

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БОБОВОГО РАСТЕНИЯ С РАЗЛИЧНЫМИ ШТАММАМИ КЛУБЕНЬКОВЫХ И ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ НА УРОВНЕ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ КАЛЬЦИЕВОЙ И NO-СИНТАЗНОЙ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ

А.А. Ищенко, А.К. Глянько

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской Академии наук, Иркутск, Россия, aspt25@yandex.ru

Аннотация. Изучали начальные этапы взаимодействия бобового растения с симбиотическими и патогенными бактериями с целью сравнения активности отдельных компонентов кальциевой и NO-синтазной сигнальных систем.

Ключевые слова. Симбиоз, кальций, активные формы азота

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-392-396

В биологии накоплен большой объем информации о симбиотической фиксации атмосферного азота с различных научных позиций: физиологических, биохимических, генетических, морфологических, агрономических и других [Проворов, Воробьев, 2012]. Однако существуют невыясненные вопросы, требующие своего разрешения. К ним можно отнести: устойчивость бобового растения к проникновению ризобий и участие врожденных иммунных систем растения в процессах инфекции и азотфиксации; роль ризобиальных Nod-факторов (NF) в подавлении защитных систем растения-хозяина [Глянько, Ищенко, 2017]. Растения, как и животные, воспринимают приходящие из окружающей среды сигналы различной природы и с помощью генетического аппарата реагируют на них. Бактериальный NF-сигналинг тесно взаимодействует с растительными сигнальными системами: кальциевой, NO-синтазной, НАДФН-оксидазной [Глянько, Ищенко, 2017]. Экспрессия симбиотических ядерных генов растения-хозяина осуществляется с участием указанных сигнальных систем и их компонентов (АФК, АФА, Ca^{2+}). Доказано, что система кальциевых осцилляций – высоко консервативная часть симбиотического сигнального пути, которая определяет роль кальция в генетическом влиянии на формирование бобово-ризобиального симбиоза (БРС) [Granqvist et al., 2015]. В свою очередь вход ионов Ca^{2+} в цитоплазму оказывает влияние на генерацию активных форм азота (АФА), которые функционируют как многоцелевой регулятор различных механизмов симбиотического процесса [Nichi et al., 2015]. Однако роль АФА в процессах формирования и функционирования БРС одна из наименее изученных сторон. При изучении этого вопроса основное внимание уделяется NO-молекуле, обладающей широким спектром биологического действия [Meilhoc et al., 2011]. Оксид азота (NO) обнаруживается уже в первые часы после взаимодействия ризобий и бобового растения в инфекционных нитях, тканях клубеньковой меристемы, в азотфиксирующих клубеньках [Vaudouin et al., 2006; Meilhoc et al., 2011]. Есть данные, что NO может участвовать в регуляции образования клубеньков на корнях бобовых [Herouart et al., 2002], но высокие концентрации NO препятствуют инфицированию растений ризобиями и микоризой [Meuer et al., 2005]. NO взаимодействует с другими биологическими молекулами, например, фитогормонами и АФК [Колупаев, Карпец, 2009; Nichri et al., 2015].

В данной работе в краткосрочных опытах с этиолированными проростками гороха изучали влияние активатора (300 мкМ амиадорон) и ингибитора (400 мкМ $LaCl_3$) кальциевых каналов на временную динамику (в течение 60 мин, с интервалом в 10 мин) генерации оксида азота (NO) в норме (экспозиция на воде) и на фоне действия

биотических факторов инокуляция клубеньковыми (штаммы *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 245a и 248б) и патогенными (*Pseudomonas syringae* pv. *pisii*) бактериями.

Объект исследований – корни двухсуточных этиолированных проростков гороха (30-40 мм) сорта Ямальский. Содержание NO в тканях корня определяли с использованием флуоресцентного зонда 4,5-диаминофлуоресцеин-диацетата (DAF-2DA).

В результате проведенных экспериментов были получены следующие результаты. В нормальных условиях наблюдались колебания в уровне NO (рис. 1а), которые проявлялись в виде увеличения уровня NO через 10, 30 и 50 мин и снижения его через 20, 40 и 60 мин. Активатор кальциевых каналов – амиадорон (АМД) при добавлении его в среду инкубации вызывал увеличение интенсивности флуоресценции оксида азота по сравнению с контрольным вариантом на протяжении всего эксперимента. Кроме того, также следует отметить отсутствие характерных для нормальных условий флуктуаций в уровне оксида азота (рис. 1а). Ингибитор кальциевых каналов снижал уровень интенсивности флуоресценции оксида азота по сравнению с контролем на протяжении всего эксперимента (рис. 1б). Кроме того, также следует отметить, что на фоне хлорида лантана мы не наблюдали характерных для нормальных условий флуктуаций в уровне NO.

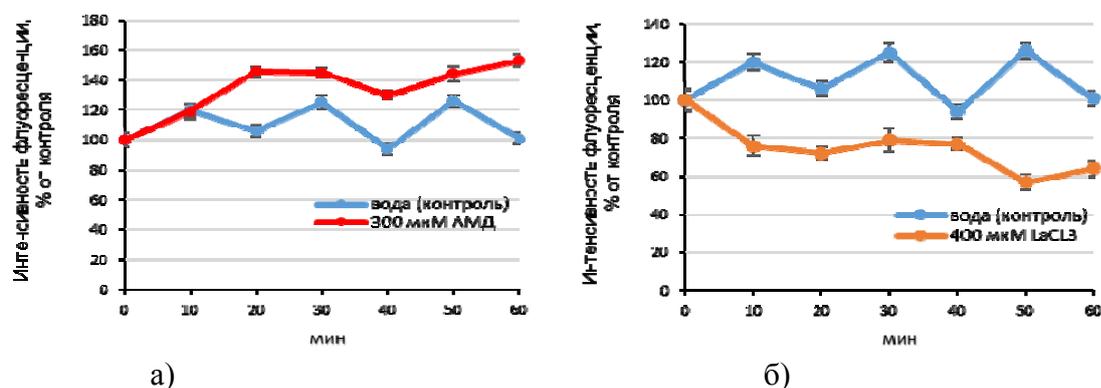


Рис. 1. Влияние активатора (а) и ингибитора (б) кальциевых каналов на динамику интенсивности флуоресценции оксида азота в корнях этиолированных проростков гороха на фоне воды.

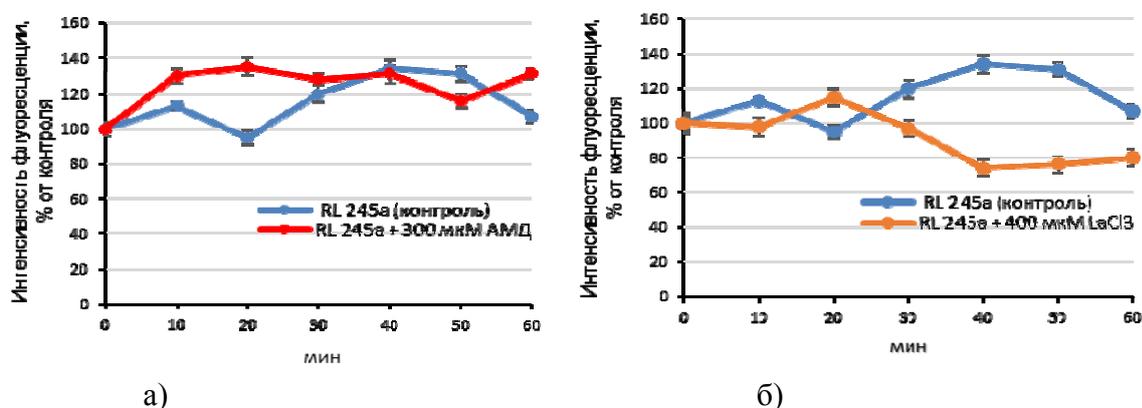


Рис. 2. Влияние активатора (а) и ингибитора (б) кальциевых каналов на динамику интенсивности флуоресценции оксида азота в корнях этиолированных проростков гороха на фоне взаимодействия с эффективным производственным штаммом клубеньковых бактерий.

На фоне действия эффективного штамма клубеньковых бактерий активатор кальциевых каналов нивелировал интенсивность флуоресценции NO по сравнению с контрольным вариантом. При этом уровень NO был выше или достоверно не отличался от контрольного (рис. 2а). При добавлении хлорида лантана в среду инкубации с клубеньковыми бактериями наблюдалось прямо противоположное, по сравнению с контролем, изменение динамики уровня флуоресценции NO. Т.е., так же, как и в контроле можно выделить два этапа изменения уровня оксида азота, но только в данном случае следует отметить тенденцию к снижению уровня NO (рис. 2б).

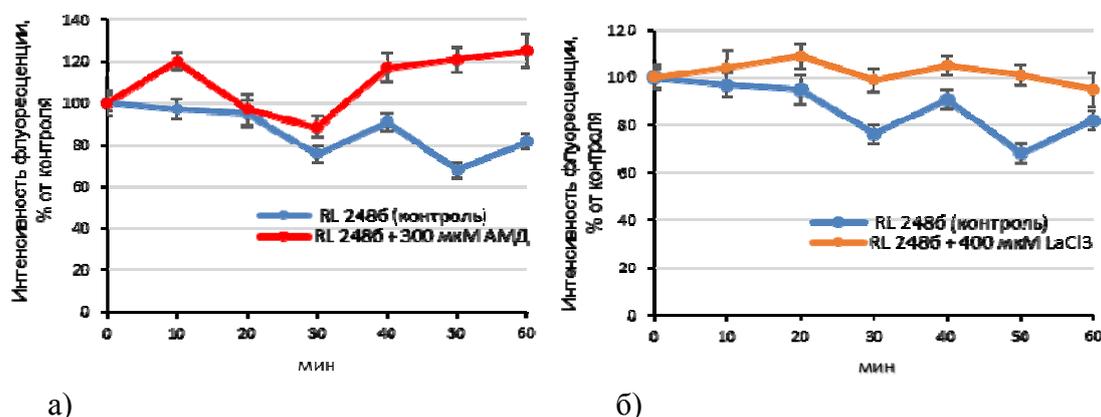


Рис. 3. Влияние активатора (а) и ингибитора (б) кальциевых каналов на динамику интенсивности флуоресценции оксида азота в корнях этиолированных проростков гороха на фоне взаимодействия с неэффективным производственным штаммом клубеньковых бактерий.

При добавлении амиадорона в среду инкубации с неэффективным штаммом ризобий интенсивность флуоресценции NO в корнях проростков гороха в целом была выше контрольной. Но в отличие от предыдущих вариантов можно выделить два временных отрезка, в которых происходило увеличение интенсивности флуоресценции оксида азота, а именно 0 – 30 и 30 – 60 мин (рис. 3а). Затем такой же эксперимент мы провели с неэффективным производственным штаммом ризобий. В результате была получена следующая динамика уровня NO (рис. 3б). В данном варианте при ингибировании кальциевых каналов уровень оксида азота оставался на постоянном уровне и достоверно не изменялся в течение эксперимента.

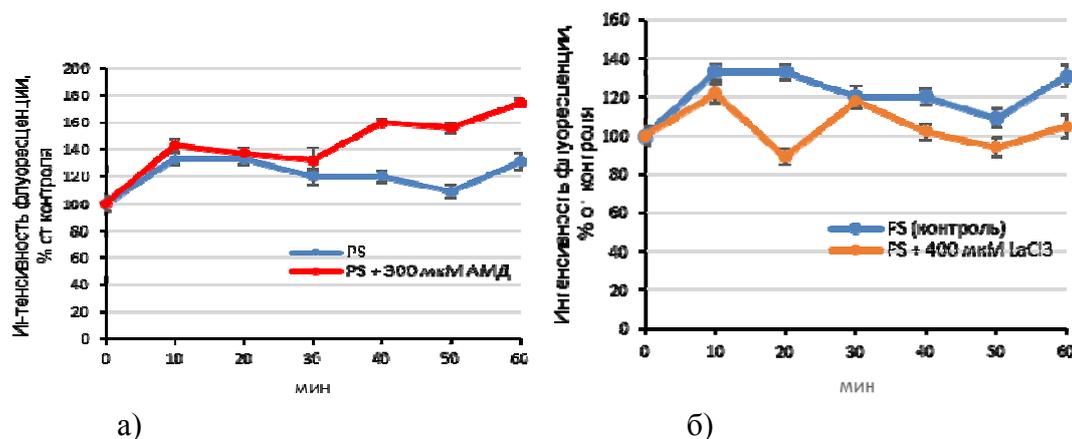


Рис. 4. Влияние активатора (а) и ингибитора (б) кальциевых каналов на динамику интенсивности флуоресценции оксида азота в корнях этиолированных проростков гороха на фоне взаимодействия с патогенными бактериями *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*.

При действии амиадорона на фоне патогенных бактерий уровень интенсивности

флуоресценции оксида азота в корнях проростков гороха (как и в двух первых вариантах) был выше контрольного и имел тенденцию к увеличению на протяжении всего эксперимента (рис. 4а). При добавлении хлорида лантана в среду инкубации с патогеном, также как и во всех предыдущих вариантах, в которых действие биотического фактора вызывало увеличение уровня NO, мы наблюдали тенденцию к его снижению при ингибировании кальциевых каналов (рис. 4б).

Таким образом, подводя итог проделанной работы, можно выявить следующие закономерности.

1. Биотические факторы по-разному влияют на динамику уровня оксида азота в корнях этиолированных проростков гороха, что может использоваться, как своеобразный код для передачи сигнала о природе действующего фактора.

2. Выше описанные процессы, по-видимому, зависят от активности кальциевых каналов, и, соответственно, уровня кальция, т.к. ингибирование последних без инокуляции вызывает снижение, а активация – увеличение уровня интенсивности флуоресценции оксида азота в корнях проростков гороха. Следует отметить отсутствие выраженных флуктуаций в уровне NO на фоне действия как $LaCl_3$, так и амиадорона.

3. Тенденция к снижению уровня NO также наблюдается при действии биотических факторов. В связи с этим можно предположить, что подобный механизм используют ризобии не эффективного производственного штамма, отличающиеся более агрессивной способностью колонизировать корневую систему растения-хозяина, о чем может свидетельствовать отсутствие реакции на ингибитор кальциевых каналов.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (молодежный грант №18-34-00221\18 мол_а).

Литература

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

Глянько А.К. Фитогормоны и клубенькообразование у бобовых растений // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2015. – Вип. 3 (36). – С. 6–19.

Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Участие оксида азота (NO) в трансдукции сигналов абиотических стрессоров у растений // Вестник ХНАУ. Серия Биология. – 2009. – Вып. 3 (18). – С. 6–19.

Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза. – СПб: Информ-Навигатор, 2012. – 400 с

Baudouin E., Pieuchot L., Engler G., Pauly N., Puppo A. Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula* –*Sinorhizobium meliloti* functional nodules // Mol. Plant-Microbe Interac. – 2006. – V. 19. – P. 970–975.

Granqvist E., Sun J., den Camp R. O., Pujic P., Hill L., Normand P., Morris R.J., Downie J.A., Geurts R., Oldroyd G.E.D. Bacterial-induced calcium oscillations are common to nitrogen-fixing associations of nodulating legumes and non-legumes // New Phytol. – 2015. – V. 207. – P. 551–558.

Hichri I., Bosscari A., Castella C., Rovere M., Puppo A., Brouquisse R. Nitric oxide: a multifaceted regulator of the nitrogen-fixing symbiosis // J. Exp. Bot. – 2015. – V. 66. – P. 2877–2887.

Herouart D., Baudouin E., Frenco P., Harrison J., Santos R., Jamet A., Van de Sype G., Touati D., Puppo A. Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: key role in the establishment of the legume-Rhizobium symbiosis // Plant Physiol. Biochem. – 2002. – V. 40. – P. 619–624.

Meilhoc E., Boscan A., Bruand C., Puppo A., Brouquisse R. Nitric oxide in legume-rhizobium symbiosis // Plant Science. – 2011. – V. 181. – P. 573–581.

PECULIARITIES OF INTERACTION OF THE FOREST PLANT WITH VARIOUS STAMMS OF CLUB AND PATHOGENIC BACTERIA AT THE LEVEL OF SEPARATE COMPONENTS OF CALCIUM AND NO-SYNTATIC SIGNAL SYSTEMS

A.A. Ishchenko, A.K. Glyanco

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *aspt25@yandex.ru*

Abstract. The initial stages of interaction between a legume plant and symbiotic and pathogenic bacteria were studied in order to compare the activity of individual components of the calcium and NO synthase signaling systems.

Keywords: *Symbiosis, pathogenesis, calcium, active forms of nitrogen*