 258. – В. 6. – С. 1515-1517.
16. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц – Электронная книга. – 1999. – 462 с.

17. Глянько А. К. Возможное участие перекиси водорода и салициловой кислоты в бобово-ризобиальном симбиозе / А. К. Глянько, Л. Е. Макарова, Г. Г. Васильева, Н. В. Миронова // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2005. – № 3. – С. 300-305.
18. Глянько А. К. Защитно-регуляторные механизмы при развитии бобово-ризобиального симбиоза / А. К. Глянько, Г. П. Акимова, М. Г. Соколова, Л. Е. Макарова, Г. Г. Васильева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 3. – С. 289-297.
19. Глянько А. К. Структурные и функциональные особенности НАДФН-оксидазы растений (обзор) / А. К. Глянько, А. А. Ищенко // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, № 5. – С. 509-518.
20. Глянько А. К. Роль Nod-фактора *Rhizobium* в индукции сигнальных систем растения при формировании бобово-ризобиального симбиоза / А. К. Глянько // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия: Биология. – 2014 – № 3. – С. 6-14.
21. Данкевич Л. А. Синтез патогенными для бобовых культур бактериями рода *Pseudomonas* гормонов, ингибирующих рост и развитие растений // Микробиологический журнал. – 2013. – Т. 75, № 6. – С. 46–50.
22. Джамеев В. Ю. Фосфолипидный сигналинг у растений / В. Ю. Джамеев // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия: Биология. – 2014. – № 3. – С. 80-95.
23. Джамеев В. Ю. Внутриклеточный сигналинг у растений: учебное пособие / В. Ю. Джамеев // Х: АССА – 2015. – 224 с.
24. Дмитриев А. П. Сигнальные молекулы растений / А. П. Дмитриев // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 3. – С. 465-474.
25. Долгих Е. А. Экспрессия рекомбинантных белков-рецепторов SYM10 и SYM37 *Pisum sativum*, вовлеченных в связывание липохитоолигосахаридов Nod-факторов / Е. А. Долгих, И. В. Леппянен, В. А. Жуков, В. Е. Цыганов, И. А. Тихонович // Экологическая генетика. – 2010. – Т. 8, № 1. – С. 4-11.

26. Долгих Е. А. Изучение биохимической функции рецептор-подобных киназ гороха Sym10, Sym37 и k1, необходимых для развития бобово-ризобиального симбиоза // Экологическая генетика. – 2017. – Т. 15. – № 4. – С. 4-12.
27. Желдакова Р. А. Фитопатогенные микроорганизмы: Учебно-методический комплекс / Р. А. Желдакова, В. Е. Мямин // МН: – БГУ – Минск. – 2005. – 116 с.
28. Жуков В. А. Генетический контроль специфичности взаимодействия бобовых растений с клубеньковыми бактериями / В. А. Жуков, Т. С. Рычагова, О. Ю. Штарк, А. Ю. Борисов, И. А. Тихонович // Экологическая генетика. – 2008. – Т. 6, № 4. – 12-19.
29. Загоскина Н. В. Активные формы кислорода и антиоксидантная система растений / Н. В. Загоскина, Л. В. Назаренко // Вестник Московского городского педагогического университета. Серия: Естественные науки. – 2016. – № 22. – С. 9-23.
30. Звягинцев Д. Г. Биология почв / Д. Г. Звягинцев, И. П. Бабьева, Г. М. Зенова // М.: Изд-во МГУ. – 2005. – Т. 445. – 439 с.
31. Иванов В. Б. Клеточные основы роста растений / В. Б. Иванов // М: Наука– 1974. – 223 с.
32. Иванова К. А. Защитные реакции в бобово-ризобиальном симбиозе: индукция и супрессия (обзор) / К. А. Иванова, В. Е. Цыганов // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 3. – С. 3-12.
33. Игуменов В. Л. Фосфодиэстераза циклических нуклеотидов из проростков пшеницы. Очистка, свойства, влияния системных фунгицидов / В. Л. Игуменов, Р. Н. Этингоф // Биохимия. – 1980. – Т. 45. – В. 10. – С. 1797-1803.
34. Ильин В. П. Методические особенности применения t-критерия Стьюдента в медико-биологических исследованиях // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – № 5. – С. 160-161.

- 35.Ишеева О. Д. Ферменты первичной защиты от окислительного стресса у вакуолей клеток растений / Дисс. канд. биол. наук. – 2010. – 162 с.
- 36.Кабашникова Л. Ф. Молекулярные механизмы взаимодействия растений и фитопатогенов: врожденный иммунитет / Л. Ф. Кабашникова // Журнал Белорусского государственного университета. Экология. – 2018. – № 2. – С. 26-37.
- 37.Карпун Н. Н. Механизмы формирования неспецифического индуцированного иммунитета у растений при биогенном стрессе / Н. Н. Карпун, Э. Б. Янушевская, Е. В. Михайлова // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50, № 5. – С. 540-549.
- 38.Кириенко А. Н. Особенности организации и функционирования у растений уникального класса рецепторных киназ, содержащих *lysm*-мотивы во внеклеточных доменах / А. Н. Кириенко, И. В. Леппянен, Е. А. Долгих // Экологическая генетика. – 2013. – Т. 11, № 4. – С. 12-22.
- 39.Колупаев Ю. Е. Кальций и стрессовые реакции растений /Ю.Э. Колупаев // Вестник Харьковського національного аграрного університету. Серія: Біологія.– 2007а – В. 1(10). – С. 24-41.
- 40.Колупаев Ю. Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции / Ю. Е. Колупаев // Вестник Харьковського національного аграрного університету. Серія: Біологія. – 2007б. – В. 3 (12). – С. 6-26.
- 41.Колупаев Ю. Е. Регуляция активности каталазы в колеоптилях пшеницы: возможная роль ионов Ca^{2+} и кальмодулина / Ю. Е. Колупаев, Ю. В. Карпец // Вестник Харьковського національного аграрного університету. Серія: Біологія. – 2008. – № 1. – С. 15-21.
- 42.Колупаев Ю. Е. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров / Ю. Е. Колупаев, Ю. В. Карпец // К: Основа. – 2010. – 352 с.

43. Креславский В. Д.. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений / В. Д. Креславский, Д. А. Лось, С. И. Аллахвердиев, В. В. Кузнецов // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 2. – С. 163-163.
44. Кругова Е. Д. Специфические стратегии клубеньковых и фитопатогенных бактерий при инфицировании растений / Е. Д. Кругова // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – С. 3-15.
45. Кузакова О. В. Влияние различных по симбиотической эффективности штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* на изменение концентрации цАМФ и пероксида водорода в клетках проростков гороха / О. В. Кузакова, Л. А. Ломоватская, А. М. Гончарова, А. С. Романенко // Физиология растений. – 2019. – Т. 66, № 5. – С. 360-366.
46. Лазарев А. М. Ареал и зоны вредоносности бактериального ожога гороха / А. М. Лазарев, В. А. Коробов, И. Н. Надточий, Е. Н. Мысник // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. – 2015. – Т. 32, № 15 (212). – С. 29-35.
47. Леппянен И. В. Изучение роли рецепторной киназы PsLYK9 в активации защитных реакций у гороха при заражении фитопатогенами и обработке хитоолигосахаридами / И. В. Леппянен, Е. А. Долгих // Биотехнология: состояние и перспективы развития. – 2015. – С. 60-61.
48. Леппянен И. В. Изучение рецепторов, контролирующих развитие устойчивости гороха к фитопатогенам и симбиоз с грибами арбускулярной микоризы / И. В. Леппянен, Н. А. Вишневская, Е. А. Долгих // Вестник защиты растений. – 2016. – Т. 3. – С. 94-95.
49. Леппянен И. В. Участие гетеротримерных G-белков в сигнальной регуляции взаимодействия растений гороха с симбиотическими и патогенными микроорганизмами / И. В. Леппянен, А. Д. Бовин, Е. А. Долгих // Mechanisms of resistance of plants and microorganisms to unfavorable environmental. – 2018. – С. 462-465.
50. Ломоватская Л. А. Упрощенный метод определения цАМФ в растениях с помощью модифицированного иммуноферментного анализа / Л. А.

- Ломоватская, А. С. Романенко, Н. В. Криволапова // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2005. – № 6. – С. 684-687.
51. Ломоватская Л. А. Системная активация аденилатциклазы, локализованной в плазмалемме клеток картофеля при бактериальном патогенезе / Л. А. Ломоватская, А. С. Романенко, Н. В. Криволапова, В. Н. Копытчук, Р. К. Саляев // Доклады Академии наук – 2007 – Т. 413, № 3. – С. 420-423.
52. Ломоватская Л. А. Аденилатциклазы и устойчивость растений к стрессам / Л. А. Ломоватская, А. С. Романенко, Н. В. Филинова // Издательство Института географии им. В. Б. Сочавы СО РАН – 2010. – 87 с.
53. Ломоватская Л. А. Влияние экзополисахаридов возбудителя кольцевой гнили на кинетические параметры аденилатциклаз растений картофеля / Л. А. Ломоватская, А. С. Романенко, Н. В. Филинова, Р. К. Саляев // Доклады Академии наук – 2011. – Т. 441, № 4. – С. 565-565.
54. Ломоватская Л. А. Аденилатциклазы растений: влияние биотического стрессора на кинетические параметры трансмембранной и растворимой форм аденилатциклазы / Л. А. Ломоватская, А. С. Романенко, Н. В. Филинова // Биологические мембраны. – 2014. – Т. 31, № 2. – С. 129-136.
55. Ломоватская Л. А. Трансмембранная аденилатциклаза контролирует факторы вирулентности фитопатогена *Pseudomonas siringae* и мутуалиста *Rhizobium leguminosarum* / Л. А. Ломоватская, А. С. Романенко, О. В. Рыкун // Микробиология. – 2015. – Т. 84, № 4. – С. 404-404.
56. Ломоватская Л. А. Активность аденилатциклаз и изменение концентрации цАМФ в клетках корня проростков гороха при инфицировании мутуалистами и фитопатогенами / Л. А. Ломоватская, О. В. Кузакова, А. С. Романенко, А. М. Гончарова // Физиология растений. – 2018. – Т. 65, № 4. – С. 310-320.
57. Ломоватская Л. А. цАМФ участвует в регуляции уровня пероксида водорода в корне проростков гороха при биотическом стрессе / Л. А.

- Ломоватская, О. В. Кузакова, А. М. Гончарова, А. С. Романенко // Физиология растений. – 2020. – Т. 67, № 3. – С. 270-277.
58. Лукаткин А. С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс / А.С. Лукаткин // Саранск: Изд-во Мордовского ун-та. – 2002. – 208 с.
59. Макарова Л. Е. Влияние температуры на локализацию свободных фенольных соединений в тканях корней и деформацию корневых волосков у инокулированных *Rhizobium* проростков гороха / Л. Е. Макарова, В. Н. Нурминский // Цитология. – 2005. – Т. 47, № 6. – С. 519-525.
60. Макарова Л. Е. Влияние фенольных соединений из корневых экссудатов на размножение *Rhizobium leguminosarum* в ризосфере гороха при разных температурах / Л. Е. Макарова, Е. Г. Рудиковская // Агрехимия. – 2003. – № 8. – С. 61-65.
61. Макарова Л. Е. Инфицирование и нодуляция этиолированных растений гороха, инокулированных *Rhizobium leguminosarum* / Л. Е. Макарова, М. Г. Соколова, Г. П. Акимова, Г. Б. Лузова, В. Н. Нурминский // Агрехимия. – 2004. – № 12. – С. 29-35.
62. Максимов И. В. Влияние ионов кальция на метаболизм активных форм кислорода в совместных культурах каллусов пшеницы с грибом *Tilletia caries* / И. В. Максимов, Н. Б. Трошина, О. Б. Сурина, Е. А. Черепанова, Л. Г. Яруллина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, № 5. – С. 577-582.
63. Максимов И. В. Роль АФК в сигнальной регуляции фитоиммунитета / И. В. Максимов // Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений. Роль активных форм кислорода в жизни растений. – 2017. – С. 154-158.
64. Меликова Д. А. Анализ продуктов распада углеводных полимеров растительной клеточной стенки при инфекции, вызванной фитопатогенной бактерией *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 / Д. А.

- Меикова, В. Ю. Горшков // Научный диалог: Вопросы медицины. – 2016. – С. 26-31.
65. Мельникова Н. Н. Влияние лектинов семян сои на формирование и функционирование бобово-ризобиального симбиоза / Н. Н. Мельникова, Н. В. Ковальчук, С. Я. Коць, Л. И. Мусатенко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т. 41, № 5. – С. 439-446.
66. Митанова Н. Б. Влияние минерального азота на начальные этапы формирования бобово-ризобиального симбиоза / Н. Б. Митанова // Автореферат дисс. На соискание ученой степени кандидата биологических наук. – 2010. – Т. 3, № 05. – 19 с.
67. Нигматуллина Л. Р. Вклад бактериального адгезина RapA1 в эффективность формирования симбиоза *Rhizobium leguminosarum* с растениями фасоли / Л. Р. Нигматуллина, А. М. Лавина, З. Р. Вершинина, А. Х. Баймиев // Микробиология. – 2015. – Т. 84, № 6. – С. 705-705.
68. Овцына А. О. Структура, функции и возможность практического применения сигнальных молекул, инициирующих развитие бобово-ризобиального симбиоза / А. О. Овцына, И. А. Тихонович // Экологическая генетика. – 2004. – Т. 2, № 3. – С. 14-23.
69. Озерецковская О. Л. Индуцирование элиситорами процесса раневой репарации клубней картофеля / О. Л. Озерецковская, Н. И. Васюкова, Г. И. Чаленко, Н. Г. Герасимова, Т. А. Ревина, Т. А. Валуева // Доклады РАН. – 2008. – Т. 423, № 1. – С. 129-132.
70. Омеличкина Ю. В. Реакции эффектор-активируемого иммунитета в культурах клеток картофеля и табака при действии фитопатогена *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* / Ю. В. Омеличкина, С. В. Бояркина, Т. Н. Шафикова // Физиология растений. – 2017. – Т. 64, № 3. – С. 204-212.
71. Онищук О. П. Анализ различных типов конкурентоспособности у Tn5-мутантов клубеньковых бактерий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) / О. П.

- Онищук, О. Н. Курчак, Л. А. Шарыпова, Н. А. Проворов, Б. В. Симаров //Генетика. – 2001. – Т. 37, № 11. – С. 1266-1271.
- 72.Онищук О. П. Нодуляционная конкурентоспособность клубеньковых бактерий: генетический контроль и адаптивное значение (обзор) / О. П. Онищук, Н. И. Воробьёв, Н. А. Проворов //Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53, № 2. – С. 127-135.
- 73.Орлов С. Н. Выброс клетками циклического аденозинмонофосфата: механизм и физиологическое значение / С. Н. Орлов, Н. В. Максимова // Биохимия. – 1999. – Т. 64. – В. 2. – С. 164-173.
- 74.Перфильева А. И. Возбудитель кольцевой гнили картофеля – *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* / А. И. Перфильева, И. А. Граскова, Е. Г. Рихванов //Агрехимия. – 2013. – № 12. – С. 34-44.
- 75.Покотило И. В. Липоксигеназы и регуляция метаболизма клеток растений / И. В. Покотило, Я. С. Колесников, М. В. Деревянчук, А. И. Харитоненко, В. С. Кравец // TheUkrainianBiochemicalJournal. – 2015. – № 87, № 2. – С. 41 -55.
- 76.Пятыгин С. С. Особенности сигнальной роли потенциала действия у высших растений / С. С. Пятыгин // Успехи современной биологии. – 2007. – Т. 127, № 3. – С. 293-298.
- 77.Пятыгин С. С. Распространяющиеся электрические сигналы в растениях / С. С. Пятыгин // Цитология. – 2008а. – Т. 50, № 2. – С. 154 – 159.
- 78.Пятыгин С. С. Сигнальная роль потенциала действия у высших растений / С. С. Пятыгин, В. А. Опритов, В. А. Воденев // Физиология растений. – 2008б. – Т. 55, № 2. – С. 312-319.
- 79.Романенко А. С. Стабилизация корнями картофеля рН среды, смещаемого возбудителем кольцевой гнили / А. С. Романенко, И. А. Граскова, А. А. Рифель, В. Н. Копытчук, М. А. Раченко // Физиология растений. – 1996. – Т. 43, № 5. – С. 707-712.
- 80.Романенко А. С. Эндоцитоз экзополисахаридов возбудителя кольцевой гнили картофеля клетками растения-хозяина / А. С. Романенко, А. А.

- Рифель, Р. К. Салаяев // Доклады Академии Наук. – 2002. – Т. 386, №1. – С. 139-141.
81. Романенко А. С. Влияние экзополисахаридов бактериального возбудителя кольцевой гнили на субклеточную локализацию регулируемых циклическими нуклеотидами ионных каналов (CNGC) в клетках корней картофеля / А. С. Романенко, Л. А. Ломоватская // Биологические мембраны. – 2017. – Т. 34, № 3. – С. 231-238.
82. Самуилов В. Д. H₂O₂ усиливает CN-индуцированный апоптоз в листьях гороха / В. Д. Самуилов, Д. Б. Киселевский, С. В. Синицын, А. А. Шестак, Лагунова, Е. М., Несов, А. В. // Биохимия. – 2006. – Т. 71. – № 4. – С. 481-492.
83. Серегина Н. В. Обзор биофизических особенностей микробной адгезии / Н. В. Серегина, Т. В. Честнова, В. А. Жеребцова, В. А. Хромушин // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – № 4. – С. 75-77.
84. Серова Т. А. Старение симбиотического клубенька у бобовых растений: молекулярно-генетические и клеточные аспекты (обзор) / Т. А. Серова, В. Е. Цыганов // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 5. – С. 3-15.
85. Соколов Ю. А. Элиситоры и их применение / Ю. А. Соколов // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2014. – С. 101-121.
86. Тарчевский И. А. Метаболизм растений при стрессе / И. А. Тарчевский // Казань: Фэн. – 2001. – 448 с.
87. Тихонович И. А. Значение симбиогенетики в системе биологического образования / И. А. Тихонович // Экологическая генетика. – 2007. – Т. 5, № 1. – С. 8-17.
88. Ткачук В. А. Пероксид водорода как новый вторичный посредник / В. А. Ткачук, П. А. Тюрин-Кузьмин, В. В. Белоусов, А. В. Воротников // Биологические мембраны. – 2012. – Т. 29, № 1-2. – С. 21-37.
89. Филинова Н. В. Кальций как модулятор активности аденилатциклазы клеток растений картофеля при бактериальном патогенезе / Н. В.

- Филинова, Л. А. Ломоватская, А. С. Романенко, Р. К. Саляев // Доклады Академии Наук. – 2018. – Т. 483, № 6. – С. 685- 687.
90. Хадри А. Е. Реакция растений на Nod-факторы / А. Е. Хадри, Т. Бисселинг // Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями. – 2002. – С. 435-450.
91. Хаитов Р. М. Физиология врожденного иммунитета / Р. М. Хаитов // Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. – 2006. – Т. 92, № 6. – С. 649-661.
92. Холл М. А. Протеинкиназы растений в трансдукции абиотических и биотических сигналов / М. А. Холл, Г. В. Новикова, И. Е. Мошков, Л. А. Дж. Мур, А. Р. Смит // Физиол. раст. – 2002. – Т. 49, № 1. – С. 123- 135.
93. Холманский А. С. Зависимость электрохимического потенциала дерева от внешних условий / А. С. Холманский, Ю. М. Кожевников // Альтернативная энергетика и экология (ISJAEE). – 2016. – № 21. – С. 183-187.
94. Цыганова А. В. Роль поверхностных компонентов ризобий в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями / А. В. Цыганова, В. Е. Цыганов // Успехи современной биологии. – 2012. – Т. 132, № 2. – С. 211-222.
95. Шарова Е. И. Антиоксиданты растений: учебн. пособие / И. Е. Шарова // Изд. Санкт-Петербургского университета – 2016. – 140 с.
96. Шафикова Т. Н. Обнаружение внеклеточных протеиназ у возбудителя кольцевой гнили картофеля / Т. Н. Шафикова, Е. Ю. Эпова, А. С. Романенко, Р. К. Саляев // Доклады Академии Наук. – 2009. – Т. 425, № 2. – С. 280-282.
97. Шафикова Т. Н. Молекулярно-генетические аспекты иммунитета растений к фитопатогенным бактериям и грибам / Т. Н. Шафикова, Ю. В. Омеличкина // Физиология растений. – 2015. – Т. 62, № 5. – С. 611-611.

98. Швартау В. В. Кальций в растительных клетках / В. В. Швартау, П. А. Вирыч, Т. И. Маковейчук, А. Ю. Артеменко // *Biosystems Diversity*. – 2014. – Т. 22. – № 1. – С. 19-32.
99. Шпаков А. О. Рецептор серпантинного типа и гетеротримерный G-белок как мишени действия полилизиновых дендримеров / А. О. Шпаков, И. А. Гурьянов, Н. В. Баянова, Г. П. Власов // *Цитология*. – 2008. – Т. 50. – № 12. – С. 1036-1043.
100. Яворская В. К. О функционировании цАМФ-регулирующей системы в растениях / В. К. Яворская, Ф. Л. Калинин // *Физиология и биохимия культ. растений*. – 1984. – Т. 16, № 3. – С. 217 – 229.
101. Яворская В. К. Физиологическая роль 3',5'-цАМФ в растительных клетках / Дисс. докт. биол. наук. – 1990. – 35 с.
102. Яковлева О. В. Аденилатциклазная и гуанилатциклазная системы внутриклеточных вторичных посредников / О. В. Яковлева, А. В. Яковлев, Г. Ф. Ситдикова // Учебное пособие. Казанский государственный университет. – 2009. – 48 с.
103. Akimova G. P. The influence of inoculation by *Rhizobium leguminosarum* on pea root growth at a decreased temperature / G. P. Akimova, M. G. Sokolova, L. V. Nechaeva // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 1999. – V. 46, N 5. – P. 704-708.
104. Allen N. S. Effects of Nod factors on alfalfa root hair Ca^{2+} and H^{+} currents and on cytoskeletal behavior // *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*. – Springer, Dordrecht/ – 1994. – P. 107-113.
105. Al-Younis I. The *Arabidopsis thaliana* K^{+} - uptake permease 7 (AtKUP7) contains a functional cytosolic adenylate cyclase catalytic centre / I. Al-Younis, A. Wong, C. Gehring // *FEBS letters*. – 2015. – V. 589, N 24, Part B. – P. 3848 – 3852.
106. Al-Younis I. Functional crypto-adenylate cyclases operate in complex plant proteins / I. Al-Younis, B. Moosa, M. Kwiatkowski, K. Jaworski, A. Wong, C. Gehring // *Frontiers in Plant Science*. – 2021 – V. 12. – P. 1-10.

107. Andrio E. Hydrogen peroxide-regulated genes in the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* symbiosis / E.Andrio, D. Marino, A. Marmeys, M. D. de Segonzac, I. Damiani, A. Genre, S. Huguet, P. Frendo, A. Puppo, N. Pauly // *New Phytologist*. – 2013. – V. 198, N 1. – P. 179-189.
108. Ardourel M. *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses / M. Ardourel, N. Demont, F. Debelle, F. Mailet, F. de Billy, J. C. Prome,... & G. Truchet // *The Plant Cell*. – 1994. – V. 6, N 10. – P. 1357-1374.
109. Arrighi J. F. The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes / J. F. Arrighi, A. Barre, B. B. Amor, A. Bersoult, L. C. Soriano, R. Mirabella, ... R. Geurts // *Plant physiology*. – 2006. – V. 142, N 1. – P. 265-279.
110. Atkinson M. M., Baker C. J. Association of host plasma membrane K⁺/H⁺ exchange with multiplication of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in *Phaseolus vulgaris* // *Phytopathology*. – 1987. – V. 77, N 9. – P. 1273-1279.
111. Azarakhsh M. Identification and expression analysis of *Medicago truncatula* Isopentenyl Transferase Genes (IPTs) involved in local and systemic control of nodulation / M. Azarakhsh, M. A. Lebedeva, L. A. Lutova // *Frontiers in plant science*. – 2018. – V. 9. – P. 304-315.
112. Baer D. *In vitro* cellulolytic activity of the plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* / D. Baer, N. C. Gudmestad // *Canadian journal of microbiology*. – 1995. – V. 41, N 10. – P. 877- 888.
113. Baker D. A. Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases / D. A. Baker, J. M. Kelly // *Molecular microbiology*. – 2004. – V. 52, N 5. – P. 1229-1242.
114. Bassler J. Adenylate cyclases: Receivers, transducers, and generators of signals / J. Bassler, J. E. Schultz, A. N. Lupas // *Cellular signalling*. – 2018. – P. 135-144.

115. Batistic O. Analysis of calcium signaling pathways in plants / O. Batistic, J. Kudla // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 2012. – V. 1820, N 8. – P. 1283-1293.
116. Berrabah F. A nonRD receptor-like kinase prevents nodule early senescence and defense-like reactions during symbiosis /F. Berrabah, M. Bourcy, A. Eschstruth, A. Cayrel, I. Guefrachi, P. Mergaert... P.Ratet // *New Phytologist*. – 2014. – V. 203. – P. 1305-1314.
117. Bhalta S. C. Subcellular localization of adenylate cyclase in the shoot apices of *Bryum argenteum* Hedw. / S. C. Bhalta, R. N. Chopra // *Annals of botany*. – 1984. – V. 54. – P. 195-200.
118. Bhuvanewari T. V. Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr) by *Rhizobium japonicum*: I. Localization of infectible root cells / T. V. Bhuvanewari, B. G. Turgeon, W. D. Bauer // *Plant Physiology*. – 1980. – V. 66, N 6. – P. 1027-1031.
119. Biancheta C. An *Arabidopsis thaliana* leucine-rich repeat protein harbors an adenylyl cyclase catalytic center and affects responses to pathogens / C. Bianchet, A. Wong, M. Quaglia, M. Alqurashi, C. Gehring, V. Ntoukakis, S. Pasqualini // *Journal of plant physiology*. – 2019. – V. 232. – P. 12-22.
120. Bienert G. P. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes / G. P. Bienert, A. L. Moller, K. A. Kristiansen, A. Schulz, I. M. Moller, J. K. Schjoerring, T. P. Jahn // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – V. 282, N 2. – P. 1183-1192.
121. Bile E. Role of superoxide dismutases and alkyl hydroperoxidases in pathogenesis of *Pseudomonas syringae* / E. Bile, M. Guo, W. Becker, J. Alfano // *The FASEB Journal*. – 2014. – V. 28, N 1 - Supplement. – P. 741.1.
122. Bindschedler L. V. Early signaling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca^{2+} / L. V. Bindschedler, F. Minibayeva, S. L. Gardner, C. Gerrish, D. R. Davies, G. P. Bolwell // *New Phytologist*. – 2001. – V. 151, N 1. – P. 185-194.

123. Bohlool B. B. Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*—legume root nodule symbiosis / B. B. Bohlool, E. L. Schmidt // Science. – 1974. – V. 185, N 4147. – P. 269-271.
124. Boller T. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors / T. Boller, G. A. Felix // Annual review of plant biology. – 2009. – V. 60. – P. 379-406.
125. Bolwell G. P. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three component system /G. P. Bolwell, L. V. Bindschedler, K. A. Blee, V. S. Butt, D. R. Davies, S. L. Gardner,...F.Minibayeva //Journal of experimental botany. – 2002. – V. 53, N 372. – P. 1367-1376.
126. Bose J. Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants / J. Bose // Frontiers in Plant Science. – 2011. – V. 2. – P. 85.
127. Bourcy M. *Medicago truncatula* DNF2 is a PI-PLC-XDcontaining protein required for bacteroid persistence and prevention of nodule early senescence and defense-like reactions/M. Bourcy, L. Brocard, C. I. Pislariu, V.Cosson, P. Mergaert, M. Tadege,... P.Ratet // New Phytologist . – 2013 – V. 197. – P. 1250-1261.
128. Bowler C. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance/ C. Bowler, R. Fluhr //Trends in plant science. – 2000. – V. 5, 6. – P. 241-246.
129. Bozsoki Z. Receptor-mediated chitin perception in legume roots is functionally separable from Nod factor perception /Z. Bozsoki, J. Cheng, F. Feng, K. Gysel, M.Vinther, K. R. Andersen, ... J. Stougaard // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – V. 114, N 38. – P. 8118-8127.
130. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford //Analytical biochemistry. – 1976. – V. 72, N 1–2. – P. 248-254.

131. Brewin N. J. Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*–legume symbiosis / N. J. Brewin // Critical Reviews in Plant Sciences. – 2004. – V. 23, N 4. – P. 293-316.
132. Broghammer A. Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding / A. Broghammer, L. Krusell, M. Blaise, J. Sauer, J. T. Sullivan, N. Maolanon, M. Vinther, A. Lorentzen, E. B. Madsen, K. J. Jensen, P. Roepstorff, S. Thirup, C. W. Ronson, M. B. Thygesen, J. Stougaard // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – V. 109, N 34. – P. 13859-13864.
133. Canonne J. Phospholipases in action during plant defense signaling / J. Canonne, S. Froidure-Nicolas, S. Rivas // Plant signaling and behavior. – 2011. – V. 6, N 1. – P. 13-18.
134. Caplan J. Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming / J. Caplan, M. Padmanabhan, S. P. Dinesh-Kumar // Cell host and microbe. – 2008. – V. 3, N 3. – P. 126-135.
135. Cardenas L. Reactive oxygen species (ROS) as early signals in root hair cells responding to rhizobial nodulation factors / L. Cárdenas, C. Quinto // Plant signaling and behavior. – 2008a. – V. 3, N 12. – P. 1101-1102.
136. Cardenas L. Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs) / L. Cardenas, A. Martínez, F. Sánchez, C. Quinto // The Plant Journal. – 2008b. – V. 56, N 5. – P. 802-813.
137. Carlson R. W. The structures and biological activities of the lipooligosaccharide nodulation signals produced by type I and II strains of *Bradyrhizobium japonicum* / R. W. Carlson, J. Sanjuan, U. R. Bhat, J. Glushka, H. P. Spaink, A. H. Wijffjes, A. A. van Brussel, T. J. Stokkermans, N. K. Peters, G. Stacey // Journal of Biological Chemistry. – 1993. – V. 268, N 24. – P. 18372-18381.
138. Carricarte V. C. Adenylate cyclase activity in a higher plant, alfalfa (*Medicago sativa*) / V. C. Carricarte, G. M. Bianchin, J. P. Muschietti // Biochemical journal. – 1988. – V. 249. – P. 807-811.

139. Castellani L. G. Exopolysaccharide characterization of *Rhizobium favelukesii* LPU83 and its role in the symbiosis with alfalfa / L. G. Castellani, A. Luchetti, J. F. Nilsson, J. Pérez-Giménez, C. Wegener, A. Schlüter,... G. A. T. Tejerizo // *Frontiers in plant science*. – 2021. – V. 12. – P. 1-17.
140. Catanese C. A. Adenylate cyclase and cyclic AMP phosphodiesterase in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids / C. A. Catanese, D. W. Emerich, W. L. Zahler // *Journal of bacteriology*. – 1989. – V. 171, N 9. – P. 4531-4536.
141. Chalupowicz L. Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection/ L. Chalupowicz, E. M. Zellermann, M. Fluegel, O. Dror, R. Eichenlaub, K. H. Gartemann,... S. Manulis-Sasson // *Phytopathology*. – 2012. – V. 102, N 1. – P. 23-31.
142. Chang J. H. The ABCs and 123s of bacterial secretion systems in plant pathogenesis / J. H. Chang, D. Desveaux, A. L. Creason // *Annual review of phytopathology*. – 2014. – V. 52. – P. 317-345.
143. Chatukuta P. An *Arabidopsis* clathrin assembly protein with a predicted role in plant defense can function as an adenylate cyclase / P. Chatukuta, T. B. Dikobe, D. T. Kawadza, K. S. Sehlabane, M. M. Takundwa, A. Wong, C. Gehring O. Ruzvidzo // *Biomolecules*. – 2018. – V. 8, N 2. – P. 1-15.
144. Cheng Y. Characterization of non-host resistance in broad bean to the wheat stripe rust pathogen / Y. Cheng, H. Zhang, J. Yao, X. Wang, J. Xu, Q. Han,... Z. Kang // *BMC Plant Biology*. – 2012. – V. 12, N 1. – P. 1-12.
145. Cooke C. J. Evidence that cyclic AMP is involved in the hypersensitive response of *Medicago sativa* to a fungal elicitor / C. J. Cooke, C. J. Smith, T. J. Walton, R. P. Newton // *Phytochemistry*. – 1994. – V. 35, N 4. – P. 889-895.
146. Cooper J. E. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue / J. E. Cooper // *Journal of applied microbiology*. – 2007. – V. 103, N 5. – P. 1355-1365.
147. Couto D. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants / D. Couto, C. Zipfel // *Nature Reviews Immunology*. – 2016. – V. 16, N 9. – P. 537.

148. Cowan A. K. Lyso-phosphatidylethanolamine (LPE) as a plant bioregulator / A. K. Cowan, C. Leung, C. H. Santori // X International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production 727. – 2005. – P. 527-536.
149. Cunnac S. *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. / S. Cunnac, M. Lindeberg, A. Collmer // J. Current Opinion in Microbiology. – 2009 – V. 12, N 1. – P. 53-60.
150. Curvetto N. Effect of two cAMP analogues on stomatal opening in *Vicia faba*: relationship with cytosolic calcium concentration / N. Curvetto, L. Darjania, S. Delmastro // Plant Physiol. Biochem. – 1994. – V. 32. – P. 365-372.
151. Dazzo F. Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis / F. Dazzo, G. Truchet, J. Sherwood, E. Hrabac, M. Abe, S. Pankratz // Appl. Environ. Microbiol.– 1984. – V. 48, N 6. – P.1140-1150.
152. Defer N. Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase / N. Defer, M. Best-Belpomme, J. Hanoune // American Journal of Physiology-Renal Physiology. – 2000. – V. 279. – P. 400-416.
153. Demidchik V. Spatial variation in H₂O₂ response of *Arabidopsis thaliana* root epidermal Ca²⁺ flux and plasma membrane Ca²⁺ channels / V. Demidchik, S. N. Shabala, J. M. Davies // The Plant Journal. – 2007. – V. 49, N 3. – P. 377-386.
154. Demidchik V. Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions / V. Demidchik, S. Shabala, S. Isayenkov, T. A. Cuin, I. Pottosin // New Phytologist. – 2018. – V. 220, N 1. – P. 49-69.
155. Denny T. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis / T. Denny // Annu. Rev. Phytopathol. – 1995. – V. 33. – P. 173-197.
156. Dessauer C. W. The interactions of adenylyl cyclases with P-site inhibitors / C. W. Dessauer, J. J. Tesmer, S. R. Sprang, A. G. Gilman // Trends in pharmacological sciences. – 1999. – V. 20, N 5. – P. 205-210.
157. D'Haese W. Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base nodulation of a semiaquatic legume / W. D'Haese, R. D.

- Rycke, R. Mathis, S. Goormachtig, S. Pagnotta, C. Verplancke, W. Capoen, M. Holsters // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – V. 100, N 20. – P. 11789-11794.
158. Di D. W. Involvement of secondary messengers and small organic molecules in auxin perception and signaling / D. W. Di, C. Zhang, G. Q. Guo // Plant Cell Reports. – 2015. – V. 34, N 6. – P. 895-904.
159. Doke N. The oxidative burst protects plants against pathogen attack: Mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence / N. Doke, Y. Miura, L. M. Sanchez, H. J. Park, T. Noritake, H. Yoshioka, K. Kawakita // Gene. – 1996. – V. 7, N 179. – P. 45-51.
160. Donaldson L. Supplementary Material for: The arabidopsis cyclic nucleotide interactome/ L. Donaldson, S. Meier, C. A. Gehring// igshare. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.3621143> – 2016.
161. Downie J. A. Nodulation of legumes by *Rhizobium*: the recognized root? / J. A. Downie, A. W. B. Johnston // Cell. – 1986. – V. 47, N 2. – P. 153-154.
162. Drum C. L. Structural basis for the activation of anthrax adenylyl cyclase exotoxin by calmodulin / C. L. Drum, S. Z. Yan, J. Bard, Y. Q. Shen, D. Lu, S. Soelaiman, Z. Grabarek, A. Bohm, W. J. Tang // Nature – 2002. – V. 415. – P. 396-402.
163. Dziubinska H. Transmission route for action potentials and variation potentials in *Helianthus annuus* L. / H. Dziubinska, K. Trebacz, T. Zawadzki // J. Plant Physiol. – 2001. – V. 158. – P. 1167- 1172.
164. Eaton C. J. Disruption of signaling in a fungal-grass symbiosis leads to pathogenesis / C. J. Eaton, M. P. Cox, B. Ambrose, M. Becker, U. Hesse, C. L. Schardl, B. Scott // Plant Physiology. – 2010. – V. 153, N 4. – P. 1780-1794.
165. Ehrhardt D. W. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals / D. W. Ehrhardt, R. Wais, S. R. Long // Cell. – 1996. – V. 85, N 5. – P. 673-681.

166. Ehrhardt D. W. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors / D. W. Ehrhardt, E. M. Atkinson // Science. – 1992. – V. 256, N 5059. – P. 998-1000.
167. Enyedi A. J. Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests / A. J. Enyedi, N. Talpani, P. Silverman, I. Raskin // Cell. – 1992. – V. 70, N 6 – P. 879-886.
168. Etzler M. E. A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots / M. E. Etzler, G. Kalsi, N. N. Ewing, N. J. Roberts, R. B. Day, J. B. Murphy // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1999. – V. 96, N 10. – P. 5856-5861.
169. Fehr T. F. Cyclic AMP efflux is regulated by occupancy of the adenosine receptor in pig aortic smooth muscle cells / T. F. Fehr, E. S. Dickinson, E. S., S. J. Goldman, L. L. Slakey // Journal of Biological Chemistry. – 1990. – V. 265, N 19. – P. 10974-10980.
170. Felle H. H. Nod signal- induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide / H. H. Felle, E. Kondorosi, A. Kondorosi, M. Schultze // The Plant Journal. – 1995. – V. 7, N 6. – P. 939-947.
171. Felle H. H. Systemic signalling in barley through action potentials / H. H. Felle, M. R. Zimmermann // Planta. – 2007. – V. 226, N 1. – P. 203-226.
172. Ferguson B. J. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation / B. J. Ferguson, A. Indrasumunar, S. Hayashi, M. H. Lin, Y. H. Lin, D. E. Reid, P. M. Gresshoff // Journal of integrative plant biology. – 2010. – V. 52, N 1. – P. 61-76.
173. Fernandez-Göbel T. F. Redox systemic signaling and induced tolerance responses during soybean–*Bradyrhizobium japonicum* interaction: involvement of nod factor receptor and autoregulation of nodulation / T. F. Fernandez-Göbel, R. Deanna, N. B. Muñoz, G. Robert, S. Asurmendi, R. Lascano, // Frontiers in plant science. – 2019. – V. 10. – P. 141-156.

174. Ferrarini A. Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions / A. Ferrarini, M. De Stefano, E. Baudouin, C. Pucciariello, A. Polverari, A. Puppo, M. Delledonne // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2008. – V. 21, N 6. – P. 781-790.
175. Firdous S. S. Characterization of culture filtrates of *Pseudomonas syringae* pv. *sesame* and *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* isolates associated with Seame bacterial blight / S. S. Firdous, R. Asghar, M. Irfan-Ul-Haque // *Pak. J. Bot.* – 2013. – V. 45, N 4 – P. 1461-1468.
176. Fliegmann J. Lipo-chitooligosaccharidic nodulation factors and their perception by plant receptors / J. Fliegmann, J. J. Bono // *Glycoconjugate journal*. – 2015. – V. 32, N 7. – P. 455-464.
177. Fliegmann J. Immunity: flagellin seen from all sides/ J. Fliegmann, G. Felix // *Nature plants*. – 2016. – V. 2, N 9. – P. 1-2.
178. Foyer C. H. Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signalling, Acclimation, and Practical Implications/ C. H. Foyer, G. Noctor // *Antiox. Redox Signal*. – 2009. – V. 11. – P. 861-905.
179. Gage D. J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes / D. J. Gage // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2004. – V. 68, N 2. – P. 280-300.
180. Galletti R. The AtrbohD-Mediated Oxidative Burst Elicited by Oligogalacturonides in *Arabidopsis* Is Dispensable for the Activation of Defense Responses Effective against *Botrytis cinerea* / R. Galletti, C. Denoux, S. Gambetta, J. Dewdney, F.M. Ausubel, G. De Lorenzo, S. Ferrari // *Plant. Physiol.* – 2008. – V. 148. – P. 1695-1706.
181. Gamaley I. A. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions/ I. A. Gamaley, I. V. Klyubin // *International review of cytology*. – 1999. – V. 188. – P. 203-255.
182. Gehring C. Adenyl cyclases and cAMP in plant signaling-past and present / C. Gehring // *Cell Communication and Signaling*. – 2010. – V. 8, N 1. – P. 1-5.

183. Gehring C. Cyclic nucleotide monophosphates and their cyclases in plant signaling / C. Gehring, I. S. Turek // *Frontiers in plant science*. – 2017. – V. 8. – P. 1704.
184. Geilfus C. M. The pH of the apoplast: dynamic factor with functional impact under stress / C. M. Geilfus // *Molecular plant*. – 2017. – V. 10, N 11. – P. 1371-1386.
185. Gimenez-Ibanez S. AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants / S. Gimenez-Ibanez, D. R. Hann, V. Ntoukakis, E. Petutschnig, V. Lipka, J. P. Rathjen // *Current biology*. – 2009. – V. 19, N 5. – P. 423-429.
186. Gonzalez A. J. *Clavibacter michiganensis* subsp. *phaseoli* subsp. *nov.*, pathogenic in bean / A. J. Gonzalez, E. Trapiello // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2014. – V. 64, N 5. – P. 1752-1755.
187. Gough C. Calcium oscillations and Nod signal transduction in *Rhizobium*-legume symbiosis / C. Gough // *Journal de la Societe de biologie*. – 2001. – V. 195, N 3. – P. 297.
188. Gough C. Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions / C. Gough, J. Cullimore // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2011. – V. 24, N 8. – P. 867-878.
189. Gough C. Nod factor perception protein carries weight in biotic interactions / C. Gough, C. Jacquet // *Trends in Plant Science*. – 2013. – V. 18, N 10. – P. 566-574.
190. Gourion B. *Rhizobium*-legume symbioses: the crucial role of plant immunity / B. Gourion, F. Berrabah, P. Ratet, G. Stacey // *Trends in plant science*. – 2015. – V. 20, N 3. – P. 186-194.
191. Gowthami L. Role of elicitors in plant defense mechanism / L. Gowthami // *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. – 2018. – V. 7, N 6. – P. 2806-2812.

192. Granqvist E. Bacterial-induced calcium oscillations are common to nitrogen-fixing associations of nodulating legumes and nonlegumes / E.Granqvist, J. Sun, R. O. Camp, P. Pujic, L. Hill, P. Normand, R. J. Morris, A. J. Downie, R. Geurts, G. E. D. Oldroyd // *New Phytol.* – 2015. – V. 207. –P. 551-558.
193. Gully D. A peptidoglycan-remodeling enzyme is critical for bacteroid differentiation in *Bradyrhizobium* spp. during legume symbiosis / D. Gully, D. Gargani, K. Bonaldi, C. Grangeteau, C. Chaintreuil, J. Fardoux, P. Nguyen, R. Marchetti, N. Nouwen, A. Molinaro, P. Mergaert, E. A. Giraud // *Molecular Plant-Microbe Interactions.* – 2016. – V. 29, N 6. – P. 447-457.
194. Gust A. A. Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity / A. A. Gust, R. Willmann, Y. Desaki, H. M. Grabherr, T. Nurnberger // *Trends in plant science.* – 2012. – V. 17, N 8. – P. 495-502.
195. Hafez Y. M. Early accumulation of reactive oxygen species has a pivotal role in non-host resistance mechanisms in legume and cereal plants to the incompatible pathogens/ Y. M. Hafez // *Journal of Plant Protection and Pathology.* – 2015. – V. 6, N 3. – P. 455-472.
196. Halls M. L. Adenylyl cyclase signalling complexes—pharmacological challenges and opportunities / M. L. Halls, D. M. F. Cooper // *Pharmacology & therapeutics.* – 2017. – V. 172. – P. 171-180.
197. Halter T. The leucine-rich repeat receptor kinase BIR2 is a negative regulator of BAK1 in plant immunity / T.Halter, J. Imkampe, S. Mazzotta // *Current Biology.* – 2014. – V. 24, N 2. – P. 134-143.
198. Hann D. R. Bacterial virulence effectors and their activities / D. R. Hann, S. Gimenez-Ibanez, J. P. Rathjen // *Current opinion in plant bi ology.* – 2010. – V. 13, N 4. – P. 388-393.
199. Heidstra R. Nod factor induced host responses and mechanisms of Nod factor perception / R. Heidstra, T. O. N. Bisseling // *New Phytologist.* – 1996. – V. 133, N 1. – P. 25-43.

200. Hirsch A. M. Developmental biology of legume nodulation / A. M. Hirsch // *New Phytologist*. – 1992. – V. 122, N 2. – P. 211-237.
201. Ho S. C. Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum* III. Lectin expression, bacterial binding, and nodulation efficiency / S. C. Ho, J. L. Wang, M. Schindler, J. T. Loh // *The Plant Journal*. – 1994. – V. 5, N 6. – P. 873-884.
202. Hooley R. A role for G proteins in plant hormone signalling? / R. Hooley // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 1999. – V. 37, N 5. – P. 393-402.
203. Hutchison M. L. Lipopeptide phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin / M. L. Hutchison, D. C. Gross // *Molecular plant-microbe interactions*. – 1997. – V. 10, N 3. – P. 347-354.
204. Hutchison M. L. Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction / M. L. Hutchison, M. A. Tester, D. C. Gross // *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*. – 1995. – V. 8, N 4. – P. 610-620.
205. Ichinose Y. Pathogenicity and virulence factors of *Pseudomonas syringae* / Y. Ichinose, F. Taguchi, T. Mukaihara // *J. Gen Plant Pathology*. – Japan. – 2013. – N 79. – P. 285-296.
206. Ishikawa Y. The adenylyl cyclases as integrators of transmembrane signal transduction / Y. Ishikawa, C. J. Homcy // *Circulation research*. – 1997. – V. 80, N 3. – P. 297-304.
207. Ito M. Novel type of adenylyl cyclase participates in tabtoxinine- β -lactam-induced cell death and occurrence of wildfire disease in *Nicotiana benthamiana* / M. Ito, H. Takahashi, T. Sawasaki, K. Ohnishi, Y. Hikichi, A. Kiba // *Plant signaling & behavior*. – 2014. – V. 9, N 1. – P. 27420.
208. Jamet A. H₂O₂ is required for optimal establishment of the *Medicago sativa* / *Sinorhizobium meliloti* symbiosis / A. Jamet, K. Mandon, A. Puppo, D. Héroutart // *Journal of bacteriology*. – 2007. – V. 189, N 23. – P. 8741-8745.

209. Jiang J. Evidence for involvement of endogenous cAMP in *Arabidopsis* defense responses to *Verticillium* toxins / J. Jiang, L. W. Fan, W. H. Wu // Cell Research. – 2005. – V. 15. – P. 585-592.
210. Jimenez-Jimenez S. Differential tetraspanin genes expression and subcellular localization during mutualistic interactions in *Phaseolus vulgaris* / S. Jimenez-Jimenez, O. Santana, F. Lara-Rojas, M. K. Arthikala, E. Armada, K. Hashimoto, ... L. Cárdenas // PLoS one. – 2019. – V. 14, N 8. – P. e0219765.
211. Jones A. M. Plant: the latest model system for G-protein research / A. M. Jones, S. M. Assman // EMBO Reports. – 2004. – V. 5, N 6. – P. 572-578.
212. Jones J. D. G. The plant immune system / J. D. G. Jones, J. L. Dangl // Nature. – 2006. – V. 444, N 7117. – P. 323-329.
213. Kahlon R.S. *Pseudomonas*: molecular and applied biology. – Berlin, Germany: Springer. – 2016. – 518 p.
214. Kalsi G. Localization of a Nod factor-binding protein in legume roots and factors influencing its distribution and expression / G. Kalsi, M. E. Etzler // Plant Physiology. – 2000. – V. 124, N 3. – P. 1039-1048.
215. Kamenetsky M. Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems / M. Kamenetsky, S. Middelhaufe, E. M. Bank, L. R. Levin, J. Buck, C. Steegborn // J. Mol Biol. – 2006. – V. 362. – P. 623-639.
216. Karam J. The roles of tetraspanins in bacterial infections / J. Karam, S. Méresse, L. Kremer, W. Daher // Cellular Microbiology. – 2020. – V. 22, N 12. – P. e13260.
217. Kasahara M. An adenylyl cyclase with a phosphodiesterase domain in basal plants with a motile sperm system / M. Kasahara, N. Suetsugu, Y. Urano, C. Yamamoto, M. Ohmori, Y. Takada, S. Okuda, T. Nishiyama, H. Sakayama, T. Kohchi, F. Takahashi // Scientific reports. – 2016. – V. 6. – P. 39232.
218. Kelly M. N. Nod factors activate both heterotrimeric and monomeric G-proteins in *Vigna unguiculata* (L.) Walp / M. N. Kelly, H. R. Irving // Planta. – 2003. – T. 216, N 4. – P. 674-685.

219. Kelly S. Legume LysM receptors mediate symbiotic and pathogenic signaling / S. Kelly, S. Radutoiu, J. Stougaard // *Current opinion in plant biology*. – 2017. – V. 39. – P. 152-158.
220. Kemp M. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology / M. Kemp, Y. M. Go, D. P. Jones // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2008. – T. 44, N 6. – P. 921-937.
221. Ketta H. A. The role of down-regulation of antioxidant enzyme activities and reactive oxygen species accumulation in playing an essential act in soybean susceptibility to *Fusarium virguliforme* infection / H. A. Ketta // *Journal of Plant Protection and Pathology*. – 2015. – V. 6, N 10. – P. 1439-1461.
222. Klaus-Heisen D. Structure-function similarities between a plant receptor-like kinase and the human interleukin-1 receptor-associated kinase-4 / D. Klaus-Heisen, A. Nurisso, A. Pietraszewska-Bogiel, M. Mbengue, S. Camut, T. Timmers,... J. V. Cullimore // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – V. 286, N13. – P. 11202-11210.
223. Kovtun Y. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants / Y. Kovtun, W. L. Chiu, G. Tena, J. Sheen // *Proceedings of the national academy of sciences*. – 2000. – V. 97, N 6. – P. 2940-2945.
224. Kudla J. Advances and current challenges in calcium signaling / J. Kudla, D. Becker, E. Grill, R. Hedrich, M. Hippler, U. Kummer, M. Parniske, T. Romeis, K. Schumacher // *New Phytologist*. – 2018. – V. 218, N 2. – P. 414-431.
225. Kunstler A. Reactive oxygen species and plant disease resistance / A. Kunstler, R. Bacso, Y. M. Hafez, L. Kiraly // *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress*. – Springer, Cham. – 2015. – P. 269-303.
226. Le M. H. LIK1, a CERK1-interacting kinase, regulates plant immune responses in *Arabidopsis* / M. H. Le, Y. Cao, X. C. Zhang, G. Stacey // *PloS one*. – 2014. – V. 9, N 7. – P. e102245.

227. Lehman A.P. Exopolysaccharides from *Sinorhizobium melilotica* protect against H₂O₂-dependent damage / A.P. Lehman, S.R. Long // J. Bacteriol. – 2013. – V. 195. – P. 5362-5369.
228. Lehti-Shiu M. D. Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily / M. D. Lehti-Shiu, S. H. Shiu // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2012. – V. 367, N 1602. – P. 2619-2639.
229. Leigh J. A. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules / J. A. Leigh, E. R. Signer, G. C. Walker // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1985. – V. 82, N 18. – P. 6231-6235.
230. Leipe D. D. STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer / D. D. Leipe, E. V. Koonin, L. Aravind // Journal of molecular biology. – 2004. – V. 343, N 1. – P. 1-28.
231. Lhuissier F. G. P. Time course of cell biological events evoked in legume root hairs by *Rhizobium* Nod factors: state of the art / F. G. P. Lhuissier, N. C. A. De Ruijter, B. J. Sieberer, J. J. Esseling, A. M. C. Emons // Annals of Botany. – 2001. – V. 87, N 3. – P. 289-302.
232. Li W. Evidence for protein phosphatase 1 and 2A regulation of K⁺ channels in two types of leaf cells / W. Li, S. Luan, S. L. Schreiber, S. Assman // Plant Physiol. – 1994. – V. 106. – P. 963-970.
233. Libault M. Complete transcriptome of the soybean root hair cell, a single-cell model, and its alteration in response to *Bradyrhizobium japonicum* infection / M. Libault, A. Farmer, L. Brechenmacher, J. Drnevich, R. J. Langley, D. D. Bilgin, O. Radwan, D. J. Neece, S. J. Clough, G. D. May, G. Stacey // Plant physiology. – 2010. – V. 152, N 2. – P. 541-552.
234. Lin A. Nitric oxide and protein S-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice / A. Lin, Y. Wang, J. Tang, P. Xue, C. Li, L. Liu, ... & C. Chu // Plant Physiology. – 2012. – V. 158, N 1. – P. 451-464.

235. Lindeberg M. *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. / M. Lindeberg, S. Cunnac, A. Collmer // Trends in microbiology – 2012. – V. 20, N 4 – P. 199-208.
236. Linder J. U. Class III adenylyl cyclases: molecular mechanisms of catalysis and regulation / J. U. Linder // Cell Mol. Life Sci. – 2006. – V. 63. – P. 1736-1751.
237. Lohar D. P. Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula* // Plant physiology. – 2006. – V. 140, N 1. – P. 221-234.
238. Lohar D.P. A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legumerhizobia symbiosis / D. P. Lohar, S. Haridas, J. S. Gantt, K. A. VandenBosch // New Phytol. – 2007. – V. 173. – P. 39-49.
239. Lohmann G. V. Evolution and regulation of the *Lotus japonicus* LysM receptor gene family / G. V. Lohmann, Y. Shimoda, M. W. Nielsen, F. G. Jørgensen, C. Grossmann, N. Sandal,... S. Sato // Molecular plant-microbe interactions. – 2010. – V. 23, N 4. – P. 510-521.
240. Lomovatskaya L. A. Activity of transmembrane and "soluble" forms of adenylyl cyclases in potato cell organelles during bacterial pathogenesis / L. A. Lomovatskaya // Doklady Biol Sci. – 2006. – V. 409. – P. 570-573.
241. Lomovatskaya L. A. Systemic activation of adenylate cyclase located in the plasmalemma of potato cells in bacterial pathogenesis / L. A. Lomovatskaya, A. S. Romanenko, N. V. Krivolapova, V. N. Kopytchuk, R. K. Salyaev // Doklady Biological Sciences. – MAIK Nauka/Interperiodica, 2007a. – V. 413, N 1. – P. 134-136.
242. Lomovatskaya L. A. Functioning of "Soluble" and membrane-associated forms of adenylyl cyclase in plant cell Organelles under biotic stress / L. A. Lomovatskaya, A. S. Romanenko, N. V. Krivolapova, V. N. Kopytchuk // Biologicheskije membrany. – 2007b. – V. 24, N 5. – P. 370-378.
243. Lomovatskaya L. A. Influence of exopolysaccharides of the ring rot pathogen on the kinetic parameters of adenylate cyclases in potato plants / L. A.

- Lomovatskaya, A. S. Romanenko, N. V. Filinova, R. K. Salyaev // Doklady Biological Sciences. – MAIK Nauka/Interperiodica. – 2011. – V. 441, N 1. – P. 404.
244. Luo L. Immunosuppression during *Rhizobium*-legume symbiosis / L. Luo, D. Lu // Plant Signaling & Behavior. – 2014. – V.9. – P. 281-292.
245. Lusini P. Adenylate cyclase in roots of *Ricinus comuis*: stimulation by GTF and Mn^{2+} / P. Lusini, L. Trabalzini, G. G. Franchi, L. Bovalini, P. Martelli // Phytochem. – 1990. – V. 30. – P. 109-111.
246. Ma Y. Molecular steps in the immune signaling pathway evoked by plant elicitor peptides: Ca^{2+} -dependent protein kinases, nitric oxide, and reactive oxygen species are downstream from the early Ca^{2+} signal / Y. Ma, Y. Zhao, R. K. Walker, G. A. Berkowitz // Plant Physiology. – 2013. – V. 163, N 3. – P. 1459-1471.
247. Maillet F. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza /F. Maillet, V. Poinot, O. André, V. Puech-Pagès, A. Haouy, M. Gueunier, L. Cromer. // Nature. – 2011. – V. 469, N 7328. – P. 58.
248. Makino N. A metabolic model describing the H_2O_2 elimination by mammalian cells including H_2O_2 permeation through cytoplasmic and peroxisomal membranes: comparison with experimental data / N. Makino, K. Sasaki, K. Hashida, Y. Sakakura //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. – 2004. – T. 1673, N 3. – P. 149-159.
249. Martinez-Atienza J. Plant cyclic nucleotide signalling: facts and fiction / J. Martinez-Atienza, C. Van Ingelgem, L. Roef, F. J. Maathuis // Plant signaling & behavior. – 2007. – V. 2, N 6. – P. 540-543.
250. Martín-Sanz A. Genetic, biochemical and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* strains / A. Martín-Sanz, M. Perez de la Vega, J. Murillo, C. Caminero // Plant Pathology – 2012. – N 61.–P. 1063-1072.
251. Matamoros M. A. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis / M. A. Matamoros, D. A. Dalton, J. Ramos, M.

- R. Clemente, M. C. Rubio, M. Becana // *Plant physiology*. – 2003. – V. 133, N 2. – P. 499-509.
252. Matthyse A. G. Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection / A. G. Matthyse // *Journal of Bacteriology*. – 1983. – V. 154, N 2. – P. 906-915.
253. Mazars C. Cross-talk between ROS and calcium in regulation of nuclear activities / C. Mazars, P. Thuleau, O. Lamotte, S. Bourque // *Molecular Plant*. – 2010. – V. 3, N 4. – P. 706-718.
254. McDowell J. M. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications / J. M. McDowell, B. J. Woffenden // *TRENDS in Biotechnology*. – 2003. – V. 21, N 4. – P. 178-183.
255. Metzler M. C. / M. C. Metzler, M. J. Laine, S. H. Boer // *FEBS Microbiol. Lett.* - 1997. - V. 150, N 1. –P. 1-8.
256. Mikami K. A gene encoding phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase is induced by water stress and abscisic acid in *Arabidopsis thaliana* / K. Mikami, T. Katagiri, S. Luchi, K. Yamaguchi-Shinozaki // *Plant J.* – 1998. – V. 15. – P. 563-568.
257. Mishra O. P. Phosphorylation of cAMP response element binding (CREB) protein during hypoxia in cerebral cortex of newborn piglets and the effect of nitric oxide synthase inhibition / O. P. Mishra, Q. M. Ashraf, M. Delivoria-Papadopoulos // *Neuroscience*. –2002. –V. 115, N 3. –P. 985-991.
258. Miwa H. Analysis of calcium spiking using a cameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell / H. Miwa, J. Sun, G. E. Oldroyd, J. Allan Downie // *The Plant Journal*. – 2006. – V. 48, N6. – P. 883-894.
259. Miya A. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*/A. Miya, P. Albert, T. Shinya, Y. Desaki, K. Ichimura, K. Shirasu,... N. Shibuya // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – V. 104, N 49. – P. 19613-19618.

260. Morieri G. Host- specific Nod- factors associated with *Medicago truncatula* nodule infection differentially induce calcium influx and calcium spiking in root hairs/ G. Morieri, E. A. Martinez, A. Jarynowski, H. Driguez, R. Morris, G. E. Oldroyd, J. A. Downie //New Phytologist. – 2013. – V. 200, N 3. – P. 656-662.
261. Moutinho A. Cyclic AMP act as a second messenger in pollen tube growth and reorientation / A. Moutinho, P. J. Hussey, A. J. Trevawas, R. Malho // Proceedings of the National Academy of Sciences– 2001. – V. 98. – P. 10481-1048.
262. Murray J. D. Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes / J. D. Murray // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2011. – V. 24. – P. 631-639.
263. Nagata M. Expression of a class 1 hemoglobin gene and production of nitric oxide in response to symbiotic and pathogenic bacteria in *Lotus japonicus*/ M.Nagata, E. I. Murakami, Y. Shimoda, F. Shimoda-Sasakura, K. I. Kucho, A. Suzuki,... T.Uchiumi //Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2008. – V. 21, N 9. – P. 1175-1183.
264. Nanda A. K. Reactive oxygen species during plant- microorganism early interactions /A. K. Nanda, E. Andrio, D. Marino, N. Pauly, C.Dunand //Journal of integrative plant biology. – 2010. – V. 52, N 2. – P. 195-204.
265. Nelson M. S. Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes / M. S. Nelson, M. J. Sadowsky // Frontiers in plant science. – 2015. – V. 6. – P. 491.
266. Nurnberger T. Pathogen- Associated Molecular Patterns (PAMP) and PAMP Triggered Immunity / T. Nurnberger, B. Kemmerling // Annual Plant Reviews online. – 2018. – P. 16-47.
267. Okazaki S. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system / S. Okazaki, T. Kaneko, S. Sato, K. Saeki // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2013. – V. 110. – P. 17131-17136.

268. Oldroyd G. E. D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants / G. E. D. Oldroyd // Nature Reviews Microbiology. – 2013. – V. 11, N 4. – P. 252.
269. Ordoñez N. M. Cyclic mononucleotides modulate potassium and calcium flux responses to H₂O₂ in *Arabidopsis* roots / N. M. Ordonez, C. Marondedze, L. Thomas, S. Pasqualini, L. Shabala, S. Shabala, C. Gehring // FEBS letters. – 2014. – V. 588, N 6. – P. 1008-1015.
270. Pande A. NO Network for Plant–Microbe Communication Underground: A Review/A. Pande, B. G. Mun, D. S. Lee, M. Khan, G. M. Lee, A. Hussain, B. W. Yun //Frontiers in Plant Science. – 2021. – V. 12. – P. 431-441.
271. Peleg-Grossman S. ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression / S. Peleg-Grossman, N. Melamed-Book, A. Levine //Plant signaling & behavior. – 2012. – V. 7, N 3. – P. 409-415.
272. Pietraszko M. An Effect of Weather and Soil Conditions and Their Interaction on Infection of Leaves and Tubers of Potato with Bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* / M. Pietraszko, G. Gryń, W. Przewodowski // American journal of potato research. – 2018. – V. 95, N 3. – P. 278-285.
273. Pietrowska-Borek M. Cyclic nucleotides and nucleotide cyclases in plants under stress / M. Pietrowska-Borek, T. Chadzinikolau, S. Borek // Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes. – Springer, New York, NY. – 2014. – P. 119-151.
274. Plakidou-Dymock S. A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins / S. Plakidou-Dymock, D. Dymock, R. Hooley //Current Biology. – 1998. – V. 8, N 6. – P. 315-324.
275. Poovaiah B. W. Calcium/calmodulin-mediated gravitropic response in plants / B. W. Poovaiah, T. Yang, J. J. W. A. van Loon // Life in Space for Life on Earth. – 2002. – V. 501. – P. 265-268.
276. Puppo A. Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the legume—rhizobium and mycorrhizal symbioses / A. Puppo, N. Pauly, A.

- Boscari, K. Mandon, R. Brouquisse //Antioxidants & redox signaling. – 2013. – V. 18. – N 16. – P. 2202-2219.
277. Qi J. Apoplastic ROS signaling in plant immunity / J. Qi, J. Wang, Z. Gong, J. M. Zhou // Current opinion in plant biology. – 2017. – V. 38. – P. 92-100.
278. Rafiqi M. In the trenches of plant pathogen recognition: Role of NB-LRR proteins / M. Rafiqi, M. Bernoux, J. G. Ellis, P. N. Dodds // Seminars in cell & developmental biology. – Academic Press, 2009. – V. 20, N 9. – P. 1017-1024.
279. Rasmussen S. R. Intraradical colonization by arbuscular mycorrhizal fungi triggers induction of a lipochitooligosaccharide receptor / S. R. Rasmussen, W. Füchtbauer, M. Novero, V. Volpe, N. Malkov, A. Genre,... S. Radutoiu, // Scientific reports. – 2016. – V. 6. – P. 29733.
280. Ratu S. T. N. *Rhizobia* use a pathogenic-like effector to hijack leguminous nodulation signaling / S. T. N. Ratu, A. Teulet, H. Miwa, S. Masuda, H. P. Nguyen, M. Yasuda, ... S. Okazaki, //Scientific reports. – 2021. – V. 11, N 1. – P. 1-15.
281. Roberts N. J. A Nod factor-binding lectin is a member of a distinct class of apyrases that may be unique to the legumes / N. J. Roberts, J. Brigham, B. Wu, J. B. Murphy, H. Volpin, D. A. Phillips, M. E. Etzler //Molecular and General Genetics MGG. – 1999. – V. 262, N 2. – P. 261-267.
282. Roberts N. J. Rhizobial and mycorrhizal symbioses in *Lotus japonicus* require lectin nucleotide phosphohydrolase, which acts upstream of calcium signaling / N. J. Roberts, G. Morieri, G. Kalsi, A. Rose, J. Stiller, A. Edwards,... M. E. Etzler //Plant physiology. – 2013. – V. 161, N 1. – P. 556-567.
283. Robledo M. Role of *Rhizobium* endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces / M. Robledo, L. Rivera, J. I. Jiménez-Zurdo, R. Rivas, F. Dazzo, E. Velázquez,... P. F. Mateos //Microbial cell factories. – 2012. – V. 11, N 1. – P. 1-12.

284. Roelofs J. Deducing the origin of soluble adenylyl cyclase, a gene lost in multiple lineages / J. Roelofs, J. M. Van Haastert // Molecular biology and evolution. – 2002. – V. 19. – P. 2239-2246.
285. Romantschuk M. Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces / M. Romantschuk // Annu.Rev.Phytopathol. – 1992. – V. 30, N 2. – P. 225-243.
286. Ruzvidzo O. Recombinant expression and functional testing of candidate adenylate cyclase domains / O. Ruzvidzo, B. T. Dikobe, D. T. Kawadza, G. H. Mabadahanye, P. Chatukuta, L. Kwezi // Cyclic Nucleotide Signaling in Plants. – Humana Press, Totowa, NJ. – 2013. – P. 13-25.
287. Ruzvidzo O. New Perspectives on Plant Adenylyl Cyclases / O. Ruzvidzo, C. Gehring, A. Wong // Frontiers in Molecular Biosciences. – 2019. – V. 6. – P. 136.
288. Sabetta W. Cyclic AMP deficiency negatively affects cell growth and enhances stress-related responses in tobacco Bright Yellow-2 cells / W. Sabetta, C. Vannini, A. Sgobba, M. Marsoni, A. Paradiso, F. Ortolani, M. Bracale, L. Viggiano, E. Blanco, M. Concetta de Pinto // Plant molecular biology. – 2016. – V. 90, N 4-5. – P. 467-483.
289. Sabetta W. Genetic buffering of cyclic AMP in *Arabidopsis thaliana* compromises the plant immune response triggered by an avirulent strain of *Pseudomonas syringae* pv. Tomato / W. Sabetta, E. Vandelle, V. Locato, A. Costa, S. Cimini, A. B. Moura, L. Luoni, A. Graf, L. Viggiano, L. De Gara, D. Bellin, E. Blanco, M. C. de Pinto // The Plant Journal. – 2019. – V. 98, N 4. – P. 590-606.
290. Saeki K. *Rhizobial* measures to evade host defense strategies and endogenous threats to persistent symbiotic nitrogen fixation: a focus on two legume-rhizobium model systems / K. Saeki // Cellular and molecular life sciences. – 2011. – V. 68, N 8. – P. 1327-1339.

291. Santos R. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction/ R. Santos //Molecular plant-microbe interactions. – 2001. – V. 14, N 1. – P. 86-89.
292. Saxena I. Cross talk between H₂O₂ and interacting signal molecules under plant stress response / I. Saxena, S. Srikanth, Z. Chen // Frontiers in plant science. – 2016. – V. 7. – P. 570-586.
293. Scandalios J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses / J. G. Scandalios // Brazilian journal of medical and biological research. – 2005. – V. 38, N 7. – P. 995-1014.
294. Schroeder J. I. Guard cell signal transduction / J. I. Schroeder, G. J. Allen, V. Hugouvieux, J. M. Kwak, D. Waner // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2001. –V. 52. – P. 627-658.
295. Shafikova T. N. Extracellular polysaccharides of potato ring rot pathogen/ T. N.Shafikova, V. N. Kopytchuk, E. Y. Epova, A. S. Romanenko //Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2006. – V. 2, N 1.– P. 4-9.
296. Sharaf M. A. Changes in cyclic nucleotide levels correlated with growth, division, and morphology in *Chlamydomonas chemostat* culture / M. A. Sharaf, D. W. Rooney // Biochemical and biophysical research communications. – 1982. – V. 105, N 4. – P. 1461-1465.
297. Shi C. Ethylene mediates brassinosteroid induced stomatal closure via Gα protein activated hydrogen peroxide and nitric oxide production in *Arabidopsis* / C. Shi, C. Qi, H. Ren, A. Huang, S. Hei, X. She //The Plant Journal. – 2015. – V. 82, N 2. – P. 280-301.
298. Shine M. B. Signaling mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens / M. B. Shine, X. Xiao, P. Kachroo, A. Kachroo // Plant science. – 2019. – V. 279. – P. 81-86.
299. Smit G. Involvement of both cellulose fibrils and Ca²⁺- dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips / G. Smit, I. Kijne, B. Lugtenberg // J. Bacteriol. – 1987. – V. 169, N 19. – P. 4292-4301.

300. Smit P. *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling / P. Smit, E. Limpens, R. Geurts, E. Fedorova, E. Dolgikh, C. Gough, T. Bisseling // *Plant physiology*. – 2007. – V. 145, N 1. – P. 183-191.
301. Spadaro D. The redox switch: dynamic regulation of protein function by cysteine modifications / D. Spadaro, B. W. Yun, S. H. Spoel, C. Chu, Y. Q. Wang, G. J. Loake // *Physiologia Plantarum*. – 2010. – V. 138, N 4. – P. 360-371.
302. Sreekanta S. The receptor like cytoplasmic kinase PCRK 1 contributes to pattern triggered immunity against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana* / S. Sreekanta, G. Bethke, N. Hatsugai, K. Tsuda, A. Thao, L. Wang, F. Katagiri, J. Glazebrook // *New Phytologist*. – 2015. – V. 207, N 1. – P. 78-90.
303. Staal J. Tracing the ancient origins of plant innate immunity / J. Staal, C. Dixelius // *Trends in Plant Science*. – 2007. – V. 12, N 8. – P. 334-342.
304. Stadtman E. R. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins / E. R. Stadtman, R. L. Levine // *Amino acids*. – 2003. – V. 25, N 3-4. – P. 207-218.
305. Sulima A. S. Selection signatures in the first exon of paralogous receptor kinase genes from the *Sym2* region of the *Pisum sativum* L. genome/ A. S. Sulima, V. A. Zhukov, A. A. Afonin, A. I. Zhernakov, I. A. Tikhonovich, L. A. Lutova // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – V. 8. – P. 1957-1977.
306. Sunahara R. Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling / R. Sunahara, R. Taussig // *Mol. Intervent*. – 2002. – V. 2. – P. 168-184.
307. Suzuki N. Coordination between ROS regulatory systems and other pathways under heat stress and pathogen attack / N. Suzuki, K. Katano // *Frontiers in plant science*. – 2018. – V. 9. – P. 490.
308. Swarbreck S. M. Plant calcium-permeable channels / S. M. Swarbreck, R. Colaço, J. M. Davies // *Plant Physiology*. – 2013. – V. 163, N 2. – P. 514-522.

309. Swieżawska B. Molecular cloning and characterization of a novel adenylyl cyclase gene, HpAC1, involved in stress signaling in *Hippeastrum x hybridum* / B. Swieżawska, K. Jaworski, A. Pawełek, W. Grzegorzewska, P. Szewczuk, A. Szmidt-Jaworska // Plant physiology and biochemistry. – 2014. – V. 80. – P. 41-52.
310. Swieżawska-Boniecka B. Cross Talk Between Cyclic Nucleotides and Calcium Signaling Pathways in Plants—Achievements and Prospects / B. Swieżawska-Boniecka, M. Duszyn, M. Kwiatkowski, A. Szmidt-Jaworska, K. Jaworski //Frontiers in Plant Science. – 2021. – V. 12. – P. 190-197.
311. Takemoto J. Y. Mechanism of action of the phytotoxin syringomycin: a resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae* reveals an involvement of Ca²⁺ transport/ J. Y. Takemoto, L. Zhang, N. Taguchi, T. Tachikawa, T. Miyakawa // Microbiology. – 1991. – V. 137, N 3. – P. 653-659.
312. Terakado I. Changes in cyclic nucleotides during nodule formation / I. Terakado, S. Fujihara, T. Yoneyama // Soil science and plant nutrition – 2003. – V. 49. – P. 459-462.
313. Tezuka T. Self-incompatibility involved in the level of acetylcholine and cAMP / T. Tezuka, I. Akita, N. Yoshino // Plant signaling & behavior. – 2007. – V. 2, N 6. – P. 475-476.
314. Thomas L. Proteomic signatures implicate cAMP in light and temperature responses in *Arabidopsis thaliana* / L. Thomas, C. Marondedze, L. Ederli, S. Pasqualini, C. Gehring // Journal of proteomics. – 2013. – V. 83. – P. 47-59.
315. Tian C. F. Plant-activated bacterial receptor adenylate cyclases modulate epidermal infection in the *Sinorhizobium meliloti*–*Medicago symbiosis* //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – V. 109, N 17. – P. 6751-6756.
316. Torres M. A. ROS in biotic interactions/M. A.Torres //Physiologia plantarum. – 2010. – V. 138, N 4. – P. 414-429.
317. Trdá L. Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: pattern recognition receptors in the frontline / L. Trdá, F.

- Boutrot, J. Claverie, D. Brulé, S. Dorey, B. Poinssot // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – V. 6. – P. 219-230.
318. Trusov Y. Heterotrimeric G protein γ subunits provide functional selectivity in G $\beta\gamma$ dimer signaling in *Arabidopsis* / Y. Trusov, J. E. Rookes, K. Tilbrook, D. Chakravorty, M. G. Mason, D. Anderson, J-G. Chen, A. M. Jones, J. R. Botela // *Plant Cell*. - 2007. – V. 19. – P. 1235-1250.
319. Tsuda K. Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses / K. Tsuda, M. Sato, J. Glazebrook, J. D. Cohen, F. Katagiri // *Plant J. Cell Mol. Biol.* – 2008. – V. 53, N 5. – P. 763-775.
320. Turgeon B. G. Early events in the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. Time course and cytology of the initial infection process/ B. G. Turgeon, W. D. Bauer // *Canadian Journal of Botany*. – 1982. – V. 60, N 2. – P. 152-161.
321. Van Loon L. C. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria / L. C. Van Loon, P. Bakker, C. M. J. Pieterse // *Annual review of phytopathology*. – 1998. – V. 36, N 1. – P. 453-483.
322. Vasse J. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*—alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction / J. Vasse, F. de Billy, G. Truchet // *The Plant Journal*. – 1993. – V. 4, N 3. – P. 555-566.
323. Via V. D. How legumes recognize rhizobia / V. D. Via, M. E. Zanetti, F. Blanco // *Plant signaling & behavior*. – 2016. – Vl. 11, N 2. – P. e1120396.
324. Volotovski D. Second messengers mediate increases in cytosolic calcium in tobacco protoplasts / D. Volotovski, S. G. Sokolovsky, O. V. Molchan, M. R. Knight // *Plant Physiol.* – 1998. – V. 117. – P. 1023-1030.
325. Vranova E. Signal transduction during oxidative stress/ E. Vranova, D. Inze, F. Van Breusegem // *Journal of experimental botany*. – 2002. – P. 53, N 372. – P. 1227-1236.
326. Wang Q. A bacterial carbohydrate links innate and adaptive responses through Toll-like receptor 2 / Q. Wang, R. M. McLoughlin, B. A. Cobb, M.

- Charrel-Dennis, K. J. Zaleski, D. Golenbock, A. O. Tzianabos, D. L. Kasper // J. Exp. Med. – 2006. – V. 203. – P. 2853-2863.
327. Wang S. Characterization of the *Arabidopsis* Heterotrimeric G Protein / S. Wang, S. M. Assmann, N. V. Fedoroff // J. Biol. Chem. – 2008. – V. 283, Is. 20. – P. 13913-13922.
328. White A. A. Separation of cyclic 3',5'-nucleoside monophosphates from other nucleotides on aluminum oxide columns. Application to the assay of adenylyl cyclase and guanylyl cyclase / A. A. White, T. V. Zenser // Anal. Biochem. – 1971. – V. 41. – P. 372-396.
329. Willoughby D. Organization and Ca^{2+} regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains / D. Willoughby, D. M. F. Cooper // Physiological reviews. – 2007. – V. 87, N 3. – P. 965-1010.
330. Wong A. Computational identification of candidate nucleotide cyclases in higher plants / A. Wroblewski T. Comparative. Wong, C. Gehring // Cyclic Nucleotide Signaling in Plants. – Humana Press, Totowa, NJ. – 2013. – P. 195-205.
331. Wroblewski T. Comparative large-scale analysis of Interactions between several crop species and the effector repertoires from multiple pathogens of *Pseudomonas* and *Ralstonia* / T. Wroblewski, K. S. Caldwell, U. Piskurewicz, K. A. Cavanaugh, H. Xu, A. Kozik, O. Ochoa, L. K. McHale, K. Lahre, J. Jelenska, J. A. Castillo, D. Blumenthal, B. A. Vinatzer, J. T. Greenberg, R. W. Michelmore // Plant Physiol. – 2009. – V. 150. – P. 1733-1749.
332. Wu J. Spermidine oxidase derived H_2O_2 regulates pollen plasma membrane hyperpolarization activated Ca^{2+} permeable channels and pollen tube growth / J. Wu, Z. Shang, J. Wu, X. Jiang, P. N. Moschou, W. Sun, ... S. Zhang // The Plant Journal. – 2010. – V. 63, N 6. – P. 1042-1053.
333. Xu J. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K^+ transporter AKT1 in *Arabidopsis* / J. Xu, H. D. Li, L. Q. Chen, Y. Wang, L. L. Liu, L. He, W. H. Wu // Cell. – 2006. – V. 125, N 7. – P. 1347-1360.

334. Yamamoto C. Distribution of adenylyl cyclase/cAMP phosphodiesterase gene, CAPE, in streptophytes reproducing via motile sperm / C. Yamamoto, F. Takahashi, Y. Ooe, H. Shirahata, A. Shibata, M. Kasahara, //Scientific reports. – 2021. – V. 11, N 1. – P. 1-10.
335. Yang H. A new adenylyl cyclase, putative disease-resistance RPP13-like protein 3, participates in abscisic acid-mediated resistance to heat stress in maize/ H. Yang, Y. Zhao, N. Chen, Y. Liu, S. Yang, H. Du,... & X. Hu//Journal of Experimental Botany. – 2021. – V. 72, N 2. – P. 283-301.
336. Yeh Y. H. The *Arabidopsis* malectin-like/LRR-RLK IOS1 is critical for BAK1-dependent and BAK1-independent pattern-triggered immunity / Y. H. Yeh, D. Panzeri, Y. Kadota, Y. C. Huang, P. Y. Huang, C. N. Tao, M. Roux, H. C. Chien, T. C. Chin, P. W. Chu, C. Zipfel, L. Zimmerli// The Plant Cell. – 2016. – V. 28, N 7. – P. 1701-1721.
337. Zhang J. Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector / J. Zhang //Cell host & microbe. – 2010. – V. 7, N 4. – P. 290-301.
338. Zhang L. Functional analysis of the type 3 effector nodulation outer protein L (NopL) from *Rhizobium* sp. NGR234: symbiotic effects, phosphorylation, and interference with mitogen-activated protein kinase signaling/ L. Zhang, X. J. Chen, H. B. Lu, Z. P. Xie, C. Staehelin // Journal of Biological Chemistry. – 2011. – V. 286, N 37. – P. 32178-32187.
339. Zhao X. MAP kinase pathways and fungal pathogenesis / X. Zhao, R. Mehrabi, J.-R. Xu// Eukaryotic Cell. –2007. –V. 10. – P. 1701-1714.
340. Zheng X. Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation / X.-Y. Zheng, N. W. Spiveya, W. Zengb, P.-P. Liuc, Q. Fua, D. F. Klessige, H. Y. Heb, X. Dong // Cell host & microbe. – 2012. – V. 11, N 6. – P. 587-596.
341. Zhukov V. The pea Sym37 receptor kinase gene controls infection-thread initiation and nodule development / V. Zhukov, S. Radutoiu, L. H. Madsen, T.

- Rychagova, E. Ovchinnikova, A. Borisov,... J. Stougaard // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2008. – V. 21, N 12. – P. 1600-1608.
342. Zimmermann S. Ion channels in plant signaling / S. Zimmermann, T. Ehrhardt, G. Plesch, Muller-Rober. // *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 55.2– 1999. – V. 55. –P. 183– 203.
343. Zipfel C. Plant signalling in symbiosis and immunity / C. Zipfel, G. E. D. Oldroyd // *Nature*. – 2017. – V. 543, N 7645. – P. 328-336.