

МОДУЛЯЦИЯ УРОВНЯ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И КОМПОНЕНТОВ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЭФФЕКТИВНОСТИ ШТАММОВ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *VICEAE*

О.В. Кузакова, Л.А. Ломоватская, А.С. Романенко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, titanic87@list.ru

Аннотация: Изучали динамику изменений уровней цАМФ и H_2O_2 в зонах корня проростков гороха, отличающихся разной чувствительностью к ризобияльной инфекции, при инокуляции их *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* с разной симбиотической эффективностью и конкурентоспособностью. Установлено, что зоны корня неодинаково реагируют на инокуляцию бактериями. Предполагается, что различия в степени модуляции уровней сигнальных молекул в ответ на инфицирование контрастными по степени эффективности штаммами могут быть связаны с выделением последними МАМРs разного состава.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., *Rhizobium leguminosarum*, цАМФ, H_2O_2 , бобово-ризобияльный симбиоз

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-450-453

Симбиотическое взаимодействие между бобовыми растениями и клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium leguminosarum* (*Rlv*) во многом зависит от нодуляционной эффективности последних [Глянько, 2017]. Эффективные штаммы бактерий способны образовывать крупные, азотфиксирующие клубеньки, в то время как неэффективные штаммы инициируют образование мелких, белых клубеньков [Lohar et al., 2006].

Известно, что на всех этапах контакта симбионтов происходит синтез и обмен различными сигнальными молекулами, в результате которого запускаются процессы, определяющие специфичность взаимодействия [Gourion et al., 2015; Nelson, Sadowsky, 2015]. Такой обмен приводит к модуляции активности сигнальных систем как растений, так и бактерий и определяет дальнейший ход событий. Так, у гороха в зоне молодых корневых волосков при инфицировании *Rhizobium leguminosarum* изменяется активность НАДФН-оксидазы, что приводит к изменению уровня АФК [Bindschedler et al., 2001]. H_2O_2 , в частности, регулирует кальциевый статус клетки путем прямого или опосредованного влияния на поступление ионов Ca^{2+} в цитозоль. Показана роль H_2O_2 в установлении гормонального статуса клеток, в модуляции активности МАП-киназной сигнальной системы, запуске факторов транскрипции. Однако, до конца не ясна роль вторичных мессенджеров других сигнальных систем.

Поэтому целью данного исследования являлось выявление особенностей динамики уровней цАМФ и H_2O_2 в зонах корня гороха под воздействием различающихся по эффективности штаммов *Rlv*, в связи с интенсивностью их сорбции.

В работе использовали следующие штаммы *Rhizobium leguminosarum*: 1022 – эффективный; 1064 – неэффективный, высоконкурентный; 1065 – неэффективный по азотфиксации.

Инокуляцию трехсуточных стерильных проростков гороха *Rlv* проводили в течение 360 мин. Уровень цАМФ определяли методом иммуноферментного анализа [Lomovatskaya et al., 2011]. Концентрацию H_2O_2 выявляли при помощи FOX-метода, основанного на изменении окраски ксиленолового оранжевого [Galletti, 2008].

Известно, что у бобовых растений участки корня по-разному восприимчивы к проникновению бактерий. Для анализа использовали пять зон корня: 1 – меристема,

2мм; 2 – зона без корневых волосков, 2-7мм; 3 – зона, содержащая зачатки корневых волосков, 7-12 мм; 4 – зона молодых корневых волосков, 12-17 мм; 5 – зона сформированных корневых волосков, 17-22мм от кончика корня; 6 – эпикотиль.

Проведенные исследования показали, что различные по эффективности штаммы *R/v* различались между собой как по интенсивности сорбции, так и по реакции вторичных мессенджеров в различных участках корня (рис. 1-3).

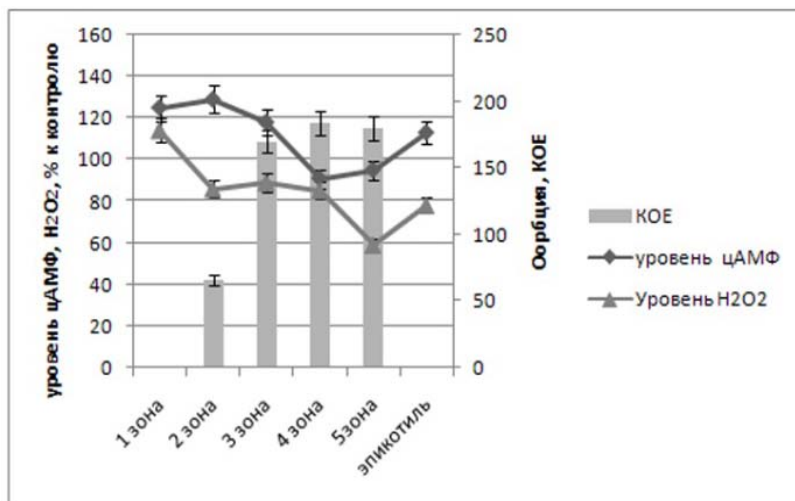


Рис. 1. Интенсивность сорбции *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* 1022, изменение концентрации цАМФ, H₂O₂ в различных зонах корня проростка гороха.

Наибольшее количество колониеобразующих единиц (КОЕ) эффективного 1022 и неэффективного 1064 штаммов было зафиксировано в 3-5 зонах (120-190 КОЕ) (рис. 1, 2).

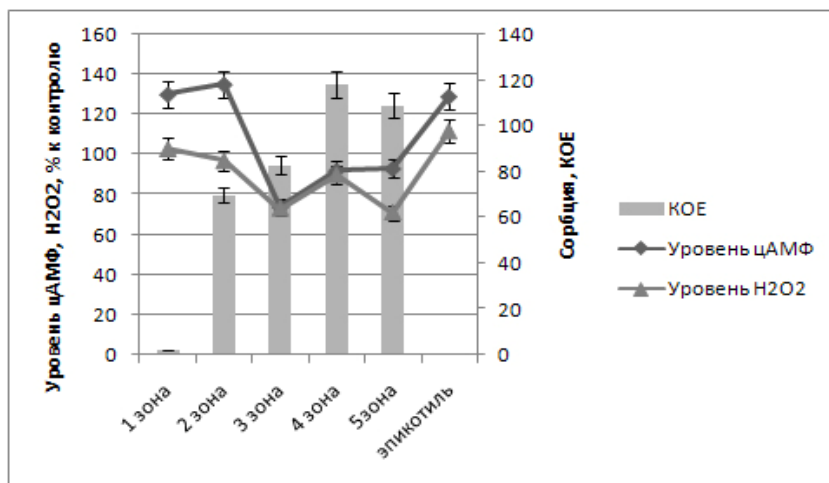


Рис. 2. Интенсивность сорбции *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* 1064, изменение концентрации цАМФ, H₂O₂ в различных зонах корня проростка гороха.

Наибольшее проникновение неэффективного штамма 1065 наблюдалось в 5 зоне (32 КОЕ) (рис. 3). Различия в адгезии бактерий разными зонами корня может быть связано с длиной корневых волосков, находящихся в этих участках. Таким образом, 3-5 зоны имеют большую площадь для проникновения микрочастички.

Высокий уровень цАМФ и H₂O₂ в 1-2 зонах корня гороха (130-140% от контроля),

при инфицировании всеми штаммами *Rlv* на фоне сниженной сорбции свидетельствует об активной защитной функции сигнальных систем, продуцирующих сигнальные молекулы, что создает препятствие для проникновения микросимбионтов в клетки корня.

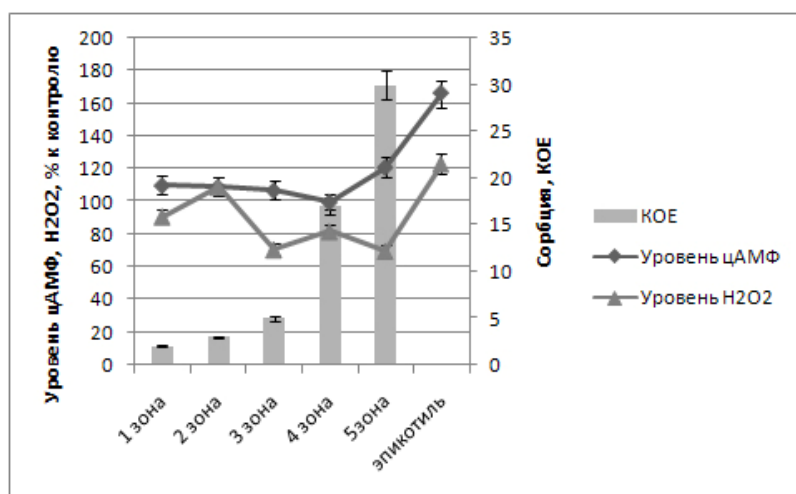


Рис. 3. Интенсивность сорбции *Rhizobium leguminosarum* bv.viceae 1065, изменение концентрации цАМФ, H₂O₂ в различных зонах корня проростка гороха.

Следует отметить высокий уровень вторичных мессенджеров и в эпикотиле, где сорбция отсутствовала (рис. 1-3). В зонах молодых и зрелых корневых волосков (3-5 зоны) цАМФ, H₂O₂ подавляют защитные механизмы растений, что, в свою очередь, приводит к установлению симбиотических взаимоотношений.

Основываясь на полученных результатах, можно предположить, что аденилатциклаза выполняет регуляторную функцию, запуская процессы, приводящие к установлению или блокированию симбиотических взаимоотношений между *Rhizobium leguminosarum* и бобовыми растениями [Ломоватская и др., 2010].

Различия в степени модуляции уровней сигнальных молекул в ответ на инфицирование контрастными по степени эффективности штаммами ризобий могут быть связаны с выделением последними MAMPs (microbial-associated molecular patterns) [Saeki, 2011]. В состав паттернов входят экзополисахариды, липополисахариды, адгезины, глюкан.

Эти вещества способны активировать различные сигнальные системы растений с помощью трансмембранных рецепторов PRRs (pattern recognition receptors). Кроме того, *Rhizobium leguminosarum* отличаются и по составу липохитоолигосахаридов [Fliegmann, Bono, 2015]. Можно предположить, что они способны модулировать активность сигнальных систем в различных зонах корня гороха через специфические рецепторы к определенным компонентам MAMPs.

Кроме того, известно, что MAMPs способны вызывать «кальциевую волну», приводя к повышению концентрации внутриклеточного Ca²⁺ [Galletti, 2008]. Всплеск этого вторичного мессенджера в клетках растений модулирует как уровень пероксида водорода, так и, возможно, активность растворимой и трансмембранной форм аденилатциклазы, являющимися кальций-зависимыми формами фермента [Jeandroz et al., 2013].

Таким образом, можно предположить, что нодуляционные свойства бактерий оказывают различное влияние на уровень цАМФ и пероксида водорода в клетках корня гороха.

Литература

Глянько А.К. Иммуитет бобового растения, инфицированного клубеньковыми бактериями *Rhizobium* spp. F. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53. – С. 136–145.

Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Филинова Н.В. Аденилатциклазы и устойчивость растений к стрессам. – Иркутск: Изд-во Института географии СО РАН, 2010. – С. 87–91.

Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P. Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca^{2+} // New Phytol. – 2001. – V. 151. – P. 185–194.

Fliegmann J., Bono J.-J. Lipo-chitoooligosaccharidic nodulation factors and their perception by plant receptors // Glycoconj. J. – 2015. – V. 32. – P. 455–464.

Galletti R. The AtrbohD-Mediated Oxidative Burst Elicited by oligogalacturonides in *Arabidopsis* is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea* // Plant Physiol. – 2008. – V. 148. – P. 1695–1706.

Gourion B., Berrabah F., Ratet P., Stacey G. Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity // Trends Plant Sci. – 2015. – V. 20. – P. 186–194.

Jeandroz S., Lamotte O., Astier J., Rasul S., Trapet P., Besson-Bard A., Bourque S., Nicolas-Frances V., Berkowitz G.A., Wendehenne D. There's more to the picture than meets the eye: nitric cross talk with Ca^{2+} signaling // Plant Physiol. – 2013. – V. 163. – P. 459–470.

Lohar D.P., Sharopova N., Endre G., Penuela S., Samac D., Town C., Silverstein K.A.T., Vanden Bosch K.A. Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula* // Plant Physiol. – 2006. – V. 140. – P. 221–234.

Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V., Dudareva L.V. Determination of cAMP in plant cells by a modified enzyme immunoassay method // Plant Cell Rep. – 2011. – V. 30. – P. 125–132.

Nelson M.S., Sadowsky M.J. Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes // Front. Plant Sci. – 2015. – V. 6. – P. 491–496.

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 // Cel. Mol. Life Sci. – 2011. – V. 68. – P. 1327–1339.

MODULATION OF THE HYDROGEN PEROXIDE LEVEL AND COMPONENTS OF THE ADENYLATE CYCLASE SIGNALING SYSTEM IN ROOTS OF PEA SEEDLINGS DEPENDING ON THE EFFECTIVENESS OF *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *VICEAE* STRAINS

O.V. Kuzakova, L.A. Lomovatskaya, A.S. Romanenko

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, titanic87@list.ru

Abstract. The dynamics of changes in the levels of cAMP and H_2O_2 in root zones of pea seedlings which differ in their sensitivity to the rhizobial infection while being inoculated by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* with different symbiotic efficiency and competitiveness was studied. The root zones have been established to react unequally to the bacterial inoculation. The differences in the degree of modulation of the levels of signaling molecules in response to the infecting with the contrasting strains are supposed to be associated with the release of MAMPs of a various composition by the latter.

Keywords: *Pisum sativum* L., *Rhizobium leguminosarum*, cAMP, H_2O_2 , legume-rhizobial symbiosis