

На правах рукописи



**ГОНЧАРОВА Алена Михайловна**

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

1.5.21. – физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ**

Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Иркутск, 2022

Работа выполнена в Федеральном Государственном бюджетном учреждении науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

**Научный руководитель:**

**Ломоватская Лидия Арнольдовна**  
доктор биологических наук

**Официальные оппоненты:**

**Максимов Игорь Владимирович**  
доктор биологических наук, Институт биохимии и генетики Российской академии наук, г. Уфа, заведующий лабораторией биохимии фитоиммунитета.

**Емельянов Владислав Владимирович**  
кандидат биологических наук, Биологический факультет Санкт-Петербургского государственного университета, доцент кафедры генетики и биотехнологии.

**Ведущая организация:**

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», г. Санкт-Петербург.

Защита диссертации состоится «17» марта 2022 года в 15.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 003.047.01 при Федеральном Государственном бюджетном учреждении науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения Российской академии наук по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317. Факс (3952)510-754, e-mail:

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального Государственного бюджетного учреждения науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения Российской академии наук.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
Д 033.047.01,

кандидат биологических наук

Акимова Галина Петровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Активация сигнальных систем в клетках растений при адгезии бактерий играет ключевую роль на ранних стадиях азотфиксирующего симбиоза или бактериального патогенеза. Известна неодинаковая активность компонентов некоторых сигнальных систем в участках корня гороха, различающихся по степени сформированности волосков и, соответственно, чувствительности к ризобияльной инфекции.

В регуляции начальных этапов бобово-ризобияльного симбиоза (БРС) и бактериального патогенеза у растений наименее всего изучена роль аденилатциклазной сигнальной системы (АСС) и, в частности, ее вторичного мессенджера цАМФ, а также взаимосвязь ее компонентов с пероксидом водорода. Практически нет сведений о содержании цАМФ в участках корня гороха, различающихся по степени сформированности волосков.

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

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие *задачи*:

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

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

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

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

### Научная новизна исследования.

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

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

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

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

#### **Методология и методы исследования**

В работе были использованы следующие методы и подходы: определение интенсивности адгезии бактерий, создание избытка/дефицита концентрации цАМФ в клетках корня проростков гороха, определение активности АЦ и уровня цАМФ в участках корней проростков гороха методом иммуноферментного анализа (ИФА). Определение  $H_2O_2$  FOX-методом. Статистическая обработка данных с помощью программы Sigma-Plot.

#### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

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

#### **Апробация работы**

Материалы диссертационной работы были представлены на VI конференции с международным участием «ЭкоБиоТех 2019» (Уфа, 1-4 октября, 2019 год).

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

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

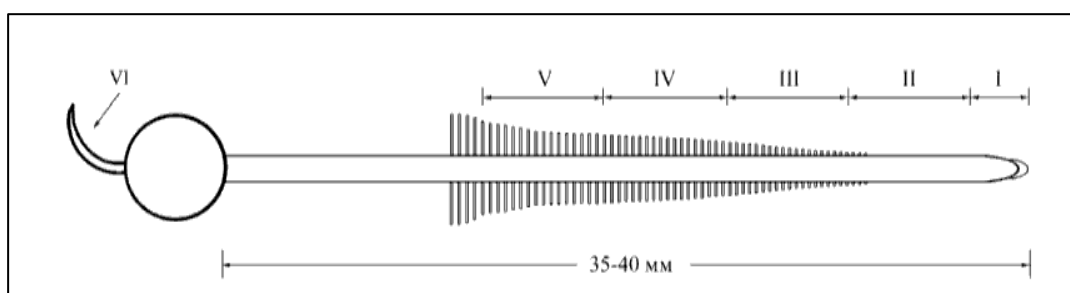
## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Объекты и методы исследования

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

Семена гороха последовательно стерилизовали путем промывания в течение 30 мин в 94% этаноле, 5 мин в 3%  $H_2O_2$  и 5 мин в 5% растворе перманганата калия. На конечном этапе отмывали стерильной водой и замачивали в воде (56°C) на 4 часа. Затем проращивали в стерильных чашках Петри на увлажненной фильтровальной бумаге в течение 3 суток в темноте при 23-25°C. Далее, проростки длиной корня примерно 35-40 мм промывали стерильным 0.01% раствором нонидета (неионный детергент) для предотвращения попадания экзогенной микрофлоры; трижды отмывали стерильной дистиллированной водой и инокулировали одной из культур бактерий, находящихся на стационарной фазе роста. Для этого использовали суспензию бактерий с титром  $10^7$  кл/мл (Кузакова и др., 2019).

Бактериальные культуры выращивали в колбах на жидкой среде, содержащей для *Rlv* и *Psp* просветленный гороховый отвар, для *Cs* – 10 г/л диализата дрожжевого экстракта. Для всех культур добавляли 15 г/л глюкозы, pH 7.0. После окончания инкубации корней проростков с соответствующими видами бактерий корни отделяли от горошины, промывали 5 мин в стерильном 0.01% растворе нонидета (детергента) для удаления слабосвязанных бактерий и промывали трижды в стерильной воде (Кузакова и др., 2019). Затем корень делили на участки: I – меристема – 0-2 мм; II – зона, содержащая зачатки корневых волосков – 2-7 мм; III – зона молодых корневых волосков – 7-12 мм; IV – зона сформированных корневых волосков – 12-17 мм; V – зона старых корневых волосков – 17-22 мм; VI – эпикотиль (см. рис. 1).



**Рисунок 1.** Схема деления проростков гороха на зоны, составленная на основании световой микроскопии и литературных данных (Но, 1994; Макарова, Нурминский, 2005). I – меристема 0-2 мм; II – зона, содержащая зачатки корневых волосков – 2-7 мм; III – зона молодых корневых волосков – 7-12 мм; IV – зона сформированных корневых волосков – 12-17 мм; V – зона старых корневых волосков – 17-22 мм; VI – эпикотиль.

Отрезки растирали в стерильной воде и делали рассеянный посев на чашки Петри с агаризованной средой, аналогичной по составу жидкой среде для культивирования бактерий. Для дополнительного контроля прочности связывания бактерий с корнем делали микробиологические посеы из каждой порции промывной воды. Через 3 суток

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

Для увеличения внутриклеточного уровня цАМФ в корнях проростков гороха их инкубировали 10 мин с *n*-бутирил-цАМФ в концентрациях 5/10/30/50 нМ. После окончания экспозиции проростки промывали водой и, в одном варианте опыта, сразу анализировали на содержание эндогенного  $H_2O_2$  и цАМФ в различных участках корня, а в другом – проростки инкубировали еще 5 мин с одной из культур бактерий и, затем, также определяли уровни  $H_2O_2$  и цАМФ. Влияние *n*-бутирил-цАМФ (опыт) оценивали, сравнивая с соответствующим результатом у проростков, экспонированных на воде (контроль). В варианте «*n*-бутирил-цАМФ + бактерии» (опыт) контролем служил вариант с соответствующей концентрацией *n*-бутирил-цАМФ без бактерий (Ломоватская и др., 2020).

Для уменьшения концентрации внутриклеточного цАМФ проростки гороха на 30 мин помещали в 800 мкМ раствор сурамина, ингибитора трансмембранной аденилатциклазы (Шпаков и др., 2008), приготовленный на 0.3% диметилсульфоксида (для облегчения проникновения). Далее проростки отмывали водой и, в первом случае, сразу использовали для определения концентрации пероксида водорода и цАМФ в отрезках корня, во втором случае 5 мин инкубировали с суспензией одного из видов бактерий, а затем делили на участки и проводили анализ на содержание эндогенного  $H_2O_2$  и цАМФ. Результаты выражали в процентах к контролю. Влияние сурамина (опыт) определяли, сравнивая с соответствующим результатом у проростков, экспонированных на воде (контроль); в варианте «сурамин + бактерии» (опыт) – принимали за контроль вариант «сурамин без бактерий» (Ломоватская и др., 2020).

Активность АЦ и концентрацию цАМФ в корнях проростков определяли методом ИФА (Ломоватская и др., 2018). Расчет активности АЦ проводили в Моль на мг белка/мин.

Для исследования влияния экзогенного  $H_2O_2$  на активность рАЦ и тАЦ на фоне предварительной инокуляции бактериями (*Rlv*, *Psp*, *Cs*) в течение 5 минут использовали целые корни проростков гороха. Контролем служили проростки, экспонированные на питательной среде без бактерий. Гомогенизацию отсеченных корней проводили по стандартной схеме (Ломоватская и др., 2018). К растительным образцам, содержащим рАЦ/тАЦ, добавляли  $H_2O_2$  в конечной концентрации 100 нМ/260 нМ/2.6 мкМ/26 мкМ. Реакцию проводили при 27°C в течение 30 мин, затем останавливали кипячением в течение 3 мин на водяной бане.

Концентрацию эндогенного  $H_2O_2$  определяли в гомогенате отрезков корней проростков гороха FOX-методом, основанном на изменении окраски ксиленолового оранжевого (Galletti et al., 2008). Для анализа использовали 1 г корней проростков гороха. Калибровочную кривую строили по пероксиду водорода (Кузакова и др., 2019). Расчет концентрации пероксида водорода проводили в нМоль на мг белка. Белок в пробе определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

Исследования проводили в 3 биологических повторностях. Определение КОЕ бактерий проводили в 4 аналитических повторностях, определение концентрации цАМФ и  $H_2O_2$ , активности тАЦ и рАЦ – в 8 аналитических повторностях.

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Особенностью бобовых является то, что не весь корень проростков обладает восприимчивостью к ризобиям. Наиболее чувствительными являются зачатки и молодые или зрелые корневые волоски (Но et al., 1994). Исходя из этого, корни гороха длиной 35-40 мм делили на пять участков (рис. 1) и исследовали интенсивность адгезии бактерий. *R. leguminosarum* bv. *viciae* были представлены тремя штаммами: 1022 – эффективный по азотфиксации, 1064 и 1065 – неэффективные по этому показателю и конкурентноспособные по инфицированию (Паспорт бактериальной культуры ВКМ).

Наиболее интенсивная адгезия *Rlv* наблюдалась к 360 минутам взаимодействия и была наиболее интенсивной у эффективного, по сравнению с неэффективными по азотфиксации, штаммами (рис. 2, А, Б).

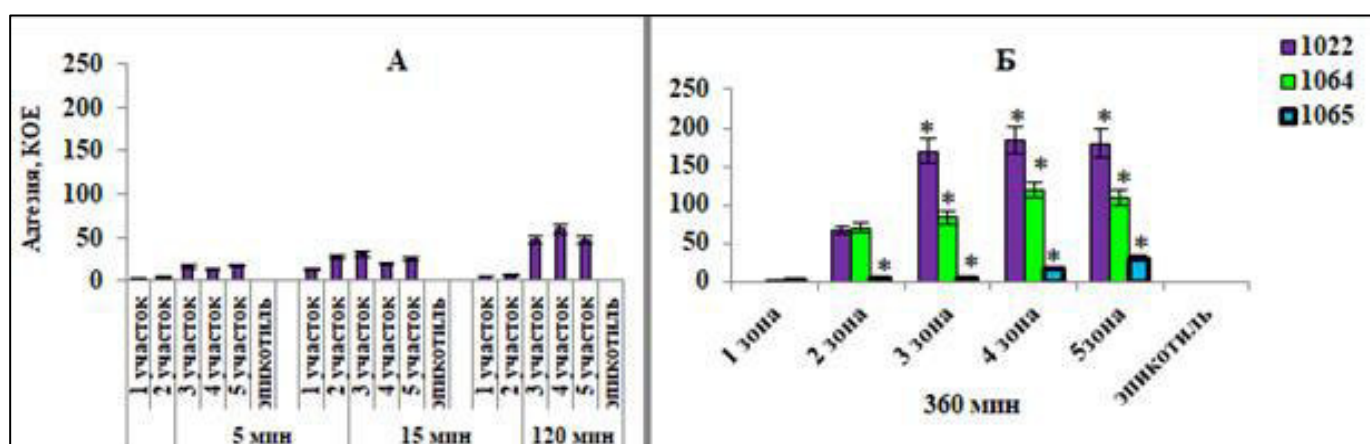


Рисунок 2. А – интенсивность адгезии *Rlv* (эффективный штамм 1022) в зонах роста корня проростков гороха. Б – интенсивность адгезии различных штаммов *Rlv* (1022, 1064, 1065) в зонах роста корня проростков гороха через 360 мин коинкубации с корнями проростков гороха.  $n = 3$ ,  $m \pm S.E.$  \* – различия статистически значимы ( $P \leq 0.01$ ) при сравнении между собой групп «*Rlv*1022», «*Rlv*1064», «*Rlv*1065» по критерию Ньюмена-Кейсла.

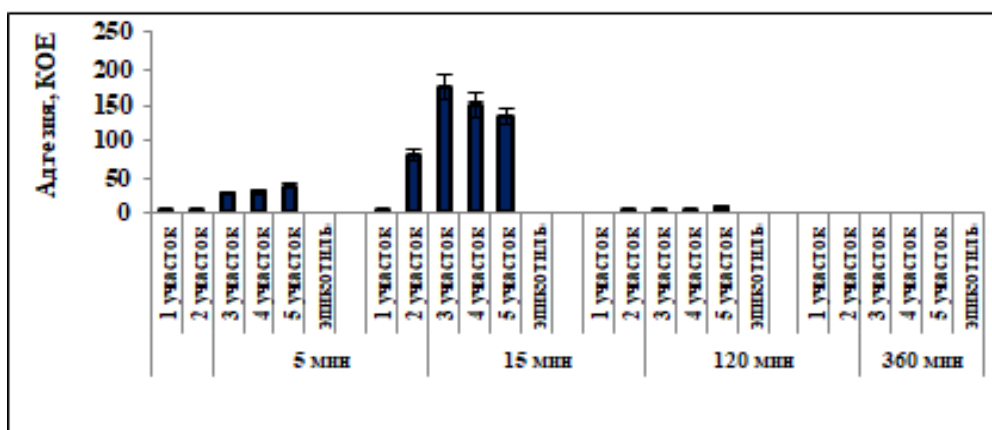


Рисунок 3. Интенсивность адгезии *Psp* в зонах роста корня проростков гороха.  $n = 3$ ,  $m \pm S.E.$

Адгезия патогена гороха *Psp* достигала максимума к 15 минутам инкубации в аналогичных с эффективным штаммом ризобий участках корня. Однако через 120 минут ее интенсивность снижалась, а к 360 минутам уже полностью исчезала, что свидетельствует об отсутствии специфических взаимодействий *Psp* с клетками корня гороха (рис. 3).

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

В природе неспецифическая стадия адгезии бактерий на поверхности клеток растений обусловлена физико-химическими параметрами и при благоприятных обстоятельствах переходит в специфическую фазу (Звягинцев и др., 2005). В наших экспериментах неспецифическая адгезия наблюдалась при кратковременном, в течение 5-15 мин, взаимодействии корней проростков гороха с *Rlv*, а также с *Psp*, несмотря на то, что объектами инфицирования этого патогена являются листья, стручки и семена гороха, но не корни. При этом почти полное отсутствие адгезии *Psp* в участках корня проростков гороха через 120 мин свидетельствует об окончании стадии неспецифической адгезии. В отличие от псевдомонад, для *Rlv* корни проростка гороха являются естественной нишей обитания и усиление адгезии этих бактерий через 120 и 360 мин после инокуляции свидетельствует о переходе к специфической стадии взаимодействия с проростками гороха. Следует заметить, что неэффективные по азотфиксации штаммы *Rlv*(1064, 1065) проявляли более низкую интенсивность адгезии, чем эффективный штамм *Rlv*1022 что, возможно, связано с отличиями в составе их экзополисахаридов, липополисахаридов и глюканов (Антипчук, Косенко, 2004; Castellani et al., 2021). Возбудитель кольцевой гнили картофеля, *Cs*, обладает довольно широким спектром экзополисахаридов и интенсивно секретирует их во внешнюю среду (Shafikova et al., 2006), однако это не способствовало его адгезии на поверхности корня гороха.

#### **Изменение активности тАЦ и рАЦ в зонах роста корня проростков гороха под влиянием *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *P. syringae* pv. *pisii* или *C. sepedonicus***

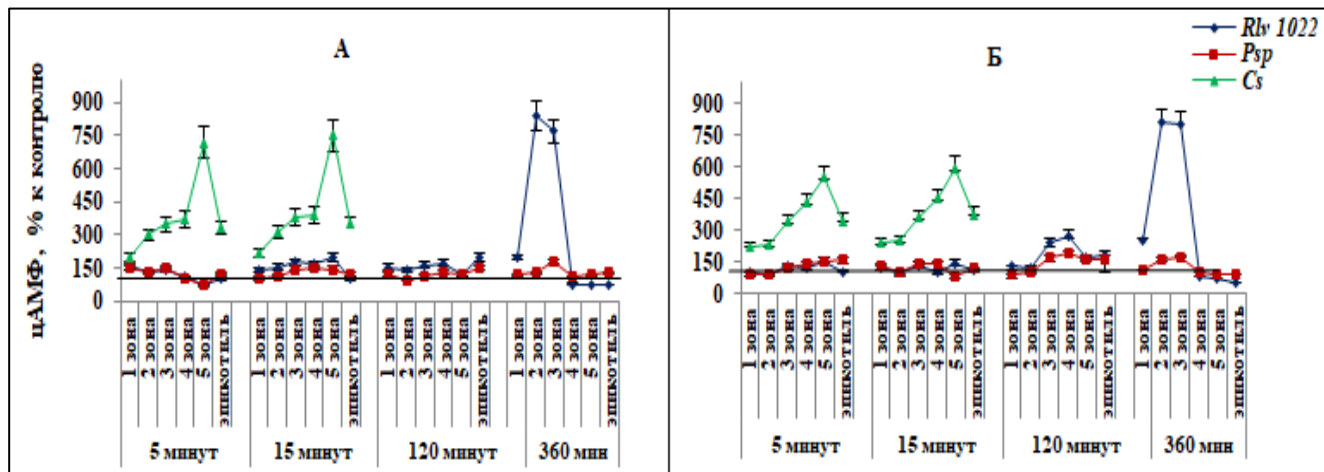
Очевидно, что плотный контакт бактерий с поверхностью корня проростков гороха может оказывать различное влияние на растение (Миннебаев и др., 2019; Кузина и др., 2020), в том числе на скорость роста, а также активности сигнальных систем растения. За 360 мин взаимодействия мутуалист и специфический патоген не оказывали существенного влияния на рост корней проростков гороха, однако при воздействии в течение 5-120 мин *Psp* и эффективного штамма *Rlv* происходила активация тАЦ и рАЦ во всех зонах корня проростков гороха примерно в полтора-два раза (рис. 4). Инокуляция в течение 360 минут *Rlv*1022 вызвала резкое возрастание активности тАЦ и рАЦ в участках с зачатками и молодыми корневыми волосками (II-III участки), в отличие от варианта с *Psp* (рис. 4).

В эпикотиле как при воздействии *Rlv*1022, так и *Psp*, наиболее высокий уровень активности обеих форм фермента регистрировался через 120 мин, и только через 360 мин происходило незначительное снижение активности рАЦ (рис. 4).

Напротив, при инокуляции *Cs* в течение 5-15 мин происходила активация обеих форм АЦ во всех зонах корня и в эпикотиле. Самый высокий ее уровень наблюдался в V зоне (рис. 4).

При взаимодействии с *Rlv* и *Psp* изменения в активности обеих форм аденилатциклазы носили схожий характер в первые 5-15 минут (рис. 4). Это явление можно объяснить тем, что на ранних этапах симбиоза и патогенеза защитные реакции растений во многом сходны (Gourion et al., 2015).





**Рисунок 4.** Динамика изменения активности тАЦ и рАЦ в зонах роста корня проростков гороха под воздействием эффективного штамма *Rlv1022/Psp/Cs*. Контролем служили проростки, инкубированные на питательной среде без бактерий. А – тАЦ, Б – рАЦ. n = 3, m ± S.E.

Частично это связано с набором бактериальных молекул, PAMPs, которые распознаются растениями и включают флагеллин, фактор удлинения Tu (EF-Tu), липополисахариды и пептидогликаны (Couto, Zipfel, 2016). С другой стороны, у растений в этом процессе принимают участие рецепторные киназы NFP (Nod factor perception) (Klaus-Heisen et al., 2011; Sulima et al., 2017), участвующие в восприятии, в том числе, Nod-факторов (Nodulation factors). Для гороха на эту роль рассматриваются протеинкиназы Sym10, Sym37 и K1 (Долгих и др., 2010, 2017). Показано, что такие рецепторные киназы обладают высоким сродством не только к Nod-факторам, но и, например, к хитину фитопатогенов (Жуков и др., 2008; Fliegmann, Bono, 2015). Таким образом, в узнавание Nod-факторов бобовых вовлечены различные рецепторные комплексы, отличающиеся гетерогенностью (Долгих и др., 2017).

Интересно, что, несмотря на отсутствие адгезии, кратковременный (5-15 мин) контакт корней проростков гороха с *Cs* также вызывал весьма интенсивную реакцию тАЦ и рАЦ (рис. 4). Так как горох не является растением-хозяином для данного патогена, его восприятие, вероятно, происходит без участия рецепторов. Известно, что мукоидные штаммы *Cs* содержат, по сравнению с *Rlv* и *Psp*, много экзополисахаридов, имеющих низкий pH (4.5) и способны подкислять среду инкубации проростков. Именно это явление могло быть причиной активации тАЦ в корнях проростков гороха. Аналогичный эффект в эпикотиле является проявлением системного сигнала, когда изменение гомеостаза клеток корня индуцирует ответные реакции в надземной части проростка.

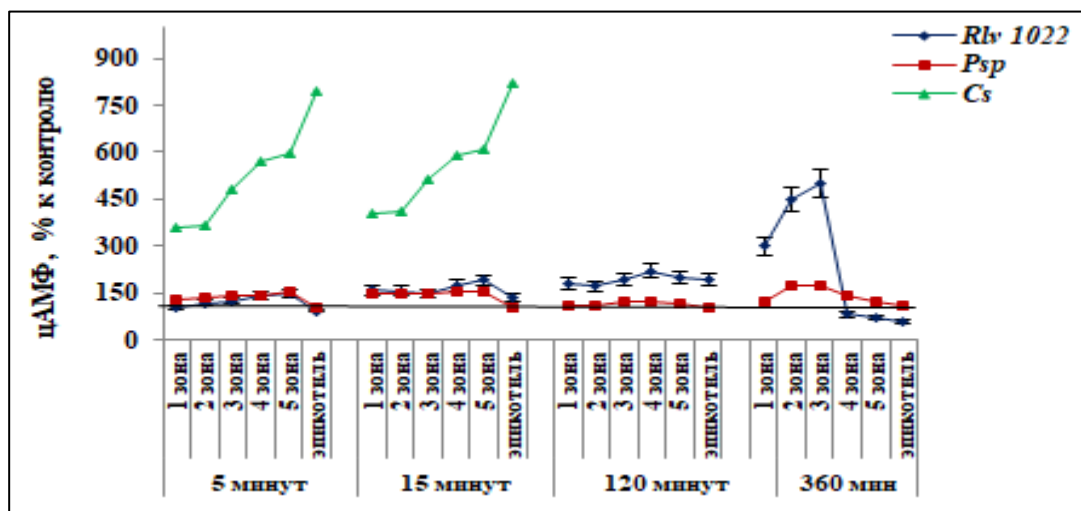
#### **Влияние инокуляции *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *P. syringae* pv. *pisi* или *C. sepedonicus* на концентрацию цАМФ в различных участках корня проростков гороха**

При инокуляции эффективным штаммом *Rlv1022/Psp* или *Cs* динамика изменения уровня эндогенного цАМФ в основном совпадала с изменением активности АЦ во всех зонах корня и в эпикотиле, за исключением варианта «*Psp* 120 мин», когда уровень цАМФ снижался практически до уровня контроля (рис. 5).

Под влиянием неэффективных штаммов *Rlv*(1064 и 1065) через 360 мин уровень цАМФ незначительно и почти равномерно возрастал во всех зонах корня и в эпикотиле (рис. 6).

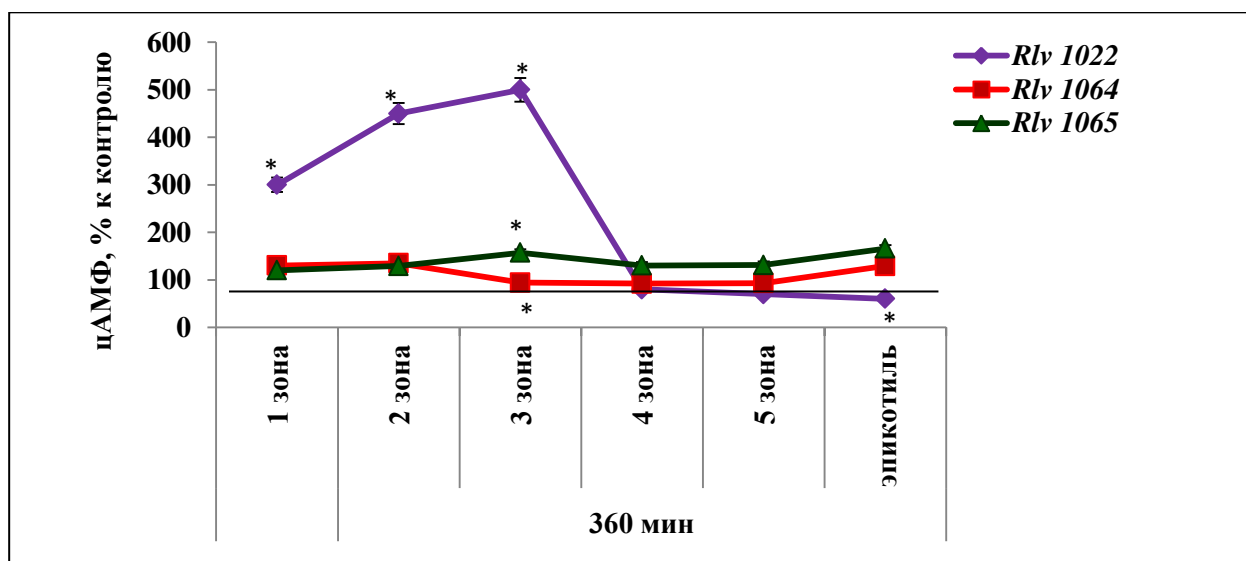
К 360 мин воздействия, когда адгезия *Psp* отсутствовала, концентрация цАМФ, тем не менее, возрастала во II и III зонах, но не столь значительно, как в варианте с *Rlv1022*. При этом в эпикотиле данный показатель приближался к контролю (рис. 5).

Наиболее интенсивное возрастание уровня цАМФ во всех зонах корней проростков гороха в первые 5-15 минут воздействия вызывал патоген картофеля *Cs* (рис. 5).



**Рисунок 5.** Динамика изменения концентрации цАМФ в зонах роста корня проростков гороха под воздействием *Rlv1022/Psp/Cs*. В качестве контроля (100%) были взяты проростки, инкубированные на питательной среде без бактерий.  $n = 3$ ,  $m \pm S.E.$

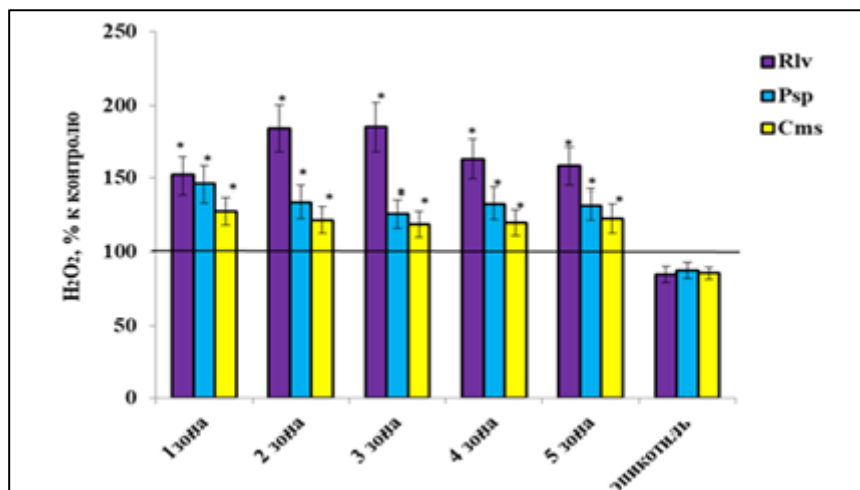
В результате проведенных исследований можно сделать вывод о том, что в клетках участков корней проростков гороха, различных по степени сформированности волосков, работа основных компонентов АСС модулируется под воздействием бактерий, различных по специфичности к гороху и специализации. Однако степень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



**Рисунок 6.** Динамика изменения концентрации цАМФ в зонах роста корня проростков гороха под воздействием различных по азотфиксирующей эффективности штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* через 360 мин. воздействия. В качестве контроля (100%) были взяты проростки, инкубированные на питательной среде без бактерий.  $n = 3$ ,  $m \pm S.E.$  \* – различия статистически значимы ( $P \leq 0.01$ ) при сравнении между собой групп «*Rlv1022*», «*Rlv1064*», «*Rlv1065*» по критерию Ньюмена-Кейсла

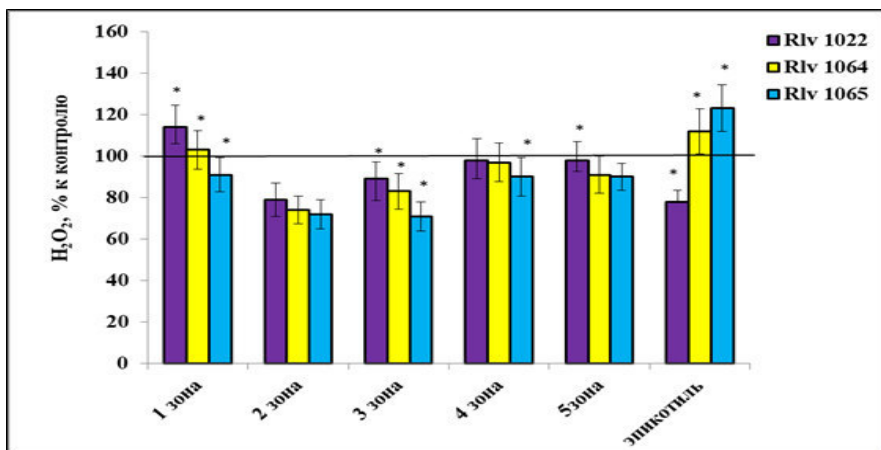
**Влияние *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *P. syringae* pv. *pisii*, *C. sepedonicus* на изменение концентрации эндогенного  $H_2O_2$  в различных зонах корня проростков гороха и в эпикотиле**

Кратковременная инокуляция, в течение 5 мин, эффективным штаммом *Rlv1022* вызывала существенное возрастание эндогенного  $H_2O_2$  выше контроля во II и III зонах (рис. 7).



**Рисунок 7.** Изменение концентрации  $H_2O_2$  в зонах роста корня проростков гороха при воздействии в течение 5 мин *Rlv/Psp/Cs*. В качестве контроля (100%) были взяты проростки, инкубированные на питательной среде без бактерий.  $n = 3$ ,  $m \pm S.E.$  \* – различия статистически значимы ( $P \leq 0.01$ ) при сравнении между собой групп «*Rlv1022*», «*Psp*», «*Cs*» по критерию Ньюмена-Кейсла

Под воздействием *Psp* и *Cs* уровень  $H_2O_2$  возрастал в меньшей степени и незначительно отличался в обоих вариантах и по зонам корня. При этом во всех вариантах эксперимента в эпикотиле проростков концентрация  $H_2O_2$  снижалась практически одинаково примерно на 20% от контроля (рис. 7).



**Рисунок 8.** Изменение концентрации  $H_2O_2$  в зонах корня проростка гороха через 360 минут после инокуляции различными по азотфиксации штаммами *Rlv*(1022, 1064, 1065). Контролем служили проростки, инкубированные на питательной среде без бактерий.  $n = 3$ ,  $m \pm S.E.$ \* – различия статистически значимы ( $P \leq 0.01$ ) при сравнении между собой групп «*Rlv1022*», «*Rlv1064*», «*Rlv1065*» по критерию Ньюмена-Кейсла

Влияние на содержание эндогенного  $H_2O_2$  исследовали также при более длительной инокуляции (360 мин) проростков гороха со штаммами *Rlv*, различающимися по эффективности азотфиксирующего симбиоза. В этих условиях только в I зоне эффективный штамм вызывал повышение уровня  $H_2O_2$  в сравнении с контролем, тогда

как во всех остальных зонах инокуляция всеми тремя штаммами приводила к снижению его уровня на 10-30%. При этом в эпикотиле только неэффективные штаммы (1064 и 1065) вызывали повышение концентрации  $H_2O_2$  на 15-25% (рис. 8).

По литературным данным, на начальных этапах симбиотических взаимодействий генерация АФК является более сильной и продолжительной, чем при инфицировании патогенами (Peleg-Grossman, Melamed-Book, 2012). Подобное явление в нашей работе наблюдалось в участках корня проростков гороха, различающихся по степени сформированности корневых волосков, через 5 минут инфицирования *Rlv1022*. При этом, воздействие *Psp* и *Cs* вызывало меньшее возрастание уровня  $H_2O_2$ . При формировании БРС подавление защитных механизмов растений может включаться как на начальных этапах симбиоза, как показано на модели *M. truncatula* (Lohar et al., 2006), так и на его более поздних стадиях (Bougu et al., 2013; Berrabah et al., 2014). Считается, что окислительная вспышка на ранних этапах симбиоза способствует передаче внутриклеточных сигналов и зависит от рецепторов к Nod-факторам, локализованным в плазмалемме клеток корня бобовых (Долгих и др., 2010; Fernandez-Göbel et al., 2019). Через 360 мин при инфицировании ризобиями это явление в участках корня проростков гороха, различающихся по степени сформированности корневых волосков, становится выраженным и понижение уровня этой сигнальной молекулы в зонах адгезии и проникновения (II–III зоны) способствует повышенной колонизации и вторжению ризобий в эти участки корня (рис. 8). Вероятно, в этом случае пероксид водорода, наряду с сигнальной ролью, выполняет функции антибактериального агента, регулируя инфекционную нагрузку по зонам корня.

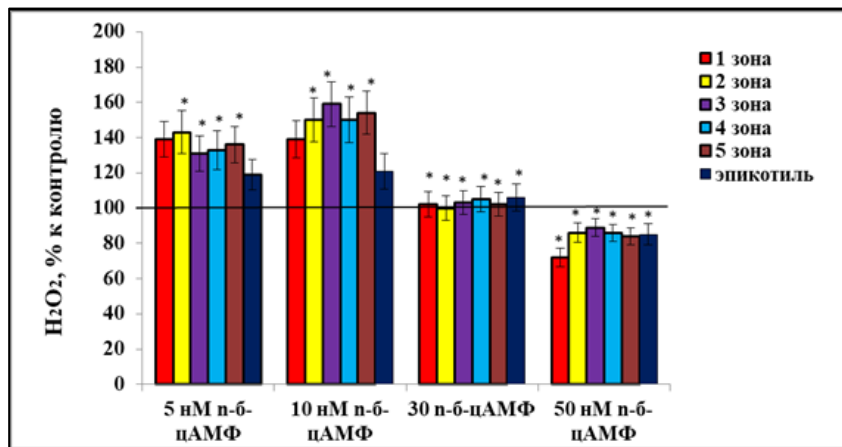
#### **Влияние п-бутирил-цАМФ и сурамина на изменение концентрации эндогенного $H_2O_2$ в зонах роста корня и в эпикотиле проростков гороха при воздействии *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *P. syringae* pv. *pisi* и *C. sepedonicus***

Сигналинг в растительных клетках обеспечивается взаимодействующими каскадами различных сигнальных систем (Mazars et al., 2010; Saxena, et al., 2016). При этом важны самые ранние изменения в сигнальном статусе растительных клеток, потому что в этот период происходит перепрограммирование генома, соответствующее стрессовой нагрузке (Mazars et al., 2010). Немаловажным является способность вторичных мессенджеров оказывать влияние на активность компонентов других сигнальных систем.

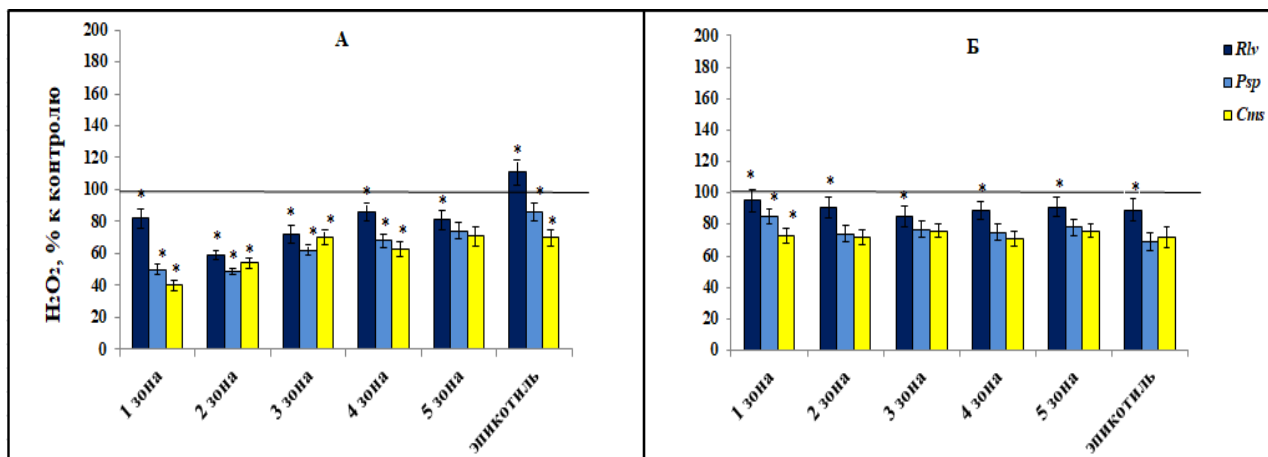
Исходя из этого, представляло интерес исследовать возможную роль цАМФ в регуляции концентрации  $H_2O_2$  в зонах роста корня проростков гороха, в том числе при кратковременном воздействии *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *P. syringae* pv. *pisi* и *C. sepedonicus*. Для этого был проведен модельный эксперимент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

Проведенные исследования показали, что как избыток, так и недостаток внутриклеточного цАМФ оказывает влияние на изменение концентрации эндогенного пероксида водорода в зонах роста корня проростков гороха. Так, 5 и 10 нМ экзогенного п-бутирил-цАМФ способствовал повышению уровня  $H_2O_2$  во всех участках корней проростков гороха, тогда как 30 нМ не оказывали эффекта, а 50 нМ снижали этот показатель во всех зонах (рис. 9).

Для дальнейших исследований были выбраны 10 и 50 нМ п-бутирил-цАМФ (рис. 10 А, Б). Инокуляция *Rlv* после воздействия б-цАМФ в обеих концентрациях почти в одинаковой степени снизила концентрацию  $H_2O_2$  во всех зонах, за исключением эпикотиля в варианте «10 нМп-бутирил-цАМФ». Инокуляция обоими видами патогенов (*Psp* и *Cs*) вызвала более значительное, по сравнению с *Rlv 1022*, снижение уровня  $H_2O_2$  в зонах роста корня проростков гороха (рис. 10 А, Б).



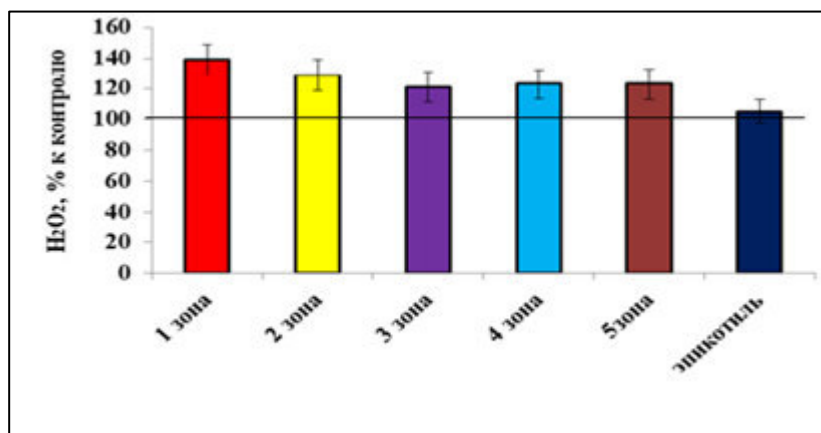
**Рисунок 9.** Влияние различных концентраций п-бутирил-цАМФ на изменение уровня  $H_2O_2$  в зонах роста корня и эпикотиле неинокулированных проростков гороха. Контролем служили проростки, инкубированные на воде.  $n = 3$ ,  $m \pm S.E.$  \* – различия статистически значимы ( $P \leq 0.01$ ) при сравнении между собой групп «5 нМп-бутирил-цАМФ», «10 нМп-бутирил-цАМФ», «30 нМп-бутирил-цАМФ», «50 нМп-бутирил-цАМФ» по критерию Ньюмена-Кейсла.



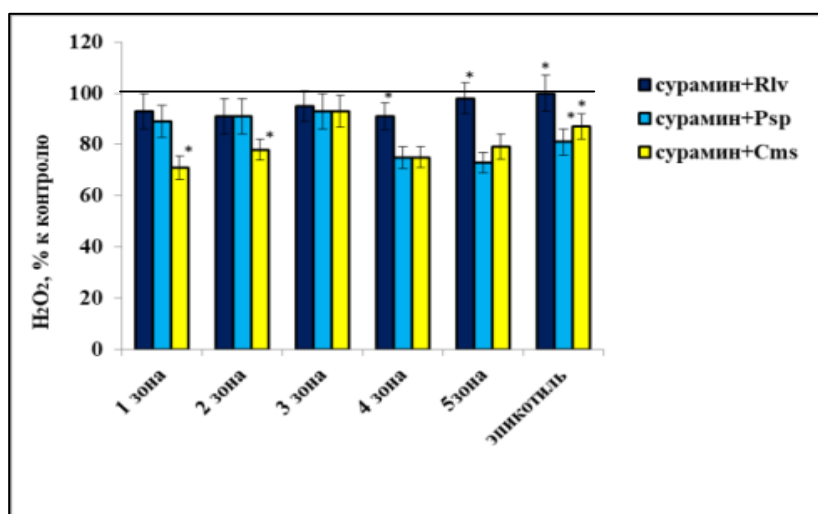
**Рисунок 10.** Влияние инокуляции *Rlv1022*, *Psp*, *Cs* на изменение концентрации  $H_2O_2$  в зонах роста корня проростков гороха после воздействия п-бутирил-цАМФ: А – бактерии + 10 нМоль-бутирил-цАМФ»; Б – бактерии + 50 нМоль-бутирил-цАМФ»; контролем для вариантов «А» и «Б» служили неинокулированные бактериями проростки гороха.  $n = 3$ ,  $m \pm S.E.$  \* – различия статистически значимы ( $P \leq 0.05$ ) при сравнении между собой групп «*Rlv1022*», «*Psp*», «*Cs*» по критерию Ньюмена-Кейсла.

Под воздействием ингибитора тАЦ, сурамина, при снижении уровня эндогенного цАМФ концентрация пероксида водорода возрастала во всех зонах неинокулированных бактериями корней проростков гороха (рис. 11).

Инокуляция *Rlv* после искусственного понижения концентрации цАМФ приводила к незначительному снижению содержания  $H_2O_2$  в I-IV зонах корня проростков гороха. Воздействие *Psp* или *Cs* служило причиной более интенсивного, по сравнению с ризобиями, подавления уровня  $H_2O_2$  в участках корней, содержащих сформированные корневые волоски, а также в эпикотиле (рис. 12).



**Рисунок 11.** Влияние сурамина на концентрацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в зонах роста корня неинокулированных бактериями проростков гороха. Контролем служили проростки гороха, инкубированные на воде. n = 3, m ± S.E.

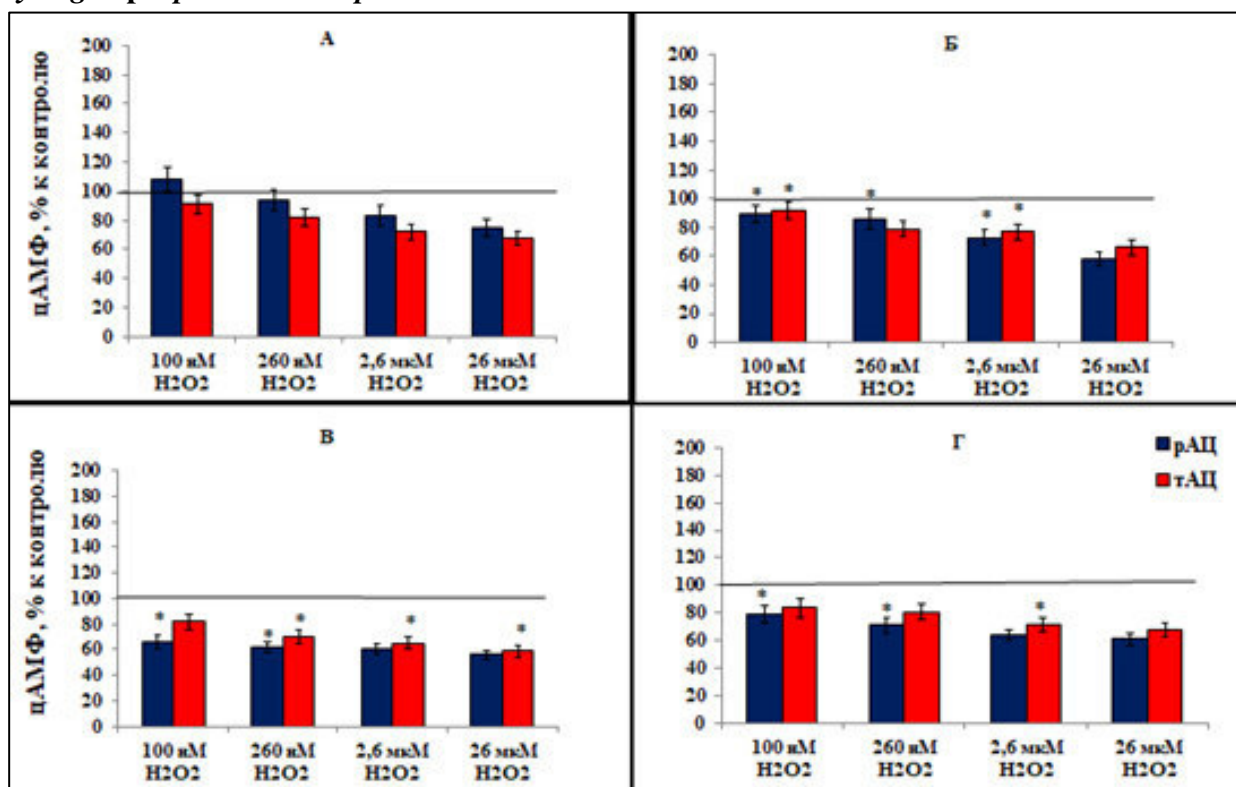


**Рисунок 12.** Влияние сурамина на концентрацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в зонах роста корня проростков гороха при инокуляции *Rlv1022*, *Psp*, *Cs* в течение 5 минут. Контролем служили проростки гороха, инкубированные в 800 мкМ сурамина в течение 30 минут. n = 3, m ± S.E. \* – различия статистически значимы (P ≤ 0.05) при сравнении между собой групп «сурамин+*Rlv*», «сурамин+*Psp*», «сурамин+*Cs*» по критерию Ньюмена-Кейсла.

По литературным данным, цАМФ может быть одним из триггеров, запускающих молекулярные механизмы, способствующие повышению уровня АФК, главным образом, внутриклеточного пероксида водорода (Bindschedler et al., 2001; Sabetta et al., 2016, 2019). Наши данные подтверждают, что как повышенный, так и пониженный уровни цАМФ оказывают влияние на концентрацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетках корня проростков гороха. Наблюдаемый эффект в изменении уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> от последовательного насыщения клеток корня гороха цАМФ и дальнейшей инокуляции бактериями можно объяснить тем, что под их воздействием увеличивалось содержание цАМФ в клетках, которое «накладывалось» на уже имеющийся повышенный вследствие инокуляции бактериями уровень эндогенного цАМФ.

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

Влияние экзогенного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на активность тАЦ и рАЦ из клеток корней проростков гороха после инокуляции эффективным штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *P. syringae* pv. *pisi* или *C. sepedonicus*



**Рисунок 13.** Влияние различных концентраций H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и инокуляции бактериями на активность тАЦ и рАЦ в корнях проростков гороха: А – неинокулированные бактериями проростки + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Б – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+*Rlv1022*; В – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+*Psp*; Г – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+*Cs*. Контролем для варианта «А» служили проростки, инкубированные на питательной среде без бактерий. Контролем для вариантов «Б, В, Г», служили образцы из варианта «А». n = 3, m ± S.E. \* - различия статистически значимы (P ≤ 0.05) при сравнении между собой групп «Б», «В», «Г» по критерию Ньюмена-Кейсла

В экспериментах применяли несколько концентраций пероксида водорода: 100 нМоль, 260 нМоль, 2.6 мкМоль, 26 мкМоль. Пероксид водорода оказывал дозозависимый ингибирующий эффект на активность рАЦ, а также тАЦ (рис. 13 А).

Аналогичное явление наблюдалось при предварительной инокуляции (5 мин) корней проростков гороха всеми видами испытуемых бактерий (рис. 13 Б, В, Г).

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

Как было показано ранее, кратковременное воздействие *Rlv*, *Psp* и *Cs* приводило к модуляции активности тАЦ и рАЦ, и, соответственно к изменению концентрации внутриклеточного цАМФ в корнях проростков гороха (рис. 4, 5).

Таким образом, в настоящих экспериментах из инокулированных бактериями корней проростков гороха были выделены тАЦ и рАЦ с уже модифицированной активностью. Кроме того, аденилатциклазы, выделенные из инокулированных тканей, уже испытали воздействие пероксида водорода, поскольку в этом варианте детектировался повышенный уровень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетках корня проростков гороха (рис. 7). В связи с этим можно полагать,

что снижение активности тАЦ и рАЦ в этом случае связано с аддитивным комплексным эффектом эндогенного и экзогенного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что на ранних этапах взаимодействия мутуалистические и фитопатогенные бактерии вызывают сходные реакции сигнальных систем растений. При этом немаловажным является способность вторичных мессенджеров влиять на работу других сигнальных систем. Наиболее исследованной в становлении бобово-ризобияльного симбиоза и в защитных реакциях при патогенезе является роль только некоторых вторичных мессенджеров, например, пероксида водорода, ионов кальция и NO (Колупаев, 2007; Lindberg et al., 2012; Puppo et al., 2013). В то же время участие в этих процессах компонентов аденилатциклазной сигнальной системы (АСС) и, в частности, цАМФ остается почти не изученной.

Поэтому цель данного исследования состояла в изучении активности компонентов АСС, а также их взаимосвязи с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в зонах корня проростков гороха, отличающихся по степени сформированности корневых волосков, на этапах адгезии бобово-ризобияльного симбиоза и при инокуляции бактериальными патогенами различной специфичности.

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

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

Адгезия патогена гороха *Psp* достигала максимума к 15 минутам инкубации в аналогичных с эффективным штаммом ризобий участках. Однако через 120 минут ее интенсивность снижалась, а к 360 минутам уже полностью исчезала, что свидетельствует об отсутствии специфических взаимодействий *Psp* с клетками корня гороха на данном этапе.

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

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

При этом ризобии и патогены оказывали различный эффект на активность трансмембранной и «растворимой» форм аденилатциклаз (тАЦ, рАЦ) и, соответственно, уровень цАМФ в различных участках корня проростков гороха. Так, при кратковременном воздействии (5-120 мин) эффективным штаммом *Rlv* и патогеном гороха *Psp* происходила активация тАЦ и рАЦ во всех зонах корня проростков гороха примерно в полтора-два раза, что во всех случаях приводило к повышению уровня цАМФ, за исключением варианта «*Psp* 120 мин». Однако, более длительная инокуляция эффективным штаммом *Rlv* (360 минут) вызывала резкое возрастание уровня цАМФ в участках с зачатками и молодыми корневыми волосками, в отличие от воздействия неэффективных по азотфиксации штаммов ризобий, а также *Psp*. Интересно, что из всех



исследованных видов бактерий, наибольшую активацию тАЦ и рАЦ и возрастание уровня цАМФ во всех зонах роста корня вызывал неспецифический для гороха патоген *Cs* уже в первые 5-15 минут после инокуляции, несмотря на полное отсутствие адгезии. Таким образом, можно сделать вывод о важной роли эндогенного цАМФ в регуляции ранних стадий бобово-ризобиального симбиоза и защитных реакциях при патогенезе.

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

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

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

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

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

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

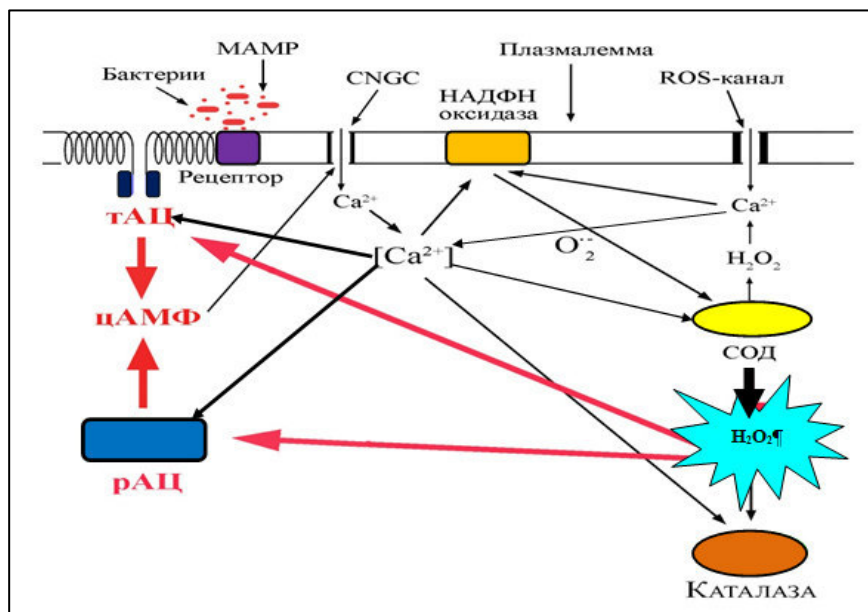
Инокуляция *Rlv* после искусственного понижения концентрации цАМФ приводила к незначительному снижению содержания  $H_2O_2$  в I-IV зонах корня проростков гороха. Воздействие *Psp* и *Cs* служило причиной более интенсивного, по сравнению с ризобиями, подавления уровня  $H_2O_2$  в участках корней, содержащих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

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

На следующем этапе были проведены исследования по влиянию экзогенного пероксида водорода на активность тАЦ и рАЦ в гомогенате, полученном из корней

проростков гороха. В экспериментах применяли несколько концентраций пероксида водорода: 100 и 260 нМ, 2.6 мкМ и 26 мкМ. Было показано, что экзогенный пероксид водорода подавлял активность аденилатциклазы, причем эффект был дозозависимым. Так как используемые в экспериментах концентрации  $H_2O_2$  (нано- и микромолярные) были недостаточно велики для того, чтобы вызывать повреждение мембраны, то вероятно, наблюдаемый эффект экзогенного  $H_2O_2$  связан с конформационными изменениями активного центра тАЦ и рАЦ, локализованного в цитоплазме. Более существенное дозозависимое ингибированию активности обеих форм аденилатциклазы в грубом гомогенате наблюдалось после предварительной инокуляции целых корней проростков *Rlv*. При инокуляции *Psp* и *Cs* снижение активности рАЦ и тАЦ было более интенсивным, чем в варианте с *Rlv*. Наблюдаемый эффект, вероятно, связан с аддитивным комплексным действием эндогенного и экзогенного  $H_2O_2$ , поскольку из инокулированных корней проростков гороха были выделены тАЦ и рАЦ с модифицированной активностью, которые уже испытали воздействие эндогенного пероксида водорода.

На основании результатов проведенного исследования, а также с привлечением литературных данных (Максимов и др., 2010; Bindshedler et al., 2001; Yang, Poovaiah, 2002; Sabetta et al., 2016), можно представить следующую схему активации аденилатциклазной системы и ее взаимодействия с пероксидом водорода в клетках корней проростков гороха на ранних стадиях инокуляции азотфиксирующими симбиотическими или фитопатогенными бактериями (рис. 14).



**Рисунок 14.** Схема активации аденилатциклазной и супероксидсинтазной сигнальных систем в клетках корней проростков гороха на ранних стадиях взаимодействия с бактериями. СОД – супероксиддисмутаза; CNGC (cyclic nucleotide-gated channels) – регулируемые циклическими нуклеотидами ионные каналы; MAMP (microbial associated molecular patterns) – микробные молекулярные паттерны; ROS-каналы – ионные каналы, зависимые от АФК

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

НАДФН-оксидазы и супероксиддисмутазы (СОД). Локальное изменение концентрации вторичных мессенджеров могут оказывать активирующий/ингибирующий эффект на ферменты первого порядка сигнальных систем. Как отмечалось выше, кальций может модулировать активность НАДФН-оксидазы, СОД и каталазы, а по некоторым данным, и активность тАЦ из клеток растений.

Таким образом, модуляция компонентов аденилатциклазной сигнальной системы в клетках корней проростков гороха в первые минуты взаимодействия как с бактериальным мутуалистом, так и со специфическим патогеном, носят схожий характер. Различия в активности этой сигнальной системы происходят через несколько часов после инокуляции и, вероятно, направлены на запуск у гороха характерных для каждого типа взаимодействия процессов. Наиболее интенсивная, по сравнению с *Rlv* и *Psp* активация АЦ и возрастание уровня цАМФ в корнях проростков гороха под влиянием неспецифического патогена *Cs* может быть обусловлена характерными для данного штамма экзометаболитами.

Примерно одинаковое во всех участках корней проростков гороха повышение уровня  $H_2O_2$ , наблюдаемое в первые минуты взаимодействия со специфическим и неспецифическим патогеном, вероятно, является проявлением защитной реакции у растения. Возрастание концентрации этой молекулы при воздействии *Rlv*, причем наиболее интенсивное в зонах зачатков и молодых корневых волосков, может быть направлено на запуск сигналов, необходимых для «включения» у гороха симбиотических процессов.

## ВЫВОДЫ

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

**Список работ, опубликованных Гончаровой Аленой Михайловной по теме диссертационной работы:**

1. Ломоватская Л. А. Активность аденилатциклаз и изменение концентрации цАМФ в клетках корня проростков гороха при инфицировании мутуалистами и фитопатогенами / Л. А. Ломоватская, О. В. Кузакова, А. С. Романенко, **А. М. Гончарова** // Физиология растений. – 2018. – Т. 65, №. 4. – С. 310-320.
2. Кузакова О. В. Влияние различных по симбиотической эффективности штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* на изменение концентрации цАМФ и пероксида водорода в клетках проростков гороха / О. В. Кузакова, Л. А. Ломоватская, **А. М. Гончарова**, А. С. Романенко // Физиология растений. – 2019. – Т. 66, №. 5. – С. 360-366.
3. Ломоватская Л. А. цАМФ участвует в регуляции уровня пероксида водорода в корне проростков гороха при биотическом стрессе / Л. А. Ломоватская, О. В. Кузакова, **А. М. Гончарова**, А. С. Романенко // Физиология растений. – 2020. – Т. 67. – С. 270-277.
4. Кузакова О. В. Регуляция активности аденилатциклаз клеток корня гороха пероксидом водорода при инфицировании патогенами и мутуалистом / О. В. Кузакова, Л. А. Ломоватская, А. С. Романенко, **А. М. Гончарова** // Известия Вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2020. – Т. 10, № 3. – С. 450-458.