

УДК 581.1:633.358:577.13

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МУТУАЛИСТА И ФИТОПАТОГЕНА НА ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ α АМФ И H_2O_2 В ПРОРОСТКАХ ГОРОХА СОРТА РОНДО И ЕГО БЕСКЛУБЕНЬКОВОГО И СУПЕРКЛУБЕНЬКОВОГО МУТАНТОВ

© 2023 г. Л. А. Ломоватская¹ *, О. В. Захарова¹, А. М. Гончарова¹, А. С. Романенко¹

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Иркутского научного центра СО РАН, Иркутск, 664033 Россия

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

Поступила в редакцию 16.02.2022 г.

После доработки 07.09.2022 г.

Принята к публикации 12.09.2022 г.

Исследованы изменения концентраций пероксида водорода и циклического аденозинмонофосфата (α АМФ) в корнях проростков гороха сорта Рондо и его суперклубенькового мутанта Nod3 и бесклубенькового K14 при инфицировании *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (штамм RCAM 1022) или *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (штамм 1845). Показано, что через 360 мин после инфицирования проростков гороха сорта Рондо уровень эндогенного пероксида водорода незначительно отличался от контроля. В корнях проростков Nod3 этот уровень существенно снижался, а в корнях K14 достоверно возрастал при инфицировании штаммом 1845, но оставался без изменений при воздействии бактерий штамма RCAM 1022. В тоже время инфицирование RCAM 1022 в течение 360 мин приводило к резкому возрастанию уровня α АМФ в зонах зачатков и молодых волосков корня проростков Рондо, тогда как штамм 1845 не оказывал влияния на этот показатель. На концентрацию α АМФ в корнях проростков мутанта Nod3 оба вида бактерий не оказывали воздействия, тогда как у K14 под воздействием RCAM 1022 уровень α АМФ возрастал почти в 2 раза, а под воздействием 1845 – снижался. Предполагается, что пероксид водорода и α АМФ могут принимать участие в формировании суперклубенькового и бесклубенькового фенотипов мутантов, а также в формировании устойчивости к специфическому патогену, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. Возможно, что данный феномен можно использовать для диагностики устойчивости вновь создаваемых мутантов и сортов гороха к возбудителю бактериального ожога.

Ключевые слова: суперклубеньковый мутант гороха Nod3, бесклубеньковый мутант гороха K14, горох сорта Рондо, H_2O_2 , α АМФ, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*

DOI: 10.31857/S0555109923020113, **EDN:** LLWBKA

Фиксация атмосферного азота растениями семейства *Fabaceae* осуществляется в тесном контакте с бактериальными микрочастичками родов *Rhizobium*, *Sinorhizobium* и *Bradyrhizobium*. Известно, что процесс азотфиксации находится под генетическим контролем растения-хозяина, определяя число формирующихся клубеньков, их размеры и морфологию [1]. В связи с этим существенное значение имеет изменение концентраций сигнальных молекул в клетках растения-хозяина на ранних этапах ризобийной инфекции, поскольку вторичные мессенджеры через сигнальные каскады участвуют в регуляции экспрессии специфических генов. С этим связано кратковременное повышение концентраций активных форм кислорода и азота [2, 3], а также Ca^{2+} [4]. С этой точки зрения хорошим объектом для исследова-

ний являются мутанты гороха, различающиеся по образованию клубеньков. Однако мутации могут вызвать изменение чувствительности к бактериальным патогенам. Поскольку в реализации механизмов устойчивости/восприимчивости принимают участие сигнальные системы растения, в частности вторичный мессенджер аденилатциклической сигнальной системы, циклический аденозинмонофосфат (α АМФ) [5, 6], их функционирование в мутантных растениях гороха является весьма важным показателем.

Цель данной работы – исследование изменений концентраций H_2O_2 и α АМФ в зонах роста корня проростков гороха (*Pisum sativum*) сорта Рондо и мутантов, полученных из этого сорта, суперклубенькового (Nod3) и бесклубенькового (K14), при инфицировании *Rhizobium leguminosarum* bv.

viciae (штамм RCAM 1022) или *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (штамм 1845).

МЕТОДИКА

Объектами исследования служили 3-суточные проростки гороха (*Pisum sativum*) сорта Рондо и суперклубенькового (Nod3) и бесклубенькового (K14) мутантов этого сорта, а также планктонные культуры *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, эффективный по азотфиксации штамм RCAM 1022, полученный из Вedomственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Всероссийского научно-исследовательского института сельского хозяйства (ВНИИСХМ); *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (штамм 1845), полученный из Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии.

Культивирование бактерий. Бактериальные культуры выращивали в колбах на жидкой среде, содержащей просветленный гороховый отвар, 15 г/л глюкозы, рН 7.0. Титр планктонной культуры бактерий определяли на планшетном спектрофотометре “АИФР-01 Униплан” (“ЗАО Пикон”, Россия) при длине волны 655 нм.

Проращивание семян гороха. Семена гороха последовательно стерилизовали и промывали 5 мин в 94%-ном этаноле, 5 мин в 5%-ном растворе перманганата калия и 5 мин в 3%-ном перексиде водорода. На конечном этапе отмывали стерильной водой и замачивали при 60°C на 4 ч. Семена проращивали в стерильных чашках Петри на увлажненной фильтровальной бумаге в течение 3 сут в темноте при 23–25°C. Проростки промывали стерильным 0.01%-ным раствором нонидета (неионный детергент) для удаления экзогенной микрофлоры. Отмывали трижды стерильной дистиллированной водой и инокулировали одним из видов бактерий, находящихся на стационарной фазе роста.

Титр планктонной культуры бактерий составлял 0.1×10^8 . Инокуляцию проводили в течение 5 или 360 мин, после чего корни проростков отделяли от горошины, промывали в стерильном 0.01%-ном растворе нонидета для удаления слабосвязанных бактерий, а затем промывали трижды в стерильной воде.

Особенностью бобовых является то, что не весь корень проростков обладает восприимчивостью к ризобиям, а только его отдельные участки, отличающиеся по степени сформированности корневых волосков, то есть присутствию на них зачатков, молодых или зрелых корневых волосков. В настоящей работе на основании литературных данных [7] и собственных исследований с помощью световой микроскопии первичный корень длиной 35–40 мм делили на пять участков, отличающихся по степени сформированности волосков: I –

апикальная меристема (2 мм от кончика); 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 сформированных корневых волосков (17–22 мм от кончика корня), и отдельно эпикотиль – VI зона [8].

Определение интенсивности адгезии бактерий. После инкубации с бактериями корни проростков нарезали на отрезки в соответствии с указанными зонами и каждый образец растирали в стерильной воде, после чего делали рассеянный посев на чашки Петри с агаризованной питательной средой, аналогичной по составу жидкой среде для культивирования каждого вида бактерий. Через 3 сут подсчитывали колониеобразующие единицы (КОЕ), отражающие количество бактерий, адгезирующихся в каждой зоне корня. В экспериментах использовали по 10 проростков.

Определение концентраций H_2O_2 и цАМФ. Уровень эндогенного H_2O_2 определял FOX-методом, основанным на изменении окраски ксиленолового оранжевого [9]. Концентрацию цАМФ в отрезках корня гороха определяли методом ИФА [8]. Концентрации эндогенных H_2O_2 и цАМФ выражали в мкмоль/мг белка или нмоль/мг соответственно. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда, для построения калибровочного графика использовали БСА. Все эксперименты проводили в 3-кратных биологических повторностях, определение уровня цАМФ и H_2O_2 – в 8-кратных аналитических повторностях. На графиках результаты представлены в процентах к контролю, которым служили неинфицированные растения.

Результаты экспериментов обработаны статистически с помощью программы SigmaPlot 12.3. На графиках представлены средние значения и ошибки среднего (SE). Достоверность различий между группами значений вычисляли по критерию Дункана при $P \leq 0.05$. Достоверность различий определялась между значениями для сорта Рондо и каждого из мутантов. Достоверно различающиеся значения на графиках отмечены звездочками.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие растений с любыми типами микроорганизмов начинается с адгезии [10]. Эксперименты показали, что как через 5 мин, так и через 360 мин наиболее интенсивная адгезия бактерий происходила в зонах зрелых и старых корневых волосков, и была более высокой у ризобий RCAM 1022 (рис. 1). При этом самый высокий уровень адгезии бактерий этого вида сохранялся на корнях проростков мутантов Nod3 и K14, но не на корнях проростков исходного сорта Рондо. Интенсивность адгезии штамма 1845 также существенно различалась у проростков сорта и мутан-

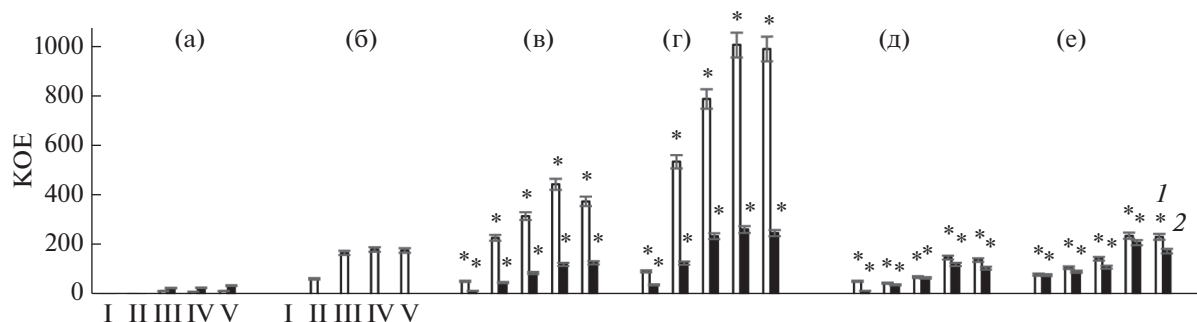


Рис. 1. Интенсивность адгезии *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae* (1) и *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (2) на корнях проростков гороха (зоны I–V) сорта Рондо (а, б) и его мутантов – Nod3(в, г) и K14 (д, е) через 5 (а, в, д) и 360 (б, г, е) мин после инокуляции. *Различия статистически значимы при сравнении сорта Рондо (контроль) с мутантами Nod3 или K14 по критерию Дункана, $n = 3$, $m \pm S.E.$; $P \leq 0.05$.

тов. Через 5 мин коинкубации адгезия этого вида бактерий на корнях проростков гороха сорта Рондо была незначительной, тогда как у проростков Nod3 превышала ее в 6–8 раз, а на корнях K14 была – в 2–3 раза. Через 360 мин адгезия на всех участках корня проростков Рондо уже отсутствовала полностью, тогда как на корнях Nod3 еще усилилась, а у K14 осталась примерно на уровне, зафиксированном через 5 мин коинкубации (рис. 1).

Тесный контакт с бактериями вызывает в растениях активацию сигнальных систем [11].

Следует отметить, что исходные концентрации эндогенного пероксида водорода и цАМФ в корнях и эпикотиле проростков гороха значительно различались у сорта Рондо и его мутантов, Nod3 и K14 (табл. 1, 2). Причем, если концентрация эндогенного пероксида водорода в органах проростков Nod3 превышала уровень в проростках Рондо в 3–5 раз, то в проростках K14 всего в 2.0–2.5 раза (табл. 1). В тоже время уровень эндогенного цАМФ как в проростках Nod3, так и K14 превышал аналогичный параметр в проростках Рондо в 20–25 раз (табл. 2).

Коинкубация проростков с обоими видами бактерий приводила к изменению концентраций эндогенных пероксида водорода и цАМФ. У про-

ростков Рондо через 5 мин взаимодействия с ризобиями в наибольшей степени уровень пероксида водорода возрастал в зонах II и III, снижаясь при этом немного ниже контроля в эпикотиле (рис. 2). Под воздействием штамма 1845 концентрация этой сигнальной молекулы увеличивалась по сравнению с контролем почти в одинаковой степени во всех зонах корня, но в меньшей степени, чем при воздействии штамма RCAM 1022.

Через 360 мин коинкубации с RCAM 1022 уровень пероксида водорода опускался ниже контроля в зонах зачатков и молодых корневых волосков (зоны II и III), оставаясь почти на уровне 100% в остальных участках корня и эпикотиле. Под воздействием штамма 1845 концентрация H_2O_2 сохранялась на уровне 120% во всех участках корня и эпикотиле. У проростков гороха Nod3 через 5 и 360 мин коинкубации с обоими видами бактерий происходило достоверное снижение уровня H_2O_2 от 50 до 70% от контроля во всех зонах, тогда как в эпикотиле этот показатель был близок к 100% (рис. 2). В корнях проростков K14 через 5 мин инфицирования теми же видами бактерий уровень H_2O_2 достоверно снижался, но в меньшей степени, оставаясь на уровне 100% в некоторых зонах (IV и V) и эпикотиле (рис. 2). Через 360 мин под

Таблица 1. Концентрация эндогенного H_2O_2 в зонах роста проростков гороха и эпикотиле, мкмоль/мг белка

Сорт или мутант	Зоны роста корня					Эпикотиль
	меристема, I	зачатков корневых волосков, II	молодых корневых волосков, III	зрелых корневых волосков, IV	старых корневых волосков, V	
Рондо	13.4 ± 1.1	11.4 ± 10.1	12.7 ± 11.8	14.4 ± 12.9	15.7 ± 13.9	26.3 ± 2.5
Nod3	77.3* ± 7.0	81.7* ± 7.9	80.9* ± 7.9	76.3* ± 7.3	78.9* ± 7.6	90.2* ± 8.7
K14	27.1* ± 2.6	28.3* ± 2.5	29.5* ± 2.6	27.0* ± 2.6	28* ± 2.7	38* ± 3.5

* Различия статистически значимы при сравнении сорта “Рондо” (контроль) с мутантами Nod3 или K14 по критерию Дункана, $n = 3$, $m \pm S.E.$; $P \leq 0.05$.

Таблица 2. Концентрация эндогенного цАМФ в зонах роста проростков гороха и эпикотиле, наномоль/мг белка

Сорт или мутант	Зоны роста корня					Эпикотиль
	меристема, I	зачатков корневых волосков, II	молодых корневых волосков, III	зрелых корневых волосков, IV	старых корневых волосков, V	
Рондо	4.9 ± 0.3	3.9 ± 0.2	3.6 ± 0.3	3.4 ± 0.3	3.5 ± 0.3	3.4 ± 0.3
Nod3	90* ± 8.2	88* ± 8.1	72* ± 7.0	88* ± 8.2	80* ± 7.8	102* ± 9.8
K14	102* ± 9.8	106* ± 10.0	97* ± 9.0	94* ± 9.0	89* ± 8.0	98* ± 9.0

* Различия статистически значимы при сравнении сорта “Рондо” (контроль) с мутантами Nod3 или K14 по критерию Дункана, $n = 3$, $m \pm S.E.$; $P \leq 0.05$.

влиянием штамма RCAM 1022 уровень H_2O_2 оставался близким к контролю во всех участках корня и эпикотиле, тогда как штамм 1845 индуцировал достоверное повышение этого показателя во всех зонах корня и эпикотиле (рис. 2).

Инфицирование оказывало также влияние на изменение эндогенной концентрации цАМФ в корнях проростков гороха. Инокуляция ризобиями корня проростков гороха Рондо в течение 5 мин вызывала последовательное незначительное повышение уровня цАМФ в I–V зонах, при этом в эпикотиле этот показатель оставался на уровне контроля. Под воздействием штамма 1845 концентрация цАМФ менялась аналогичным образом (рис. 3). Через 360 мин инфицирование штаммом RCAM 1022 вызывало наиболее значительное повышение уровня цАМФ в зонах зачатков и молодых корневых волосков (II–III зоны), при том, что в IV и V зонах и эпикотиле его концентрация оставалась на уровне контроля.

Штамм 1845 также индуцировал повышение уровня этой сигнальной молекулы, но менее интенсивное, чем штамм RCAM 1022 и почти одинаковое во всех участках корня и эпикотиле

(рис. 3). Инфицирование штаммом RCAM 1022 корня проростков Nod3 в течение 5 мин почти не повлияло на исходный уровень концентрации цАМФ. Через 360 мин этот показатель оставался практически на уровне контроля во всех участках корня. Однако штамм 1845 через 5 мин приводил к достоверному снижению уровня цАМФ во всех участках корня, в тоже время через 360 мин уровень цАМФ приближался к контролю. Инфицирование обоими видами бактерий корней проростков мутанта K14 в течение 5 мин практически не влияло на изменение уровня цАМФ в участках корня. Однако через 360 мин под воздействием штамма RCAM 1022 его значение возрастало практически в 2 раза почти во всех участках корня (рис. 3). Напротив, коинкубация со штаммом 1845 приводила к достоверному снижению уровня цАМФ в тех же участках корня.

В природе микроорганизмы способны к адгезии и созданию биопленок на любых поверхностях. По современным представлениям адгезия ризобий на корнях бобовых носит неспецифический характер и не зависит от их симбиотических свойств [12]. С этим трудно согласиться, поскольку

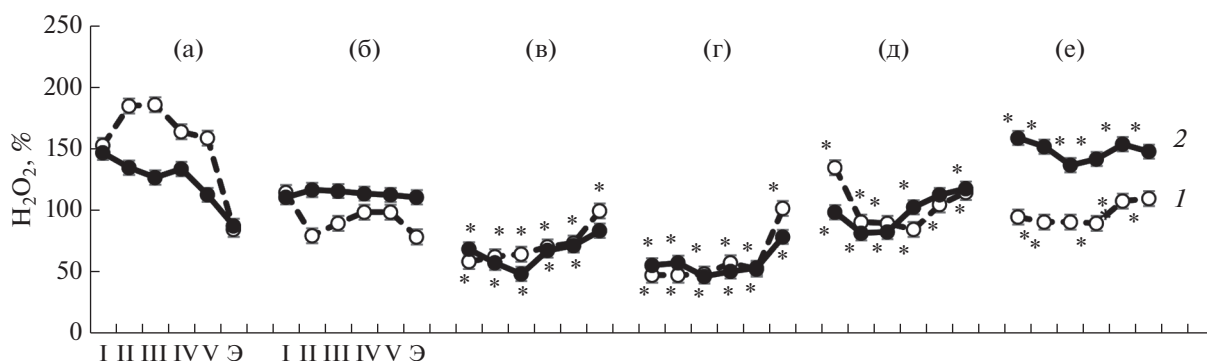


Рис. 2. Влияние инфицирования *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* (1) или *Pseudomonas syringae* *pv. pisi* (2) на концентрацию эндогенного пероксида водорода в участках корня (I–V, Э–эпикотиль) проростков гороха сорта Рондо (а, б) и его мутантов Nod3(в, г) и K14 (д, е) через 5 (а, в, д) и 360 (б, г, е) мин после инокуляции. * Различия статистически значимы при сравнении Рондо (контроль) с мутантами Nod3 или K14 по критерию Дункана, $n = 3$, $m \pm S.E.$; $P \leq 0.05$. ** Контроль – значения H_2O_2 из проростков, инкубированных на воде.

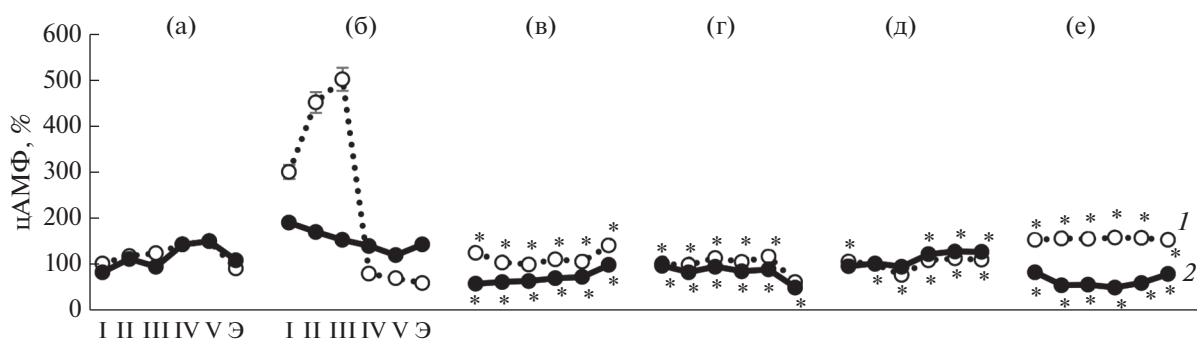


Рис. 3. Влияние инфицирования *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* (1) или *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (2) на концентрацию эндогенного цАМФ в участках корня (I–V, Э-эпикотиль) проростков гороха сорта Рондо (а, б) и его мутантов Nod3(в, г) и K14 (д, е) через 5 (а, в, д) и 360 (б, г, е) мин после инокуляции. * Различия статистически значимы при сравнении варианта “Рондо” в качестве контроля с вариантом “Nod3” или вариантом “K14” по критерию Дункана, $n = 3$, $m \pm S.E.$; $P \leq 0.05$. ** При расчете эндогенных концентраций цАМФ контролем служила концентрация эндогенного цАМФ из проростков, инокулированных на воде.

ранее нами было показано, что штаммы ризобий, не эффективные по азотфиксации, но высококонкурентные, демонстрировали существенно более низкую адгезию на корнях проростков сорта Рондо [13]. Вероятно адгезия на ранней стадии инфицирования носит неспецифический характер, но переходит в специфическую стадию на этапе узнавания партнеров. В процессе адгезии со стороны бактерий могут принимать участие экзополисахариды, фимбрии IV и V типов, различные адгезины и флагеллины [14]. Такие детерминанты, необходимые на начальном этапе адгезии, представляют собой факторы вирулентности, и присутствуют практически у всех видов грамотрицательных бактерий, независимо от специализации [15, 16]. По-видимому, усиление адгезии ризобий через 360 мин коинкубации свидетельствует о переходе к специфической, необратимой стадии этого процесса, в которой принимают участие как некоторые структуры и метаболиты растений, так и экзометаболиты бактерий. Считается, что одними из основополагающих компонентов, определяющих специфичность азотфиксирующего симбиоза, являются Nod-факторы, представляющие собой липохитоолигосахариды, не только видо-, но и штаммоспецифичные [17]. В тоже время в этом процессе активное участие принимают лектины растений. Показано, что ген лектина гороха, внедренного в белый клевер, обеспечивал хорошую адгезию *Rhizobium leguminosarum* на его корнях, хотя этот вид микросимбионтов в природе никогда не инфицирует клевер [18]. Кроме того, сверхэкспрессия лектиновой части лектиноподобной рецепторной протеинкиназы бобовых может приводить к суперклебеньковому фенотипу [19]. Несмотря на то, что в работе не проводились соответствующие исследования, опираясь на литературные данные [18, 19], можно предположить, что разница в интенсивности адгезии ризобий на корнях проростков гороха сорта

Рондо и мутантов Nod3 и K14 в определенной степени связана с качественным составом выделяемых ими лектинов. Подтверждением этому может служить и то, что интенсивность адгезии штамма 1845 была близкой у обоих мутантов, а у проростков Рондо отсутствовала полностью через 360 мин, что свидетельствует о неспецифичности этого процесса для данного вида бактерий.

Тесный контакт корней проростков гороха с бактериями сопровождался существенными перестройками в сигналинге клеток растения. Несмотря на то, что генерация АФК в растениях индуцируется как симбиотическими азотфиксаторами, так и патогенами [20, 21], назначение, а также продолжительность подъема и амплитуда концентраций этих сигнальных молекул различны при воздействии различных видов микроорганизмов [22]. По литературным данным, на начальных этапах взаимодействия гороха с мутуалистическими бактериями наблюдался единичный пик генерации АФК, в том числе H_2O_2 , более сильный и продолжительный, чем при инфицировании патогенами [23]. Такой эффект наблюдался в экспериментах на проростках сорта Рондо при инокуляции штаммами RCAM 1022 или 1845 в течение 5 мин. По литературным данным на ранних этапах взаимодействия ризобии проявляют свойства патогенов, подавляя растительный иммунитет с помощью своих факторов вирулентности [23]. При бактериальных патогенезах пероксид водорода в растениях выполняет защитные функции и нарастание его концентрации происходит в две фазы, разделенные во времени [24]. Интересно, что у обоих мутантов изменение уровня пероксида водорода по зонам корня после кратковременного воздействия как ризобий, так и патогена было практически одинаковым и принципиально отличалось от такового в проростках сорта Рондо. Таким образом, уже на самых ранних этапах взаимодействия

как с мутуалистами, так и с патогенами очевидны перестройки в сигнальных системах мутантов гороха. Эти отличия более ярко проявлялись через 360 мин взаимодействия, когда этот процесс переходил в специфическую стадию, сопровождающуюся взаимным узнаванием партнеров. По литературным данным понижение уровня пероксида водорода в зонах адгезии и проникновения ризобий (зоны зачатков и молодых корневых волосков, II–III зоны) должно способствовать повышенной колонизации и вторжению ризобий в эти участки корня [25], что и происходит в проростках гороха сорта Рондо. В этом случае пероксид водорода, наряду с сигнальной ролью, выполняет функции антибактериального агента, распределяя инфекционную нагрузку по зонам корня. Штамм 1845, несмотря на отсутствие адгезии к 360 мин на корнях проростков сорта Рондо, был способен индуцировать незначительную окислительную вспышку за счет секретируемых токсинов, в частности, сириномицина. Этот экзометаболит способен влиять на работу кальциевых ионных каналов в мембране растительных клеток [26], что может привести к модуляции работы про- и антиоксидантных ферментов, тем самым влияя на уровень эндогенного пероксида водорода в тканях проростков гороха.

Однако у мутантов Nod3 и K14 динамика концентрации эндогенного H_2O_2 в зонах корня принципиально отличается не только от Рондо, но и между собой. Можно предположить, что существенное снижение уровня H_2O_2 во всех зонах корня проростков мутанта Nod3 через 360 мин коинкубации со штаммом RCAM 1022 является одной из причин суперклубенькового фенотипа. Однако такое же понижение уровня H_2O_2 под воздействием штамма 1845, вероятно, указывает на снижение локального неспецифического иммунитета в тканях корня. Это подтверждается уровнем данной сигнальной молекулы в эпикотиле, где он был близок к контролю. Это свидетельствует об отсутствии системной активации неспецифических защитных реакций в проростках мутанта Nod3. Напротив, у мутанта K14 под воздействием ризобий концентрация H_2O_2 на всем протяжении эксперимента сохранялась практически на уровне контроля, что также не типично для бобово-ризобиального симбиоза [20]. В тоже время под воздействием штамма 1845 наблюдалось существенное возрастание концентрации H_2O_2 , которое затрагивало все зоны корня и эпикотиль. Учитывая, что интенсивность адгезии этого патогена по зонам корня не одинакова, можно предположить, что при этом развивается системная реакция, причиной которой могут быть PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern), включающие флагеллярные и другие структурные белки патогена, а также его токсины (сириготоксин, коронатин, сири-

голин и др.), секретируемые в среду инкубации [27] и достигающие необходимой концентрации только к 360 мин.

Динамика концентрации цАМФ при инфицировании корней проростков гороха сорта Рондо и обоих мутантов принципиально отличалась от динамики эндогенного пероксида водорода (рис. 2, 3). Опираясь на литературные данные [28] и, сравнивая динамику данного вторичного мессенджера в проростках Рондо и мутантов, можно предположить, что эндогенный цАМФ участвует в регуляции эффективности симбиоза на начальных этапах взаимодействия. На этапе кратковременного взаимодействия (5 мин), вероятно это обусловлено PAMPs, характерными для обоих видов бактерий [15, 16]. Для распознавания PAMPs растения используют различные рецепторные молекулы, в том числе лектины, выполняющие функции рецепторов, а также комплексы рецепторных киназ на клеточной поверхности. Это усиливает защитную реакцию хозяина, хотя эффект, по-видимому, ослабляется при мутуалистическом симбиозе, поскольку Nod-факторы способны подавлять защитные ответы посредством прямого или косвенного взаимодействия с киназой рецептора лектина (LecRK) [12].

Обращает на себя внимание очень высокий уровень цАМФ в зонах зачатков и молодых корневых волосков проростков сорта Рондо через 360 мин после инокуляции штаммом RCAM 1022, и, напротив, отсутствие реакции аденилатциклазной сигнальной системы в зонах роста корня мутанта Nod3. По литературным данным у суперклубенькового мутанта бобов уровень цАМФ в корнях при инфицировании *Bradyrhizobium japonicum* оставался на уровне контроля в течение нескольких дней, в то время как искусственное повышение его концентрации негативно сказывалось на образовании клубеньков [28]. Учитывая, что у бесклубенькового мутанта этот показатель лишь на 40–60% превышал контроль, можно сделать предположение, что при интерпретации результатов следует учитывать интенсивность изменения уровня цАМФ и стадию инфекционного процесса. На этапе 360 мин происходит переход адгезии в специфическую стадию и начинается проникновение ризобий, сопровождающееся индукцией *sym*-генов растений [18]. Известно, что активация тех или иных генов зависит от концентрации вторичных мессенджеров, передающих сигналы на специфические факторы транскрипции [29]. Кроме того, ранее было показано, что при значительном повышении эндогенного уровня цАМФ существенно снижается концентрация эндогенного пероксида водорода в корнях проростков гороха сорта Рондо [5]. Такая обратная зависимость, хорошо прослеживаемая на корнях проростков сортового гороха, имеет не очень четко выраженный характер в корнях проростков его мутантов, что, воз-

можно, является одной из причин супер- или безклубеньковости. Это представляется вполне возможным, поскольку признак супернодуляции находится под контролем корня [30], и наиболее выраженные изменения в концентрациях цАМФ также наблюдаются в этом органе.

Если при ризобиальной инфекции изменение уровня эндогенного цАМФ в корне проростков гороха направлено на формирование мутуалистических отношений, то под воздействием патогена может быть показателем устойчивости к *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. Литературные данные свидетельствуют о том, что изменение уровня цАМФ в растениях при инфицировании специфическими патогенами указывает на степень их устойчивости [31]. Можно предположить, что горох сорта Рондо наиболее устойчив к *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, поскольку уровень цАМФ во всех участках корня и эпикотиле существенно превышал показания в контроле, в отличие от мутантов.

Таким образом, мутации, направленные на регуляцию количества клубеньков у Nod3 и K14, оказывали влияние как на внутриклеточный сигналинг, существенно увеличивая концентрации эндогенных H₂O₂ и цАМФ, так и на иммунный ответ растений при взаимодействии с патогенами. У проростков этих мутантов гороха менялась интенсивность адгезии ризобий и фитопатогенных бактерий, а модуляция уровней эндогенных пероксида водорода и цАМФ скорее всего свидетельствовала об изменении устойчивости этих растений к специфическому патогену *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. Возможно, что данный феномен в дальнейшем можно использовать для диагностики устойчивости вновь создаваемых мутантов и сортов гороха к возбудителю бактериального ожога, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Власова Е.Ю., Сидорова К.К., Глянченко М.Н., Мищенко Т.М. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012. Т. 16. № 4/2. С. 879–886.
2. Nanda A.K., Andrio E., Marino D., Pauly N., Dunand C. // J. Integrative Plant Biology. 2010. V. 52. № 2. P. 195–204.
3. Torres M.A. // Physiologia Plantarum. 2010. V. 138. № 4. P. 414–429.
4. Ma W., Qi Z., Smigel A., Walker R.K., Verma R., Gerald A. Berkowitz G.A. // PNAS. 2009. V. 106. № 49. P. 20995–21000.
5. Ломоватская Л.А., Кузакова О.В., Гончарова А.М., Романенко А.С. // Физиология растений. 2020. Т. 67. № 3. С. 270–277. <https://doi.org/10.1134/S0015330320020104>
6. Suzuki N., Katano K. // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 490. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00490>
7. Макарова Л.Е., Нурминский В.Н. // Цитология. 2005. Т. 47. № 6. С. 519–525.
8. Ломоватская Л.А., Кузакова О.В., Романенко А.С., Гончарова А.М. // Физиология растений. 2018. Т. 65. № 4. С. 310–320.
9. Galletti R., Denoux C., Gambetta S., Dewdney J., F.M. De Lorenzo A., Ferrari S. // Plant. Physiol. 2008. V. 148. P. 1695–1706.
10. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М. М.: Изд-во МГУ, 2005. 445 с.
11. Bleau J.R., Spoel S.H. // Plant Physiol. 2021. V. 186. P. 53–65.
12. Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tsyganov V.E. // Cells. 2021. V. 10. № 1050. P. 1–32.
13. Кузакова О.В., Ломоватская Л.А., Гончарова А.М., Романенко А.С. // Физиология растений. 2019. Т. 66. № 5. С. 360–366.
14. Bhuvaneshwari T.V., Turgeon B.G., Bauer W.D. // Plant Physiol. 1980. V. 66. № 6. P. 1027–1031.
15. Серегина Н.В., Честнова Т.В., Жеребцова В.А., Хромушин В.А. // Вестник новых медицинских технологий. 2008. № 4. С. 75–77.
16. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132. № 2. С. 211–222.
17. Вершинина З.П., Лавина А.М., Чубукова О.В. // Биомика. 2020. Т. 12. № 1. С. 27–49. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2020-3>
18. Жуков В.А., Рычагова Т.С., Штарк О.Ю., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. // Экологическая генетика. 2008. Т. 6. № 4. С. 12–19.
19. Бабоша А.В. // Журн. общей биологии. 2008. Т. 69. № 5. С. 379–396.
20. Peleg-Grossman S., Melamed-Book N., Levine A. // Plant Signaling & Behavior. 2012. V. 7. № 3. P. 409–415.
21. Hawkins J.P., Oresnik I.J. // Front. Plant Sci. 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.796045>
22. Bleau J.R., Spoel S.H. // Plant Physiol. 2021. V. 186. P. 53–65. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab088>
23. Gourion B., Berrabah F., Ratet P., Stacey G. // Trends in Plant Sci. 2015. V. 20. № 3. P. 186–194.
24. Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Minibayeva F. // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. № 372. P. 1367–1376.
25. Ca'rdenas L., Mart'nez A., Sa'nchez F., Quinto K. // Plant J. 2008. V. 56. P. 802–813. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03644.x>
26. Takemoto J.Y., Zhang L., Taguchi N., Tachikawa T., Miyakawa T. // Microbiology. 1991. V. 137. № 3. P. 653–659.
27. Ichinose Y., Taguchi F., Mukaihara T. // J. Gen. Plant Pathol. 2013. № 79. P. 285–296.
28. Terakado J., Fujihara S., Yoneyama T. // Soil Sci. & Plant Nutr. 2003. V. 49. № 3. P. 459–462.
29. Xu R., Guo Y., Peng S., Liu J., Li P., Jia W., Zhao J. // Biomolecules. 2021. V. 1. P. 688. doi.org/10.3390
30. Сидорова К.К., Шумный В.К. // Сибирский экологический журн. 1999. № 3. С. 281–288.
31. Sabetta W., Vandelle E., Locato V., Costa A., Cimini S., Moura A.B., Luoni L., Graf A., Viggiano L., De Gara L., Bellin D., Blanco E., de Pinto. M.C. // Plant J. 2019. V. 98. P. 590–606.

Influence of Bacterial Mutualists and Phytopatogenes on Changes in Concentrations of cAMP and H₂O₂ in Pea Seedles of Rondo Varieties and its Clutterless and Superclub Mutants

L. A. Lomovatskaya^{a, *}, O. V. Zakharova^a, A. M. Goncharova^a, and A. S. Romanenko^a

^a *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of RAS, Irkutsk, 664033 Russia*

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

Changes in the concentrations of hydrogen peroxide and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in the roots of seedlings of pea cv. Rondo and its supernodulating mutant Nod3 and anodulating K14 were studied during infection with *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* (strain RCAM 1022) or *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (strain 1845). It was shown that 360 min after infection of pea seedlings of the Rondo variety, the level of endogenous hydrogen peroxide slightly differed from the control. In the roots of Nod3 seedlings, this level significantly decreased, and in the roots of K14 it significantly increased when infected with the 1845 strain, but remained unchanged when exposed to bacteria of the RCAM 1022 strain. and young root hairs of Rondo seedlings, while strain 1845 had no effect on this parameter. Both types of bacteria had no effect on the concentration of cAMP in the roots of seedlings of the Nod3 mutant, whereas in K14, under the influence of RCAM 1022, the cAMP level almost doubled, and under the influence of 1845, it decreased. It is assumed that hydrogen peroxide and cAMP may be involved in the formation of supernodulating and nodulating phenotypes of mutants, as well as in the formation of resistance to a specific pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. It is possible that this phenomenon can be used to diagnose the resistance of newly created mutants and pea varieties to the blight pathogen.

Keywords: supernodulating pea mutant Nod3, anodulating pea mutant K14, pea cv. Rondo, H₂O₂, cAMP, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*