

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 581.1:58.07.071

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ИУК И БАП НА МЕТАБОЛИЗМ
В ВОСПРИИМЧИВОЙ К РИЗОБИЯМ ЗОНЕ КОРНЕЙ ГОРОХА
(*Pisum sativum* L.) В НАЧАЛЬНЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ ИНОКУЛЯЦИИ**

© 2022 г. Л. Е. Макарова^а, *, Г. П. Акимова^а, М. Г. Соколова^а, И. Г. Петрова^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

*e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 24.05.2021 г.

После доработки 15.06.2021 г.

Принята к публикации 15.06.2021 г.

В восприимчивом к ризобиям участке корня проростков гороха (*Pisum sativum* L.) изучали проявления реакций в ответ на действие экзогенных ИУК и БАП и контролировали нодуляцию. Показателями реакции служили про/антиоксидантные активности “растворимых” и ионно- и ковалентно связанных с клеточными стенками пероксидаз, содержание экстрагируемых при помощи этилацетата “растворимых” фенольных соединений (ФС), их антирадикальная активность с ДФПГ, содержание связанных с клеточными стенками ФС, содержание салициловой кислоты (СК). Для исследования использовали этилированные проростки гороха, выращенные в условиях термостата с температурой 21°C, в кюветах на влажной фильтровальной бумаге. У исходных 2-суточных проростков на корнях наносили метки на расстоянии 5–20 мм от его кончика (восприимчивая к ризобиям зона) и проростки подвергали одновременно инокуляции бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* и обработке растворами 10⁻¹¹М ИУК и 10⁻⁹М БАП. Через 24 ч прослеживали за перемещением помеченного участка, вырезали его для биохимических исследований, а для апикальной части корня, прилегающего к помеченному участку корня, получали цитологические показатели, характеризующие особенности ростовых процессов под влиянием экзогенных фитогормонов (ФГ). Часть инокулированных и подвергнутых действию ФГ проростков оставляли для контроля нодуляции. Действие экзогенных ФГ приводило к усилению роста корня и смещению, по сравнению с контролем (инокулированные корни без обработки ФГ), восприимчивой к ризобиям зоны, и к небольшому увеличению ее длины. Смещение происходило за счет усиления растяжения вновь перешедших к этому процессу клеток (ИУК) и усиления деления клеток меристемы (БАП). Нодуляция в зоне наблюдений осуществлялась и даже усиливалась под влиянием БАП, но ингибировалась при действии ИУК. Представленные биохимические показатели позволяют предположить, что проявления защитных реакций в исследуемой зоне корня существенно выше в варианте с ИУК, что может служить объяснением негативного влияния экзогенной ИУК на нодуляцию.

Ключевые слова: *Pisum sativum*, корень, нодуляция, экзогенные ИУК и БАП, пероксидазы, фенольные соединения, салициловая кислота

DOI: 10.31857/S0015330322010110

ВВЕДЕНИЕ

При формировании бобово-ризобияльного симбиоза (БРС) после инокуляции бактериями *Rhizobium* развитие процессов нодуляции корней занимает некоторое время и проходит в несколько этапов. На самом раннем этапе формирования БРС на поверхности и на корневых волосках в восприимчивой к ризобиям зоне корня наблюдается адгезия бактерий. Затем появляются искривления кор-

невых волосков, и посредством возникших в них инфекционных нитей начинается проникновение ризобий в корневую кортекс. Практически в этот же период в корнях бобовых растений замечены первые деления клеток в области коры, приводящие к образованию примордий клубеньков [1–4].

В инициации и регуляции клубенькообразования важную роль отводят фитогормонам [5–7]. Началу митотических процессов в корневой коре при формировании клубеньковых примордиев способствует появление локальных скоплений ИУК и ЦК. Литературные данные свидетельствуют не только об участии ауксинов и цитокининов в процессах

Сокращения: ПО – пероксидаза, ИУКО – оксидаза ИУК, ФС – фенольные соединения, СК – салициловая кислота, БРС – бобово-ризобияльный симбиоз, ДФПГ – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил.

формирования БРС, но и о необходимости активации цитокининового сигналинга для индукции морфогенеза клубенька [7].

К компонентам растительных клеток, которые наиболее значимы в регуляции уровня фитогормонов в точках формирования примордий клубеньков, относят флавоноиды [2, 5, 8]. Кратковременное накопление флавоноидов индуцируется в корнях бобовых растений под влиянием ризобияльных Nod-факторов. Авторы работы [1] уже через 3 ч после инокуляции в клетках внутренней коры в сайте инфицирования констатировали синтез ферментов флавоноидного пути, а через 13 ч — увеличение уровня флавоноидов в вакуолях клеток внутренней коры. Такие явления наблюдали при инокуляции совместимыми видами ризобий в клетках, имеющих отношение к инициации образования клубеньков у люцерны, гороха и сиратро (*Macroptilium atropurpureum*).

Обнаружено локально-дифференцированное накопление различных по структуре групп флавоноидов, отличающихся ролью в ингибировании транспорта ИУК, в деградации этого фитогормона и в инициации деления клеток в начале процесса клубенькового органогенеза [1, 2, 9]. Было замечено, что у бобовых культур, вступающих в симбиоз с видами ризобий, у которых синтез Nod-факторов вызывают флавоны, наличие данных соединений в тканях корней требуется и для нормального прохождения процесса нодуляции [9].

Полагают, что к негативной регуляции полярного транспорта ауксинов в основном причастны флавонолы — кверцетин и кемпферол [10]. В обзоре [11] высказано мнение о неодинаковой роли представителей различных по структуре групп флавоноидов в ингибировании потока ИУК и его значения для инициации нодуляции у растений, формирующих недетерминантные и детерминантные клубеньки. У растений, формирующих недетерминантные клубеньки, важна роль флавоноидов в нодуляции, а у сои (*Glycine max* (L.) Merr.), формирующей детерминантные клубеньки, в ингибировании потока ИУК и в инициации образования клубеньков более значимы изофлавоноиды [12].

Изменения в фитогормональном балансе могут быть инициированы окислительными процессами. В частности, уровень и метаболизм ИУК взаимосвязаны с таким полифункциональным “стрессовым” ферментом как пероксидаза (ПО). Этот фермент не только окисляет ИУК (ОИУК), но, как полагают, имеет центр специфического связывания с последней [13].

В публикации Mathesius [2] приведена схема, где показано, что в зоне инфицирования после инокуляции ризобиями все изменения в аккумуляции и локализации ИУК происходят при участии флавоноидов и пероксидаз. Автор полагал,

что сохранению локальной аккумуляции ИУК в точках инициации примордий клубеньков может способствовать аккумуляция формонетина, ингибирующего пероксидазы. А такое соединение, как 7,4'-дигидроксифлавоны, напротив, может стимулировать деградацию ИУК пероксидазой.

Уже в начале инфекционных процессов растение препятствует проникновению избытка ризобий в клетки корневого кортекса и в корневые волоски, сдерживает их агрессивность путем включения защитных механизмов [5, 14]. Включая защитные механизмы, растение регулирует степень инфицирования корней и нодуляции. Усиление окислительных процессов связали с необходимостью для экспрессии у бобовых растений генов ранних нодулинов, например, пероксидазного гена *rip1* [15]. Cook с соавт. [16] показали, что после инокуляции люцерны бактериями *R. meliloti* уровень транскриптов *rip1* был максимальным через 3 ч и падал через 48 ч, что совпадало с ранними инфекционными событиями и началом нодуляционного процесса.

Рядом исследователей салициловая кислота (СК) отнесена к фитогормонам, участвующим в негативной регуляции клубенькообразования [6, 17]. Blilou с соавторами [18] у растения гороха выявили прямую связь между устойчивостью к *Rhizobium* и эндомикоризальным грибом *Glomus mosseae* и высоким накоплением в корневых клетках свободной СК. Используя в своих исследованиях устойчивый к *Rhizobium* и *Glomus mosseae* мутант гороха P2 (Nod⁻ Muc⁻), эти авторы пришли к заключению, что в супрессию защитных реакций, зависимых от СК, может вовлекаться ген *sym30*.

В естественных условиях роста бобовых растений на их корни наряду с ризобиями воздействуют многочисленные почвенные микроорганизмы. Известно, что многие из поселяющихся в ризосфере представителей бактерий и грибов выделяют фитогормоны. В том числе и бактерии рода *Rhizobium*, нодулирующие корни бобовых культур [19].

В обзоре [19] приведены данные, показывающие, что влияние экзогенной ИУК на нодуляцию может быть негативным при ее повышенных концентрациях. Вместе с тем, приведенные там же данные свидетельствуют о положительном влиянии на нодуляцию проникающих в формирующиеся клубеньки ризобий с повышенной способностью к биосинтезу ИУК. Это говорит о том, что роль ИУК, экзогенно поступающего в корневые клетки и синтезируемого ризобиями в процессе внедрения их в ткани корня и формирующихся клубеньков, может быть различной в плане его влияния на метаболизм клеток корня в зоне инфицирования.

Целью наших исследований стало выяснение влияния экзогенных фитогормонов (10^{-11} М ИУК и 10^{-9} М БАП) на метаболические процессы, свя-

Таблица 1. Цитологические параметры роста в апикальном участке корня, граничащим с ранее помеченной зоной, расположенной на расстоянии 5–20 мм от его кончика, через 24 ч после инокуляции *R. leguminosarum* bv. *viciae* и действия экзогенных фитогормонов

Параметры	Инокуляция (контроль)	Инокуляция + БАП	Инокуляция + ИУК
Число клеток меристемы (M_2), $\times 10^3$	115.3 ± 5.0^a	122.3 ± 6.0^a	94.4 ± 4.0^b
Число растягивающихся клеток (B_2), $\times 10^3$	51.4 ± 2.3^a	52.8 ± 2.8^a	45.6 ± 1.7^b
Число клеток в зоне прироста (С), $\times 10^3$ *	87.7 ± 3.6^a	91.2 ± 3.4^a	96.6 ± 4.0^b
Сумма числа клеток, $\times 10^3$, ($M_2 + B_2 + C$)	254.4 ± 12.4^a	266.3 ± 13.8^a	236.6 ± 9.8^a
Доля клеток в меристеме, перешедших к растяжению, $[(C + B_2 - B_1)/(M_2 + B_2 + C - B_1)] \times 100\%$	46%	46%	52%

Примечание: в корнях исходных проростков $M_1 = 90.0 \pm 4.1$; $B_1 = 40.2 \pm 1.3$ клеток.

* Количество клеток в фазе растяжения, образовавшихся за 24 ч. При сравнении данных для контроля и вариантов с обработкой БАП и ИУК разные латинские буквы обозначают статистически значимые различия при $P < 0.05$.

занные с защитными реакциями в восприимчивом к *Rhizobium* участке корня проростка гороха (*Pisum sativum* L.) на этапе преинфекции (через 24 ч после инокуляции), и на образование клубеньков.

О характере проявлений защитных реакций судили по активности растворимых и связанных с клеточными стенками форм ПО и ИУКО, содержанию “растворимых” и “нерастворимых” фенольных соединений, свободной салициловой кислоты и антиоксидантной активности “растворимых” фенольных соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В работе использовали этилированные проростки гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Аксайский усатый 3, выращенные в темноте при температурах 21°C в кюветах, на фильтровальной бумаге, смоченной прокипяченной водопроводной водой. Исходным материалом служили 2 сут проростки, выращенные в тех же условиях. Средние размеры корней исходных проростков составляли около 30–35 мм, по окончании экспозиции (24 ч) – 45–50 мм. При проведении экспериментов исходные проростки помещали на фильтровальную бумагу, которую смачивали растворами 10^{-11} М ИУК или 10^{-9} М БАП (6-бензил-аминопурин) и на корни проростков наносили по 1 мл (титр 10^6 кл./мл) инокулята – бактерии *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (штамм RCAM 1022, был получен из государственного научного учреждения Всероссийский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии). Эти концентрации фитогормонов выбраны в результате предварительных экспериментов с широким спектром концентраций ИУК и БАП. Критерием выбора концентрации служило положительное влияние на рост корня, а в случае с БАП, также и стимуляция образования клубеньков. Инокулированные ризобиями контрольные

растения росли на воде. Инокуляцию проводили, используя водный смыв бактерий с твердого агаросодержащего субстрата.

Для цитологических характеристик роста корня в отрезках на расстоянии 0–5 мм корней исходного материала, и в отрезках 0–5 мм + прирост корня за 24 ч корней вариантов эксперимента определяли число меристематических клеток (M_1 – исходное, M_2 – через 24 ч), растягивающихся (B_1 – исходное, B_2 – через 24 ч) и закончивших рост за 24 ч (С) клеток. Через 24 ч экспозиции общее число клеток и долю клеток в меристеме, перешедших к растяжению, рассчитывали по данным и формулам, приведенным в таблице 1.

Локализацию в корнях через 24 ч экспозиции восприимчивого к ризобиям участка корня установили по перемещению меток, нанесенных на корни исходных проростков на расстоянии 5–20 мм от их кончиков. Через 24 ч экспозиции данный участок корня соответствовал зоне адгезии и начала появления и роста корневых волосков [20]. Для биохимических исследований во всех вариантах выращивания через 24 ч экспозиции из корней брали усредненные по длине, 20 – миллиметровые фрагменты, апикальный конец которых находился на расстоянии 10 мм от кончика корня.

Для получения ростовых показателей на корнях исходных проростков наносили метки на расстоянии 5–20 мм от кончика корня, соответствующей зоне адгезии и начала появления и роста корневых волосков [20], и через 24 ч экспозиции прослеживали перемещение меток и изменения размеров корней. Для наблюдаемого участка получали биохимические показатели в начале экспозиции и через 24 ч. Для биохимических исследований во всех вариантах выращивания через 24 ч экспозиции из корней брали 20 – миллиметровые

фрагменты, расположенные на одинаковом удалении от кончика корня — на расстоянии 10 мм.

Контролирование клубенькообразования по появлению примордий клубеньков проводили через каждые 5–6 дней в течение 21 сут после инокуляции и помещения исходных проростков на среды с растворами фитогормонов, либо на воду (контроль). Рост данных проростков происходил при естественном освещении в кюветах, на фильтровальной бумаге, смоченной водой, или растворами фитогормонов. Корни проростков при этом были затемнены. Инокуляция производилась однократно, в начале эксперимента. Растворы в кюветах периодически заменяли (1 раз в 7 дней). Участки корней, помеченные несмываемой тушью в начале эксперимента на расстоянии 5–20 мм от кончика корня, которые уже через 24 ч достигали конечных размеров в длину, через указанные выше промежутки времени вырезали. Затем вручную с помощью бритвы делали продольные срезы этого участка, окрашивали их 1% витальным красителем крезоловым голубым по методике, описанной ранее в работе [20], и после окрашивания корневых клеток в голубой и голубовато-зеленый цвет срезы просматривали под микроскопом, для выявления примордий клубеньков. Кроме помеченных участков наличие примордий клубеньков проверяли и в местах образования бугорков на поверхности корней.

Определение активности пероксидазы. Выделение разных форм пероксидазы — растворимой, ионно- и ковалентно-связанной с клеточными стенками и определение их активности осуществляли по ранее использованным методикам [21]. Соответственно этим методам, после гомогенизации растительного материала с фосфатным буфером (рН 6.2) центрифугированием отделяли супернатант, содержащий растворимые формы пероксидаз. Затем из промытого раствором 2% Тритона X-100 нерастворимого осадка высвобождали последовательно с помощью 1 М NaCl ионно-связанные, и, после обработки смесью 0.25% растворов пектиназы и целлюлазы (соотношение 1 : 1) — ковалентно-связанные формы пероксидаз. На каждом этапе экстракции центрифугировали по 15 мин при 5000 g и при 4°C. Для выявления оксидазной (прооксидантной) функции фермента использовали субстрат — ИУК, пероксидазной (антиоксидантной) — орто-дианизидин. Активность ПО (усл. ед/г сырой массы) определяли по начальной скорости окисления о-дианизидина перекисью водорода в 0.1 М натрий-фосфатном буфере, рН 7.0. ИУКО (мкг/мин г сырой массы) — по убыли ИУК в реакционной смеси. Показатели активности фермента выражали в % от контроля.

Получение экстрактов фенольных соединений. Фенольные соединения из фиксированного 96% этанолом и затем гомогенизированного расти-

тельного материала выделяли, подразделяя на 2 группы: “растворимые” и “нерастворимые”. ФС первой группы экстрагировали 80% этанолом, а после его удаления, с помощью роторного испарителя, из водного остатка, подкисленного 2 н HCl до рН 3–4, их экстрагировали этилацетатом. Высвобождение ФС второй группы из нерастворимых в этаноле остатков тканей осуществляли путем проведения гидролиза 2 н HCl в течение 1 ч на кипящей водяной бане. Экстракцию высвобожденных ФС проводили также при помощи этилацетата. Этилацетатные экстракты упаривали в условиях затемнения в вакууме досуха и остаток растворяли в небольшом объеме 95% этанола для определения в них содержания ФС.

Определение содержания фенольных соединений. Содержание фенольных соединений определяли с реактивом Фолина-Дениса по оптической плотности, измеряемой при 720 нм, по стандартной методике [22]. Количество фенольных соединений рассчитывали по калибровочному графику, построенному для кемпферола, и выражали в мкг/г сырой массы отрезка корня.

Определение содержания салициловой кислоты. Содержание салициловой кислоты определяли в экстрактах, содержащих “растворимые” ФС методом ВЭЖХ на хроматографе “Shimadzu LC-10ATvp” с УФ-детектором (“Shimadzu”, Япония). Разделение осуществляли на колонке (250 × 4.6 мм, 5 мкм) Perfect (“MZ Analysentechnik”, Германия), в возрастающем градиенте А : В от 30 до 90% в течение 90 мин при скорости 0.5 мл/мин. А — ацетонитрил, В — 0.2 н перхлорат Li в 0.1% водном растворе трифторуксусной кислоты, рН 4.0. Напуск (объем пробы) 5 мкл. Детектирование соединений проводили при 280 нм. Идентифицировали соединение в адсорбционных профилях по времени удерживания метчика, которое подтверждали УФ-спектрами, полученными в остановленном потоке элюента для метчика и для изучаемого вещества. Для идентификации и получения применявшегося для расчетов калибровочного графика использовали аутентичный образец салициловой кислоты (“Реахим”, Россия).

Определение антирадикальной активности фенолсодержащих экстрактов. Активность в ингибировании свободнорадикальных реакций фенолсодержащих экстрактов определяли с использованием 1,1-дифенил-2-пикрилгидразида (ДФПГ, “Sigma-Aldrich”, США). В соответствии со схемой анализа, изложенной в работе [23], пробная смесь для анализа состояла из 0.2 мл экстракта, содержащего 40 мкг фенольных соединений, 2.0 мл 0.1 мМ раствора ДФПГ, 0.8 мл 40% этанола. В качестве “пустой пробы”, была смесь, содержащая 2.0 мл 0.1 мМ раствора ДФПГ + 1.0 мл 40% этанола. Смеси инкубировали в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре и измеряли оптичес-

Таблица 2. Влияние 10^{-9} М БАП и 10^{-11} М ИУК на размеры корней, смещение меток (исходные метки 5–20 мм) на корнях проростков гороха через 24 ч после инокуляции их *R. leguminosarum* bv. *viciae*

Вариант	Расстояние до метки в апикальном конце зоны, мм	Длина зоны, мм	Длина корня, мм
Инокуляция	11.5 ± 0.5^a	15.1 ± 0.8^a	43.6 ± 2.2^a
Инокуляция + БАП	12.4 ± 0.7^a	15.3 ± 0.5^a	45.5 ± 2.3^a
Инокуляция + ИУК	13.6 ± 0.8^b	15.6 ± 0.6^a	49.0 ± 4.0^a

Примечание: при сравнении данных для контроля и вариантов с обработкой БАП и ИУК разные латинские буквы обозначают статистически значимые различия при $P < 0.05$.

скую плотность при 517 нм на спектрофотометре Specord S-100 (“Karl Zeiss”, Германия) против смеси из 0.2 мл экстракта и 2.8 мл 40% этанола, служившей в качестве контрольного образца. Концентрация вносимых в реакционную смесь фенольных соединений была оптимизирована по калибровочному графику для катехина. Концентрацию фенольных соединений в экстрактах предварительно устанавливали по реакции с реактивом Фолина–Дениса [22].

Антиоксидантную активность для веществ, внесенных в указанные выше среды, рассчитывали по формуле:

$$\text{ингибирование (\%)} = (A_B - A_A) / A_B \times 100\%,$$

где A_A – абсорбция определяемого экстракта через 15 мин инкубации;

A_B – абсорбция пустой пробы (без экстракта).

Статистическая обработка результатов. Для статистической обработки полученных результатов использовали Microsoft Excell. На рисунках и в таблицах приведены средние значения и стандартные отклонения для них, которые получены из трех независимых экспериментов. Значимость различий между средними значениями определяли, используя t -критерий Стьюдента при уровне $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экзогенные фитогормоны ИУК и БАП по разному влияли на число меристематических и растягивающихся клеток в 5 мм отрезках корней проростков гороха, инокулированных бактериями *Rhizobium*. Наибольшее увеличение количества клеток наблюдалось в варианте с БАП, тогда как пророст отрезка был больше при действии ИУК (табл. 1). Действие ИУК в том же отрезке корня снижало количество делящихся клеток, но увеличивало долю общего числа клеток, переходящих к растяжению.

За время экспозиции действие экзогенных фитогормонов не вызывало существенных изменений в размере зоны наблюдения – ранее поме-

ченного у корней исходных проростков участка 5–20 мм, поскольку клетки здесь завершили свое растяжение (табл. 2). За 24 ч экспозиции в трех вариантах выращивания эта зона, вследствие неодинакового роста в длину апикального участка корня удалась от его кончика на разное расстояние. По сравнению с растениями контроля, под влиянием фитогормонов обнаруживается удлинение данного участка (табл. 2). Более заметное его удлинение происходило при действии ИУК, менее выражено оно было при действии БАП. Причина этих различий, очевидно, обусловлена особенностями характера ростовых процессов, происшедших в растущей апикальной части корня под влиянием ИУК и БАП. При действии ИУК усиливались процессы растяжения клеток, а под влиянием БАП – происходило увеличение количества меристематических клеток (табл. 1).

В период окончания экспозиции – через 24 ч после инокуляции и от начала действия экзогенных фитогормонов, для участка корня, послужившего объектом для наших биохимических исследований, типичны явления раннего этапа формирования БРС, связанного с началом инфицирования корня. Ранее в этой зоне выявили адгезию ризобий на поверхности эпидермы и корневых волосков, морфологические изменения (искривления) в зоне корневых волосков, появление в них инфекционных нитей, удостоверявших о начале проникновения бактерий в корни [4, 20].

Исследуемые нами биохимические показатели являются свидетельством характера проявлений защитных реакций в клетках восприимчивой к ризобиям корневой зоны, испытывавших одновременное воздействие экзогенных фитогормонов и ризобий. Так, для растворимых и связанных с клеточными стенками форм пероксидаз, показано влияние экзогенных фитогормонов на их антиоксидантную (ПО) и прооксидантную (ИУКО) активности (табл. 3). Сравнивая с растениями контроля изменения в активности ПО/ИУКО при действии экзогенных ИУК и БАП, в исследуемом участке корней обнаружили разную направленность в проявлении свойств фермента. Действие БАП снижало прооксидантные свойства

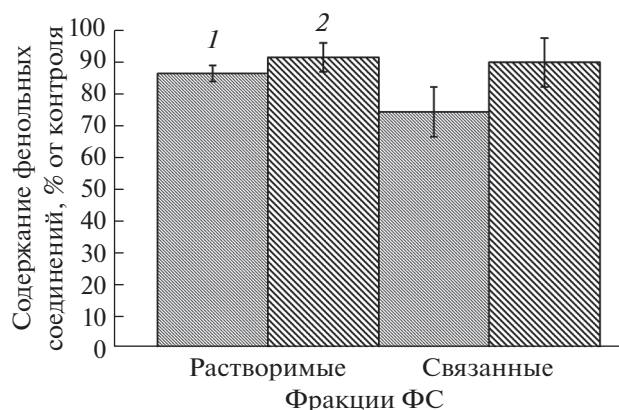


Рис. 1. Влияние экзогенных фитогормонов (10^{-9} М БАП и 10^{-11} М ИУК) на содержание растворимых и связанных с клеточными структурами фенольных соединений в восприимчивом к ризобиям участке корней, через 24 ч после инокуляции этими бактериями. Контроль – рост проростков на среде без фитогормонов. 1 – БАП, 2 – ИУК.

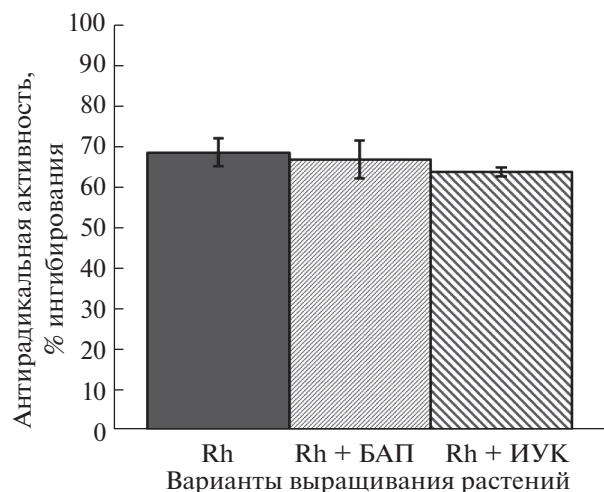


Рис. 2. Антирадикальная активность экстрактов подробно “растворимых” фенольных соединений, выделенных из восприимчивого к ризобиям участка корня через 24 ч после инокуляции этими бактериями. % ингибирования по отношению к контролю (контроль – реакционная среда с ДФПГ без фенольных соединений). Rh – рост инокулированных ризобиями проростков на среде без фитогормонов; Rh + БАП – рост инокулированных ризобиями проростков в присутствии БАП; Rh + ИУК – рост инокулированных ризобиями проростков в присутствии ИУК.

фермента, что наиболее выражено в растворимой и в ковалентно связанной фракциях фермента. Антиоксидантная активность фермента при действии БАП возросла существенно только во фракции ковалентно-связанной с клеточными стенками. Действие ИУК имело более существенный положительный эффект на прооксидантную активность пероксидаз (ИУКО). Это наиболее проявлялось во фракциях ионно- и ковалентно связанных с клеточными стенками. Сравнивая с эффектом действия БАП, можно отметить, что под влиянием ИУК активность пероксидаз прооксидантной направленности у изученных форм пероксидаз оказалась выше в 1.3 и 2.7 раза, а у растворимой пероксидазы – в 1.9 раза. При этом и антиоксидантные свойства фермента возросли в растворимой и, особенно, во фракции, ковалентно связанной с клеточными стенками.

Важное значение в метаболизме растительных клеток принадлежит ФС. Известна их роль в качестве коферментов, регуляторов антиоксидантно-прооксидантного баланса, компонентов клеточных стенок и других клеточных структур. Наиболее мобильной и активной группой среди

присутствующих в растительных клетках ФС является группа “растворимых” ФС повышенной липофильности, которую экстрагируют при помощи таких растворителей, как органические эфиры [24]. Данные рисунка 1 позволяют заметить, что под влиянием ИУК содержание этого типа “растворимых” ФС в исследуемом участке корня достоверно снижалось, по сравнению с растениями контроля. Действие же БАП приводило к небольшому, но более выраженному, чем при действии ИУК, снижению их количества. Показатели антиоксидантной активности, полученные для данной фракции ФС, в варианте роста проростков с БАП практически не отличались от показателей для растений контроля (рис. 2). Действие же экзогенной ИУК привело к достаточно заметной потере антиоксидантной активности обсуждаемой группы ФС.

Таблица 3. Активность ПО и ИУКО в корнях проростков гороха, произраставших 24 ч после инокуляции *R. leguminosarum* bv. *viciae* в присутствии БАП и ИУК (% к контролю)

Вариант	Растворимая		Ионно-связанная		Ковалентно-связанная	
	ИУКО	ПО	ИУКО	ПО	ИУКО	ПО
+БАП	58.1 ± 1.7 ^a	111.0 ± 6.5 ^a	104.8 ± 4.4 ^a	75.2 ± 2.6 ^a	75.0 ± 3.0 ^a	166.8 ± 6.7 ^a
+ИУК	113.0 ± 4.0 ^b	125.2 ± 5.9 ^b	131.0 ± 6.0 ^b	104.1 ± 4.1 ^b	200.0 ± 8.7 ^b	177.4 ± 7.4 ^a

Примечание: контроль – рост инокулированных проростков без ФГ. При сравнении данных варианта “+БАП” с данными варианта “+ИУК” разные латинские буквы обозначают статистически значимые различия при $P < 0.05$.

Выделенные нами ФС “нерастворимой” фракции могут иметь значение в укреплении растительных клеточных стенок. При воздействии экзогенной БАП происходило достаточно заметное уменьшение их количества, а при воздействии ИУК оно почти не изменялось (рис. 1).

К гормонам негативного действия на нодуляцию относят салициловую кислоту (СК). В исследуемой зоне корней, на которую воздействовали экзогенные фитогормоны, было определено содержание этой кислоты в составе “растворимых” ФС и проведены наблюдения за прохождением в ней нодуляции. При действии экзогенных фитогормонов количество СК возросло, но неодинаково: БАП вызвало повышение ее уровня в 1.7 раза, а действие ИУК – в 2.4 раза (рис. 3). Данные таблицы 4 позволяют заметить, что БАП не только не ингибировал образование клубеньков, но даже способствовал некоторому увеличению их числа в исследуемом участке корня. Действие ИУК на корни полностью ингибировало клубенькообразование в данной зоне, где через 24 ч после инокуляции оказалось самое высокое, по сравнению с растениями контроля и произраставшими на среде с БАП, содержание СК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Добавление экзогенного ЦК (10^{-9} М БАП) нарушает формирование ауксинового градиента [25], меняет баланс ЦК : ИУК в корнях гороха в сторону большего содержания ЦК, что индуцирует деление клеток внутренней коры корня. При добавлении 10^{-11} М ИУК, очевидно, происходит обратная картина: баланс ЦК : ИУК смещается в сторону ИУК. Это, с одной стороны, должно интенсифицировать процесс дедифференцировки клеток внутренней коры, то есть подготавливать их к делению. С другой стороны, вероятно, избыток ИУК должен тормозить само деление, поскольку оно контролируется ЦК [5–7], относительное содержание которого в тканях корня в данном случае падает.

Таблица 4. Результаты микроскопических наблюдений влияния экзогенных 10^{-9} М БАП и 10^{-11} М ИУК на образование примордий клубеньков в помеченном участке корня у инокулированных *R. leguminosarum* bv. *viceae* проростков гороха

Вариант выращивания	Длительность роста проростков после инокуляции, сут.	Максимальное число примордий на 1 растение
Инокуляция	13	1
	17	1
Инокуляция + БАП	13	1
	17	3
Инокуляция + ИУК	13	Не обнаружены
	17	Не обнаружены

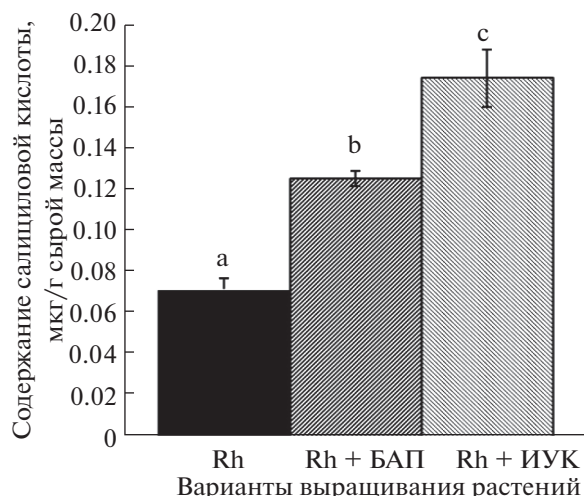


Рис. 3. Содержание салициловой кислоты в восприимчивом к *Rhizobium* участке корней проростков гороха, инокулированных этими бактериями, после 24 ч воздействия на них 10^{-9} М БАП и 10^{-11} М ИУК. Rh – рост инокулированных ризобиями проростков на среде без фитогормонов; Rh + БАП – рост инокулированных ризобиями проростков в присутствии БАП; Rh + ИУК – рост инокулированных ризобиями проростков в присутствии ИУК. Разные латинские буквы обозначают статистически значимые различия при $P < 0.05$.

В наших экспериментах при действии экзогенной БАП в цитоплазме и в клеточной стенке происходило уменьшение форм пероксидаз прооксидантной направленности (ИУКО), а преобладали формы антиоксидантной направленности (ПО). При действии экзогенной ИУК возрастали активности обоих типов пероксидаз. В сравнении с вариантом с БАП, в исследуемом участке корней, испытывавших действие экзогенной ИУК, активность пероксидаз прооксидантной направленности была заметно выше. По-видимому, под влиянием экзогенной ИУК в клетках растений начинал действовать защитный механизм, предохраняющий их от сверхвысоких концентраций ИУК, чем в нашем эксперименте может быть обу-

словлено повышение активности ПО (ИУКО) в растворимой фракции и во фракциях, связанных с клеточными стенками.

Одной из основных систем регуляции уровня ИУК является система ее ферментативного окисления пероксидазой (ИУКО), регулятором которой, являются и ФС. Данные соединения в зависимости от их структуры способны по-разному воздействовать на окислительные свойства ПО [2]. Известна и способность ПО окислять ряд фенолов [26]. Предполагается, что при одновременном присутствии ИУК и фенолов, в первую очередь окисляются фенолы и лишь затем ИУК [13].

Фракция “растворимых” фенольных соединений, полученная в результате экстракции этилацетатом (см. раздел “Материалы и методы”), представляет собой весьма сложный комплекс компонентов, характеризующихся повышенной липофильностью и биологической активностью [24]. Среди этих соединений обнаружены флавоноиды, фенольные кислоты и ряд других ароматических компонентов различной структуры [24, 27, 28]. Действие экзогенных ЦК и ИУК неодинаково сказалось на общем содержании “растворимых” ФС, и на антиоксидантных свойствах экстрактов, содержащих эту группу ФС. Действие ЦК, вызвав небольшое снижение их содержания, не привело к изменению у них антиоксидантных свойств. Напротив, действие ИУК, не повлияв на содержание “растворимых” ФС, привело к понижению их антиоксидантных свойств. Вероятно, данное снижение антиоксидантных свойств у комплекса “растворимых” ФС может отчасти способствовать усилению окисления ИУК, поступающего в корни из внешней среды.

Связанные с клеточными стенками ФС могут иметь значение в укреплении этих клеточных структур, способствовать уменьшению возможности для проникновения в клетки бактерий. В связывании данной группы ФС с клеточными стенками могут принимать участие ПО и полифенолоксидазы [26]. Из двух изученных фитогормонов эффект на количество ФС, образующих связи с клеточными стенками, имел только ЦК. Небольшое снижение количества ФС, образующих связи с компонентами клеточных стенок, которое обнаружено под влиянием БАП, возможно, связано с дедифференцировкой клеток в связи с образованием примордий клубеньков [4]. Под влиянием этого фитогормона выявлено снижение количества обсуждаемой группы ФС. Примечательно, что тенденция изменения в количестве “нерастворимых” ФС положительно коррелировала только с тенденцией изменения активности ионно-связанных с клеточными стенками ПО (табл. 3, рис. 1). Это указывает на вероятность участия пероксидаз данной фракции в связыва-

нии с клеточными стенками выделенной нами группы “нерастворимых” ФС.

В наибольшей степени изучена в процессах нодуляции регуляторная роль флавоноидов. Наряду с этим, многими исследователями изучена и показана негативная роль в нодуляции салициловой кислоты (СК), которая является компонентом выделяющейся из корней гороха при помощи этилацетата фракции “растворимых” ФС [28]. Мы констатировали существенные изменения в содержании СК в зоне наблюдения корней, испытывавших действие экзогенных фитогормонов.

СК относят к сигнальным молекулам, участвующим в активации защитных механизмов у растений при патогенезе [29]. СК с участием пероксидазы может способствовать продуцированию супероксида и перекиси водорода [30]. По данным авторов работы [30] СК с участием пероксидазы индуцировала продуцирование супероксида и перекиси водорода в клетках суспензионной культуры табака (*Nicotiana tabacum*). Согласно этим данным, отмеченное в восприимчивом к ризобиям участке корня неодинаковое повышение уровня СК, вызванное экзогенными БАП и ИУК должно способствовать соответствующему усилению защитных реакций в зоне, где после инокуляции должны происходить продвижения инфекционных нитей и процессы формирования клубеньков.

Замечено, что ингибирование нодуляции с участием СК высокой концентрации характерно для растений, формирующих клубеньки неопределенного типа, к которым относятся и растения гороха [17]. Как следует из полученных нами данных, в корнях, произраставших на растворе БАП, повышение содержания СК в 1.7 раза, по сравнению с контролем, не сказалось на клубенькообразовании. Рост же проростков на растворе ИУК, вызвавшем более существенное увеличение уровня СК (в 2.4 раза больше, чем в контроле) привел к полному блокированию образования клубеньков. То есть, соотношение ЦК : ИУК, необходимое для правильного развития симбиоза и формирования примордий клубеньков, при повышении концентрации ИУК, вероятно, может достигаться более сложным механизмом, не только ПО – ИУКО системой окисления, но и находится в прямой зависимости от фенольного метаболизма (содержания и состава ФС).

Таким образом, выявлены ответные реакции корней гороха на постоянное действие экзогенных ЦК и ИУК при инфицировании *R. leguminosarum* bv. *viciae*, проявившиеся различиями ростовых процессов в апикальной части корня, в метаболизме исследуемого восприимчивого к ризобиям отрезка корня и в клубенькообразовании. Показано, что действие экзогенных фитогормонов привело к усилению роста корня и смещению, по сравнению с контролем, зоны наблюдений, и к

небольшому увеличению ее длины. Указанное смещение под влиянием ИУК происходило за счет усиления растяжения вновь перешедших к этому процессу клеток, а под влияние БАП – за счет усиления деления клеток меристемы.

Показано, что в восприимчивой к ризобиям зоне корня, на которую вместе с бактериями одновременно начинали воздействовать экзогенные фитогормоны, процесс нодуляции зависел от вида фитогормона. Клубенькообразование в этой зоне осуществлялось и даже усиливалось под влиянием БАП, но ингибировалось при действии ИУК. Вероятная причина столь разного влияния ЦК и ИУК на нодуляцию связана с различными тенденциями изменений окислительных процессов с участием пероксидаз и фенольных соединений, участвующих в окислении ИУК. Экзогенная БАП существенно снижала активность ИУКО в цитоплазме и в клеточной стенке во фракции ковалентно-связанных ферментов, практически не изменяя активность ионно-связанных ИУКО. Усиление окислительных процессов в исследуемом участке корня, очевидно, вызывал избыток ИУК. На это показали существенные усиления в активности пероксидаз прооксидантной направленности (ИУКО), особенно во фракциях клеточных стенок, изменения в фенольном обмене, такие, как снижение антиоксидантной активности “растворимых” ФС и значительное повышение содержания в их составе СК. Повышение активности пероксидаз антиоксидантной направленности (ПО) в цитоплазме и во фракции ковалентно-связанных с клеточными стенками и возрастание концентрации в клетках обоих вариантов СК, может приводить к увеличению уровня АФК при их совместном взаимодействии [30]. Представленные данные позволяют предположить, что проявления защитных реакций в указанных выше компартаментах клеток в исследуемой зоне корня существенно выше в варианте с ИУК, что может служить объяснением негативного влияния экзогенной ИУК на нодуляцию.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования (ЦКП) “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского Отделения Российской академии наук (Иркутск, Россия). Работа выполнена в рамках проекта Государственного задания № АААА-А17-117011810099-8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mathesius U., Bayliss C., Weinman J.J., Schlaman H.R.M., Spaink H.P., Rolfe B.G., VcCully M.E., Djordjevic M.A.* Flavonoids Synthesized in Cortical Cells During Nodule

- Initiation Are Early Developmental Markers in White Clover // *MPMI*. 1998. V. 11. P. 1223. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.12.1223>
2. *Mathesius U.* Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase // *J. Exp. Bot.* 2001. V. 52. P. 419.
3. *Цыганова А.В., Китаева А.Б., Бревин Н.Дж., Цыганов В.Е.* Клеточные механизмы развития симбиотических клубеньков у бобовых растений // *С.-х. биол.* 2011. № 3. С. 34.
4. *Акимова Г.П., Соколова М.Г.* Содержание цитокининов на начальных этапах бобово-ризобияльного симбиоза и влияние гипотермии // *Физиология растений*. 2012. Т. 59. С. 694.
5. *Ferguson B.J., Mathesius U.* Signaling Interactions During Nodule Development // *J. Plant Growth Regul.* 2003. V. 22. P. 47. <https://doi.org/10.1007/s00344-003-0032-9>
6. *Oldroyd G.E., Downie J.A.* Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008. V. 59. P. 519. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>
7. *Miri M., Janakirama P., Held M., Ross L., Szczyglowski K.* Into the Root: How Cytokinin Controls Rhizobia Infection // *Trends Plant Sci.* 2016. V. 21. P. 178. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.09.003>
8. *Murphy A., Peer W.A., Taiz L.* Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids // *Planta*. 2000. V. 211. P. 315.
9. *Zhang J., Subramanian S., Stacey G., Yu O.* Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti* // *Plant J.* 2009. V. 57. P. 171. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03676.x>
10. *Brown D.E., Rashotte A.M., Murphy A.S., Normanly J., Tague B.W., Peer W.A., Taiz L., Muday G.K.* Flavonoids Act as Negative Regulators of Auxin Transport in Vivo in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2001. V.126. P. 524. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.524>
11. *Subramanian S., Stacey G., Yu O.* Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation // *TRENDS Plant Sci.* 2007. V. 12. P. 282.
12. *Subramanian S., Stacey G., Yu O.* Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum* // *Plant J.* 2006. V. 48. P. 261. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02874.x>
13. *Рогожин В.В., Верхотуров В.В., Рогожина Т.В.* Пероксидаза: строение и механизм действия. Иркутск: Изд-во ИрГТУ, 2004. 200 с.
14. *Vasse J., Billi F., Truchet G.* Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction // *Plant J.* 1993. V. 4. P. 555.
15. *Ramu S.K., Peng H.M., Cook D.K.* Nod Factor Induction of Reactive Oxygen Species Production Is Correlated with Expression of the Early Nodulin Gene *rip1* in *Medicago truncatula* // *MPMI*. 2002. V. 15. P. 522. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.6.522>

16. Cook D., Dreyer D., Bonnet D., Howell M., Nony E., Van den Bosh K. Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago trunculata* precedes infection by *Rhizobium meliloti* // Plant Cell. 1995. V. 7. P. 43.
17. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Негативная гормональная регуляция развития симбиотических клубеньков. II. Салициловая, жасмоновая и абсцизовая кислоты // С.-х. биол. 2018. Т. 53. С. 3. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.1.3rus>
18. Blilou I., Ocampo J.A., Garcia-Garrido J.M. Resistance of pea roots to endomycorrhizal fungus or *Rhizobium* correlates with enhanced levels of endogenous salicylic acid // J. Exp. Bot. 1999. V. 50. P. 1663.
19. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling // FEMS Microbiol. Rev. 2007. V. 31. P. 425. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
20. Макарова Л.Е., Нурминский Н.В. Влияние температуры на локализацию “свободных” фенольных соединений в тканях корней и деформацию корневых волосков у инокулированных *Rhizobium* проростков гороха // Цитология. 2005. Т. 47. С. 519.
21. Акимова Г.П., Верхотуров В.В., Соколова М.Г., Белопухов С.Л. Модуляция про/антиоксидантной активности пероксидазы в корнях проростков гороха, инокулированных *Rhizobium* и *Azotobacter* // Известия ТСХА. 2019. Вып. 1. С. 138.
22. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.: Высшая школа, 1974. 214 с.
23. Озолина Н.В., Макарова Л.Е., Возненко А.Н., Колесникова Е.В., Дударева Л.В. Антиоксидантные свойства фенолсодержащих экстрактов из вакуолярного сока столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) после кислотного гидролиза // Химия растительного сырья. 2014. № 3. С. 175. <https://doi.org/10.14258/jcprm.1403175>
24. Макарова Л.Е., Лузова Г.Б., Ломоватская Л.А. Роль эндогенных фенольных соединений в инфицировании *Rhizobium leguminosarum* корней гороха при низкой температуре // Физиология растений. 1998. Т. 45. С. 824.
25. Додуева И.Е., Ганчева М.С., Осипова М.А., Творогова В.Е., Лутова Л.А. Латеральные меристемы высших растений: фитогормональный и генетический контроль // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 611. <https://doi.org/10.7868/S0015330314050066>
26. Pourcel L., Routaboul J.-M., Cheynier V., Lepiniec L., Debeaujon I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions // Trends Plant Sci. 2007. V. 12. P. 29. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.006>
27. Рудиковская Е.Г., Федорова Г.А., Дударева Л.В., Макарова Л.Е., Рудиковский А.В. Влияние температуры выращивания на состав фенольных соединений в корнях гороха // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 793.
28. Макарова Л.Е., Дударева Л.В., Соколова Н.А., Путилина Т.Е. Изучение влияния инокуляции *Rhizobium* на состав свободных фенольных кислот в корнях этилированных проростков гороха // Химия растительного сырья. 2016. № 1. С. 53. <https://doi.org/10.14258/jcprm.201601877>
29. Shirasu R., Nakajima H., Rajasekhar V.K., Dixon R.A., Lamb C. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms // Plant Cell. 1997. V. 9. P. 261.
30. Kawano T., Muto S. Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture // J. Exp. Bot. 2000. V. 5. P. 685.