

Оригинальная статья / Original article

УДК 581.1

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-2-294-302>

Влияние клубеньковых и патогенных бактерий на изменение уровня оксида азота и циклического аденозинмонофосфата в корнях гороха на начальных этапах взаимодействия

© А.А. Ищенко*, Н.В. Филинова*, А.В. Сидоров***

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, Российская Федерация

**Иркутский государственный медицинский университет,
г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме: Врожденный иммунитет растения играет существенную роль на начальных этапах формирования бобово-ризобияльного симбиоза. В связи с этим авторами настоящей работы была изучена динамика концентраций двух сигнальных молекул – оксида азота (NO) и циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), в корнях этиолированных проростков гороха *Pisum sativum* L. при взаимодействии с патогенными (*Pseudomonas syringae* pv. *pisi*) и клубеньковыми (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) бактериями. В краткосрочных опытах обнаружен эндогенный ритм изменения содержания оксида азота в тканях корня проростков гороха, характеризующийся во временной динамике увеличением и снижением уровня оксида азота и зависящий от экзогенных факторов биотической (симбиотические и патогенные бактерии) природы. Подобные флуктуации также были обнаружены при изучении динамики уровня циклического аденозинмонофосфата под влиянием тех же биотических факторов. Наблюдаемые эффекты связаны, возможно, с влиянием на растение определенных экзометаболитов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Nod-факторы) и *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (экзополисахариды клеточных стенок), которые активируют врожденный иммунитет бобового растения. При этом различная динамика изменения изучаемых компонентов сигнальных систем растения-хозяина на начальных этапах взаимодействия с симбиотическими и патогенными микроорганизмами имеет различную функцию: при симбиозе регуляторную, а при патогенезе – защитную. Предполагается, что изменение динамики компонентов NO-синтазной и аденилатциклазной сигнальных систем (NO и цАМФ) может быть использовано растением-хозяином в качестве «кода» для передачи сигнала о природе действующего фактора и индукции соответствующих реакций на молекулярном уровне.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., оксид азота, циклический аденозинмонофосфат, биотический стресс, сигнальные системы

Благодарности: Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (молодежный грант №18-34-00221 мол_а).

Информация о статье: Дата поступления 24 ноября 2019 г.; дата принятия к печати 29 мая 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 июня 2020 г.

Для цитирования: Ищенко А.А., Филинова Н.В., Сидоров А.В. Влияние клубеньковых и патогенных бактерий на изменение уровня оксида азота и циклического аденозинмонофосфата в корнях гороха на начальных этапах взаимодействия. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 2. С. 294–302. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-2-294-302>

Effect of nodule and pathogenic bacteria on levels of nitric oxide and cyclic adenosine monophosphate in pea roots at initial stages of interaction

Aleksei A. Ishchenko*, Nadezhda V. Filinova*, Aleksandr V. Sidorov***

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

**Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract: A significant role in the initial stages of rhizobial symbiosis formation in pea plants is performed by innate immunity. In this connection, the present study is focused on the concentration dynamics of two signalling molecules – nitric oxide (NO) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) – in the roots of etiolated seedlings of the *Pisum sativum* L. pea interacting with pathogenic (*Pseudomonas syringae* pv. Pisi) and nodule (*Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*) bacteria. In time dynamics experiments, an endogenous rhythm of nitric oxide content changes in the root tissues of pea seedlings was characterised by an increase followed by a decrease in the level of nitric oxide and depending on exogenous biotic factors (symbiotic and pathogenic bacteria). Similar fluctuations were also observed when studying the dynamics of cyclic adenosine monophosphate concentration under the influence of the same biotic factors. The observed effects are assumed to be associated with certain exometabolites of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Nod-factors) and *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (cell wall exopolysaccharides) influencing the legume plant and activating its innate immunity. Moreover, it is feasible that the different dynamics of changes in the studied components of the host plant signalling systems at the initial stages of interaction with symbiotic and pathogenic microorganisms have a variegated function: regulatory or protective in cases of symbiosis and pathogenesis, respectively. The observed change in the dynamics of the NO-synthase and adenylate cyclase signalling systems (NO and cAMP) components is assumed to be applied by the host plant as a “code” for transmitting a signal concerning the nature of the operating factor and the generation of corresponding reactions at the molecular level.

Keywords: *Pisum sativum* L., nitric oxide, cyclic adenosine monophosphate, biotic stress, signalling systems

Acknowledgments: The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (youth project no. 18-03-00168 мол_а).

Information about the article: Received November 24, 2019; accepted for publication May 29, 2020; available online June 30, 2020.

For citation: Ishchenko AA, Filinova NV, Sidorov AV. Effect of nodule and pathogenic bacteria on levels of nitric oxide and cyclic adenosine monophosphate in pea roots at initial stages of interaction. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2020;10(2):294–302. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-2-294-302>

ВВЕДЕНИЕ

Клубеньковые бактерии и бобовые растения прошли длительную эволюцию, прежде чем их взаимодействие стало приносить пользу растению-хозяину в виде восстановленного ризобиями *in planta* атмосферного азота. Возникает вопрос: почему ризобии выбрали для своей деятельности бобовые растения? Понимание этой уникальной биологической особенности в перспективе приблизит человека к созданию азотфиксирующего аппарата у небобовых растений и позволит решить проблему

питания растений экологически чистым азотом [1, 2]. Полученные в настоящее время фундаментальные знания создают основу для решения этой проблемы. Однако существует еще много невыясненных вопросов, к которым можно отнести устойчивость бобового растения к проникновению ризобий и участие его врожденных иммунных систем в процессах инфицирования и функционирования N₂-фиксирующего аппарата в клубеньках, а также роль ризобияльных Nod-факторов в подавлении защитных систем растения-хозяина

[3]. Очевидно, что существуют общие молекулярные механизмы, определяющие взаимодействие растительно-бактериальных партнеров. Так, при взаимодействии растений с симбиотическими и патогенными микроорганизмами используются сходные химические сигналы, регуляторные системы и гены вирулентности. Поэтому можно предположить, что на начальных стадиях взаимодействия любые бактерии распознаются как «чужие», что приводит к инициации неспецифического ответа иммунной системы клеток растения [4]. Однако в случае симбиоза защитные реакции растения-хозяина не инициируются, что свидетельствует о снижении устойчивости растения по отношению к этим бактериям, которые, по видимому, блокируют или «обходят» защитные системы растения-хозяина [5, 6].

Таким образом, на начальных стадиях формирования бобово-ризобийный симбиоз имеет сходство с фитопатогенной системой, в становлении и развитии которой наряду с кальцием, фитогормонами и другими компонентами важную роль играют активные формы азота (АФА) [7], к которым относят прежде всего оксид азота (NO) – многофункциональную сигнальную молекулу, управляющую внутриклеточными и межклеточными процессами в животных, бактериальных и растительных организмах [8–11]. Однако имеющейся информации об инициации АФА-сигналинга, сенсорных и ответных механизмах и регуляции баланса между продукцией АФА и их обезвреживанием недостаточно. Также требует пристального внимания изучение механизмов взаимодействия NO с другими компонентами сигнальных систем, из которых следует выделить циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), который посредством увеличения уровня кальция может оказывать влияние на интенсивность образования оксида азота [12].

Поскольку все вторичные мессенджеры растений взаимосвязаны и образуют единую сигнальную сеть [13], целью настоящего исследования являлось изучение динамики концентрации двух сигнальных молекул – NO и цАМФ – в корнях проростков гороха при взаимодействии с патогенными и клубеньковыми бактериями.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования служили проростки гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Рондо, выращенные в кюветах на влажной фильтровальной бумаге при температуре 22 °С, в которых в течение часа с интервалом в 10 мин определяли содержание цАМФ и NO. В качестве контроля использовали нулевой отрезок времени. Для экспериментов использовали растения, выращенные на воде без инокуля-

ции, а также растения, инокулированные клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* эффективного производственного штамма CIAM 1022, отличающимися умеренной способностью колонизировать корневую систему растения-хозяина, образуя при этом хорошо развитые клубеньки, эффективно фиксирующие азот; неэффективного производственного штамма CIAM 1064, отличающимися тем, что более агрессивно колонизируют корневую систему растения-хозяина, что в свою очередь приводит к образованию на корнях растений гороха большого количества мелких недоразвитых клубеньков, не способных к азотфиксации; патогенными бактериями *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, вызывающими бактериальный ожог гороха.

Для определения уровня оксида азота использовали отрезки корней (3 шт.), взятые у исходных 2-х суточных проростков на расстоянии 5–15 мм от кончика корня. Перед окрашиванием исходные проростки прединкубировали на соответствующем варианту опыта средах в течение определенного периода времени. Затем отрезки помещали в среду для окрашивания (10 мМ Tris HCl буфер, pH = 7,4), содержащую 10 мкМ DAF-2DA (4,5-диаминофлуоресцеин диацетат). Отрезки окрашивали в течение 20 мин (инкубация на скалке при температуре 26 °С). Из окрашенных отрезков корней получали поперечные срезы (не менее 10) толщиной 100–150 мкм и анализировали их на флуоресцентном микроскопе Axio Observer Z1 (Германия) с цифровой монохромной камерой Axio CamMRm3 и пакетом программного обеспечения для захвата и анализа изображений «Axio Vision Rel.4.6» с использованием блока фильтров № 10 с длиной волны возбуждения 450–490 нм, эмиссией 515–565 нм. Интенсивность флуоресцентного свечения выражали в относительных единицах. Результаты исследований представлены в виде графиков, отображающих интенсивность флуоресцентного свечения в клетках.

Количество цАМФ определяли иммуноферментным анализом (ELISA) [14]. Белок в пробе определяли методом Брэдфорда.

Средние значения и их стандартные ошибки вычислены из трех независимых экспериментов, каждый из которых состоял из не менее трех биологических повторностей. Так как сравнение полученных результатов осуществлялось по средним значениям, достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из данных, представленных на рис. 1, у растений без инокуляции наблюдались колебания в уровне оксида азота, кото-

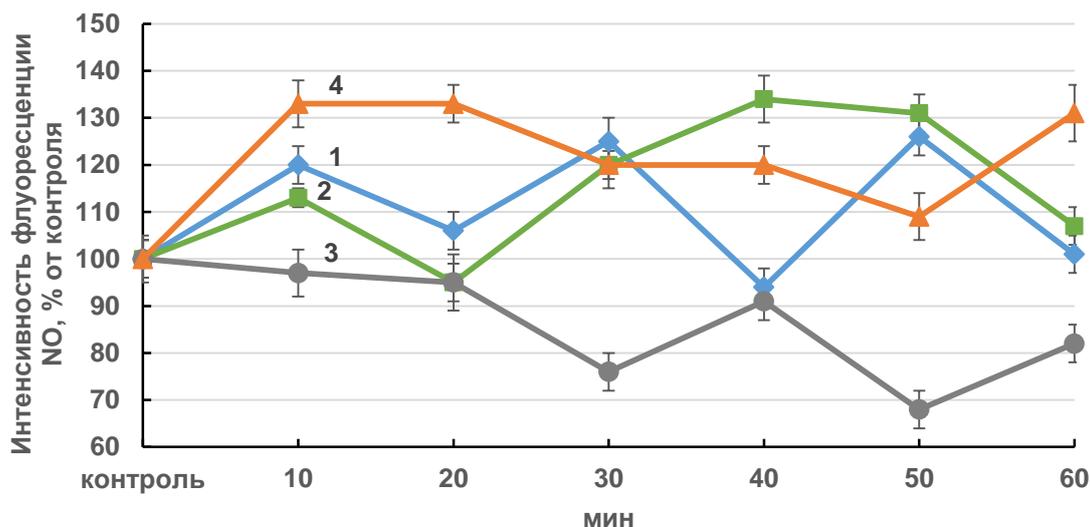


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции NO в корнях проростков гороха: 1 – выращенных на воде; 2 – инокулированных *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae* (CIAM 1022); 3 – инокулированных *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (CIAM 1064); 4 – зараженных *Pseudomonas syringae* pv. *Pisi*

Fig. 1. Fluorescence intensity of NO in the roots of pea seedlings: 1 – grown on water; 2 – inoculated by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (CIAM 1022); 3 – inoculated by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (CIAM 1064); 4 – infected by *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*

рые проявлялись в виде увеличения интенсивности флуоресценции NO через 10, 30 и 50 мин на 20, 25 и 26 % соответственно и снижения ее до уровня контроля через 20, 40 и 60 мин.

Клубеньковые бактерии эффективного производственного штамма также вызывали колебания в динамике NO, которые проявлялись в увеличении его концентрации через 10 и 40 мин и снижении до уровня контроля через 20 и 60 мин. При этом необходимо отметить, что в данном варианте в течение часа наблюдались два различающиеся по продолжительности и силе пика увеличения уровня NO. Первый (от 0 до 20 мин) с максимумом, приходящимся на 10 мин, когда свечение NO увеличилось на 13 % по сравнению с контролем. Второй пик был (от 20 до 60 мин) с максимумом, приходящимся на 40–50 мин, характеризовался большей продолжительностью по сравнению с первым, а также более плавным увеличением NO. При этом интенсивность флуоресценции оксида азота на пике увеличилась на 31–34 % по сравнению с контролем.

Неэффективный производственный штамм ризобий в течение первых 20 мин с начала эксперимента существенного влияния на уровень оксида азота в корнях проростков гороха не оказал. Начиная с 20 мин наблюдались ритмичные колебания в содержании NO, которые проявлялись в снижении свечения NO через 30 и 50 мин на 24 и 32 % соответственно и увеличении практически до уровня контроля через

40 и 60 мин.

Патогенные бактерии *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* в отличие от предыдущих вариантов вызывали резкое (на 33 % по сравнению с контролем) увеличение интенсивности флуоресценции NO в первые 20 мин взаимодействия. В промежутке от 20 до 50 мин уровень NO постепенно снижался – со 133 до 109 %, а к концу эксперимента снова увеличивался на 31 % по сравнению с контролем. Следует отметить, что по сравнению с симбиотическими бактериями при взаимодействии с патогеном содержание NO постоянно находилось на более высоком уровне.

Таким образом, сопоставив полученные результаты о влиянии симбиотических и патогенных бактерий, можно констатировать различное их воздействие на динамику уровня NO в корнях проростков гороха.

Наблюдаемые эффекты связаны, очевидно, с влиянием на растение определенных экзометаболических *Rhizobium* и *Pseudomonas*, которые активируют PAMP-иммунитет (pathogen-associated molecular patterns) клеток проростков гороха. В некоторых публикациях отмечается, что врожденный иммунитет растения играет существенную роль на ранних этапах бобово-ризобияльного взаимодействия [15–17]. У ризобий и бобовых растений основными участниками процесса «узнавания партнеров» являются ризобияльные липохитоолигосахариды (Nod-факторы), синтезирующиеся бактериями в результате экспрессии nod-генов, и

рецептор-подобные киназы (RLKs) бобовых растений. Бактериальный NF-сигналинг тесно взаимодействует с растительными сигнальными системами, в частности с NO-синтазой [18], вторичным мессенджером которой является оксид азота – молекула, обладающая широким спектром биологического действия [8]. Оксид азота уже в первые часы после взаимодействия ризобий и бобового растения обнаруживается в инфекционных нитях, тканях клубеньковой меристемы, в азотфиксирующих клубеньках [8, 9]. Есть данные, что NO может участвовать в регуляции образования клубеньков на корнях бобовых [10], но его высокие концентрации препятствуют инфицированию растений ризобиями и микоризой [11]. Также NO взаимодействует с другими биологическими веществами, например, фитогормонами и АФК [19]. Так, при фитопатогенезе NO совместно с АФК выполняет защитную функцию, формируя системную устойчивость, приобретенную на основе сверхчувствительной реакции клеток [20].

С учетом вышеизложенного можно предположить, что различная динамика интенсивности флуоресценции оксида азота в корнях проростков гороха на начальных этапах взаимодействия с симбиотическими и патогенными бактериями носит неспецифический характер и имеет различную функцию. Так, в случае с эффективным производственным штаммом ризобий, отличающимся умеренной способностью колонизировать растение-хозяина, увеличение концентрации NO связано с запуском механизма, отвечающего за регуляцию численности проникающих бактерий, что на заключительном этапе приводит к образованию оптимального количества клубеньков, которые способны эффективно усваивать атмосферный азот. И наоборот, в случае с более агрессивным штаммом ризобий снижение уровня NO приводит к неконтролируемой колонизации корневой системы, вследствие чего на корнях образуется большое число мелких клубеньков, не способных к азотфиксации. В случае с патогеном увеличение интенсивности флуоресценции оксида азота свидетельствует, очевидно, о запуске защитных реакций растения.

Также обращает на себя внимание период эксперимента от 0 до 20 мин, когда при инокуляции различными по степени вирулентности штаммами клубеньковых бактерий достоверных изменений уровня NO не наблюдалось в отличие от заражения патогеном, когда уровень оксида азота увеличивался с первых минут. Возможно, в этот период времени происходит «узнавание» микроорганизма и запуск соответствующей программы.

На основе анализа литературных данных

можно сделать вывод о том, что биохимическая генерация NO регулируется механизмами, в которых задействован кальций [21, 22]. Однако до конца непонятно, как Ca^{2+} модулирует поток NO в клетках [23]. Имеется ряд доказательств того, что одним из триггеров сигнальных событий в клетках растений при атаке патогенов является аденилатциклазная сигнальная система, когда в первую очередь под воздействием элиситоров активируется трансмембранная аденилатциклаза, что приводит к резкому и кратковременному возрастанию уровня цАМФ. Этот вторичный мессенджер, связываясь со специфическими сайтами нуклеотидрегулируемых ионных каналов, приводит к повышению концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , вызывая так называемую кальциевую волну [12]. В свою очередь вход ионов Ca^{2+} в цитоплазму оказывает влияние на генерацию АФА, которые функционируют как многоцелевой регулятор различных механизмов симбиотического процесса [19]. В связи этим немаловажно было установить, какое влияние оказывают симбиотические и патогенные бактерии на изменение уровня циклического аденозинмонофосфата в корнях проростков гороха. Полученные результаты представлены на рис. 2.

При выращивании проростков гороха на воде наблюдалось снижение уровня цАМФ на протяжении всего эксперимента в среднем на 35–40 %. При добавлении в среду инкубации клубеньковых бактерий эффективного производственного штамма CIAM 1022 ярко выраженных изменений в концентрации цАМФ не наблюдалось. В свою очередь на фоне инокуляции неэффективным производственным штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* (CIAM 1064) в период 30–50 мин происходило значительное увеличение уровня цАМФ (на 70 %). При заражении *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* цАМФ оставался на уровне контроля за исключением периода 20 мин, когда наблюдалось его увеличение на 30 %.

Таким образом, показано, что при взаимодействии как с симбиотическими, так и с патогенными бактериями уровень цАМФ увеличивался по сравнению с проростками без инокуляции, причем эти изменения приходились на различные периоды взаимодействия. Так, существенные различия в динамике цАМФ при контакте с эффективным штаммом клубеньковых бактерий наблюдались на 30-й мин эксперимента; самый высокий уровень цАМФ при взаимодействии с неэффективным штаммом ризобий отмечен в промежутке от 30 до 50 мин, а заражение патогеном приводило к повышению цАМФ, которое достигало своего максимума к 20 мин.

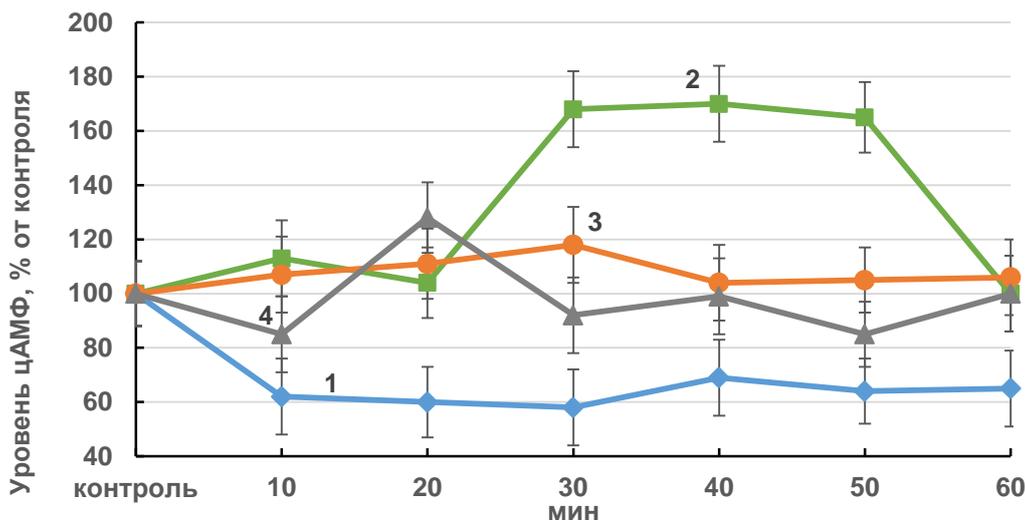


Рис. 2. Динамика уровня цАМФ в корнях проростков гороха: 1 – выращенных на воде; 2 – инокулированных *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* (CIAM 1022); 3 – инокулированных *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* (CIAM 1064); 4 – зараженных *Pseudomonas syringae* pv. *Pisi*

Fig. 2. Dynamics of cAMP level in the roots of pea seedlings: 1 – grown on water; 2 – inoculated by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* (CIAM 1022); 3 – inoculated by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* (CIAM 1064); 4 – infected by *Pseudomonas syringae* pv. *Pisi*

Так же, как и в предыдущих экспериментах по изучению уровня оксида азота, обращает на себя внимание тот факт, что в период от 0 до 20 мин существенных изменений уровня цАМФ при взаимодействии с ризобиями не наблюдалось, в то время как патоген вызывал повышение концентрации цАМФ с первых минут. Основные отличия происходили после 20 мин эксперимента.

По литературным данным, повышение концентрации внутриклеточного цАМФ при биотических стрессах носит защитный характер и позволяет растениям активировать соответствующие молекулярные механизмы [13]. В связи с этим повышение концентрации цАМФ под влиянием неэффективного штамма ризобий вполне логично и является механизмом, предотвращающим избыточную колонизацию корневой системы растения-хозяина. Пониженный уровень цАМФ при инокуляции эффективным штаммом клубеньковых бактерий также выполняет регуляторную функцию, поскольку снижение концентрации цАМФ не при-

водит к включению защитных реакций и позволяет бактериям проникать в клетки корня. Что же касается взаимодействия с *Pseudomonas syringae* pv., то пониженный уровень цАМФ свидетельствует о степени вирулентности патогена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, по результатам исследования можно отметить следующие закономерности:

1) под воздействием *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* (симбионт) и *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (патоген) обнаружен эндогенный ритм изменения содержания цАМФ и NO в тканях корня проростков гороха;

2) предполагается, что изменение соответствующих компонентов сигнальных систем (NO, цАМФ) может быть использовано растением-хозяином в качестве «кода» для передачи сигнала о природе действующего фактора и индукции соответствующих реакций на молекулярном уровне.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Beatly P.H., Good A.G. Future prospects for cereals that fix nitrogen // Science. 2011. Vol. 333. Issue 6041. P. 416–417. <https://doi.org/10.1126/science.1209467>
2. Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза. СПб: Изд-во ООО «Информ-Навигатор», 2012. 400 с.
3. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О.,

Луговая А.А. Сигнальные посредники в реализации физиологических эффектов стрессовых фитогормонов // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия Биология. 2016. Вып. 1 (37). С. 42–62.

4. Глянько А.К., Ищенко А.А. Активные формы кислорода и азота – возможные медиаторы системной устойчивости у бобовых при действии ризобийной инфекции // Вестник

Харьковского национального аграрного университета. Серия Биология. 2017. Вып. 1 (40). С. 9–20.

5. Djordjevic M.A., Gabriel D.W., Rolfe B.G. Rhizobium-The Refined Parasite of Legumes // Annual Review of Phytopathology. 1987. Vol. 25. P. 145–168. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.25.090187.001045>

6. Baron C., Zambryski P.C. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? // Annual Review of Genetics. 1995. Vol. 29. P. 107–129. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.29.120195.000543>

7. Glyan'ko A.K., Ishchenko A.A. Immunity of a leguminous plant infected by nodular bacteria *Rhizobium* spp. F.: review // Applied Biochemistry and Microbiology. 2017. Vol. 53. Issue 2. P. 140–148. <https://doi.org/10.1134/S0003683817020107>

8. Meilhoc E., Boscari A., Bruand C., Puppo A., Brouquisse R. Nitric oxide in legume-rhizobium symbiosis // Plant Science. 2011. Vol. 181. Issue 5. P. 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.007>

9. Baudouin E., Pieuchot L., Engler G., Pauly N., Puppo A. Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium meliloti* functional nodules // Molecular plant-microbe Interactions. 2006. Vol. 19. Issue 9. P. 970–975. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0970>

10. Herouart D., Baudouin E., Frendo P., Harrison J., Santos R., Jamet A., et al. Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: key role in the establishment of the legume-Rhizobium symbiosis // Plant physiology and biochemistry. 2002. Vol. 40. Issue 6-8. P. 619–624. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01415-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01415-8)

11. Meyer C., Lea U.S., Provan F., Kaizer W.M., Lillo C. Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? // Photosynthesis research. 2005. Vol. 83. P.181–189. <https://doi.org/10.1007/s11120-004-3548-3>

12. Lomovatskaya L.A., Kuzakova O.V., Romanenko A.S., Goncharova A.M. Activities of Adenylate Cyclase and Changes in cAMP Concentration in Root Cells of Pea Seedlings Infected with Mutualists and Phytopathogens // Russian Journal of Plant Physiology. 2018. Vol. 65. Issue 4. P. 588–597. <https://doi.org/10.1134/S1021443718030056>

13. Kuzakova O.V., Lomovatskaya L.A., Goncharova A.M., Romanenko A.S. Effects of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* strains different in their symbiotic effectiveness on changes in cAMP and hydrogen peroxide concentrations in cells of pea seedlings // Russian Journal of Plant Physiology. 2019. Vol. 66. Issue 5. P. 712–717. <https://doi.org/10.1134/S1021443719050121>

14. Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V., Dudareva L.V. Determination of cAMP in plant cells by a modified enzyme immunoassay method // Plant Cell Reports. 2011. Vol. 30. Issue 1. P. 125–132. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0950-5>

15. Jones K.M., Sharopova N., Lohar D.P., Zhang J.Q., VandenBosch K.A., Walker G.C. Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2008. Vol. 105, Issue 2. P. 704–709. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709338105>

16. Ferguson B.J., Indrasumunar A., Hayashi S., Lin Y.-R., Lin Y.-H., Reid D.E., et al. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation // Journal of Integrative Plant Biology. 2010. Vol. 52. P. 61–76. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x>

17. Gough C., Jacquet C. Nod factor perception protein carries weight in biotic interaction // Trends in Plant Sciences. 2013. Vol. 18. Issue 10. P. 566–574. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.06.001>

18. Глянько А.К. Фитогормоны и клубенькообразование у бобовых растений // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия Биология. 2015. Вып. 3 (36). С. 6–19.

19. Hichri I., Boscari A., Castella C., Rovere M., Puppo A., Brouquisse R. Nitric oxide: a multifaceted regulator of the nitrogen-fixing symbiosis // Journal of experimental botany. 2015. Vol. 66. Issue 10. P. 2877–2887. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv051>

20. Глянько А.К., Митанова Н.Б., Степанов А.В. Физиологическая роль оксида азота (NO) у растительных организмов // Журнал стресс-физиологии и биохимии. 2009. Т. 5. N 3. С. 33–52.

21. Courtois C., Besson A., Dahan J., Bourque S., Dobrowolska G., Alain P., et al. Nitric oxide signaling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases // Journal of Experimental Botany. 2008. Vol. 59. Issue 2. P. 155–163. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm197>

22. Jeandroz S., Lamotte O., Astier J., Rasul S., Trapet P., Besson-Bard A., et al. There's more to the picture than meets the eye: nitric oxide cross talk with Ca²⁺ signaling // Plant Physiology. 2013. Vol. 163. Issue 2. P. 459–470. <https://doi.org/10.1104/pp.113.220624>

23. Глянько А.К. Роль Nod-фактора *Rhizobium* в индукции сигнальных систем растения при формировании бобово-ризобияльного симбиоза // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия Биология. 2014. Вып. 3 (33). С. 6–14.

REFERENCE

1. Beatly PH, Good AG. Future prospects for cereals that fix nitrogen. *Science*. 2011;333(6041):416–417. <https://doi.org/10.1126/science.1209467>
2. Provorov NA, Vorob'ev NI. *Genetic basis of the evolution of plant-microbial symbiosis*. St. Petersburg: Inform-Navigator; 2012. 400 p. (In Russian)
3. Kolupaev YuE, Karpets YuV, Yastreb TO, Lugovaya AA. Signal mediators in realization of physiological effects of stress phytohormones. *Vestnik Khar'kovskogo nacional'nogo agrarnogo universiteta. Seriya Biologiya = The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology*. 2016;1:42–62. (In Russian)
4. Glyan'ko AK, Ishchenko AA. Reactive oxygen and nitrogen species as possible mediators of system resistance in fabaceae affected by rhizobial infection. *Vestnik Khar'kovskogo nacional'nogo agrarnogo universiteta. Seriya Biologiya = The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology*. 2017;1:9–20. (In Russian)
5. Djordjevic MA, Gabriel DW, Rolfe BG. Rhizobium-The Refined Parasite of Legumes. *Annual Review of Phytopathology*. 1987;25:145–168. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.25.090187.001045>
6. Baron C, Zambbryski PC. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? *Annual Review of Genetics*. 1995;29:107–129. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.29.120195.000543>
7. Glyan'ko AK, Ishchenko AA. Immunity of a leguminous plant infected by nodular bacteria *Rhizobium* spp. F.: review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017;53(2):140–148. <https://doi.org/10.1134/S0003683817020107>
8. Meilhoc E, Boscan A, Bruand C, Puppo A, Brouquisse R. Nitric oxide in legume-rhizobium symbiosis. *Plant Science*. 2011;181(5):573–581. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.007>
9. Baudouin E, Pieuchot L, Engler G, Pauly N, Puppo A. Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium meliloti* functional nodules. *Molecular plant-microbe Interactions*. 2006;19(9):970–975. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0970>
10. Herouart D, Baudouin E, Frendo P, Harrison J, Santos R, Jamet A, et al. Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: key role in the establishment of the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant physiology and biochemistry*. 2002;40(6-8):619–624. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01415-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01415-8)
11. Meyer C, Lea US, Provan F, Kaizer WM, Lillo C. Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosynthesis research*. 2005;83:181–189. <https://doi.org/10.1007/s11120-004-3548-3>
12. Lomovatskaya LA, Kuzakova OV, Romanenko AS, Goncharova AM. Activities of Adenylate Cyclase and Changes in cAMP Concentration in Root Cells of Pea Seedlings Infected with Mutualists and Phytopathogens. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2018;65(4):588–597. <https://doi.org/10.1134/S1021443718030056>
13. Kuzakova OV, Lomovatskaya LA, Goncharova AM, Romanenko AS. Effects of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* strains different in their symbiotic effectiveness on changes in cAMP and hydrogen peroxide concentrations in cells of pea seedlings *Russian Journal of Plant Physiology*. 2019;66(5):712–717. <https://doi.org/10.1134/S1021443719050121>
14. Lomovatskaya LA, Romanenko AS, Filinova NV, Dudareva LV. Determination of cAMP in plant cells by a modified enzyme immunoassay method. *Plant Cell Reports*. 2011;30(1):125–132. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0950-5>
15. Jones KM, Sharopova N, Lohar DP, Zhang JQ, VandenBosch KA, Walker GC. Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2008;105(2):704–709. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709338105>
16. Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin Y-R, Lin Y-H, Reid DE, et al. Molecular analysis of legume nodule development and auto-regulation. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2010;52:61–76. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x>
17. Gough C, Jacquet C. Nod factor perception protein carries weight in biotic interaction. *Trends Plant Sciences*. 2013;18(10):566–574. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.06.001>
18. Glyan'ko AK. Phytohormones and nodulation at leguminous plants. *Vestnik Khar'kovskogo nacional'nogo agrarnogo universiteta. Seriya Biologiya = The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology*. 2015;3:6–19. (In Russian)
19. Hichri I, Boscari A, Castella C, Rovere M, Puppo A, Brouquisse R. Nitric oxide: a multifaceted regulator of the nitrogen-fixing symbiosis. *Journal of experimental botany*. 2015;66(10):2877–2887. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv051>
20. Glyan'ko AK, Mitanova NB, Stepanov AV. Physiological role of nitric oxide (NO) at vegetative organisms. *The Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2009;5(3):33–52. (In Russian)
21. Courtois C, Besson A, Dahan J, Bourque S, Dobrowolska G, Alain P, et al. Nitric oxide signaling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases. *Journal of Experimental Botany*. 2008;59(2):155–163. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm197>
22. Jeandroz S, Lamotte O, Astier J, Rasul S,

Trapet P, Besson-Bard A, et al. There's more to the picture than meets the eye: nitric oxide cross talk with Ca²⁺ signaling. *Plant Physiology*. 2013;163(2):459–470. <https://doi.org/10.1104/pp.113.220624>

23. Gyan'ko AK. Significance of Nod factors

Критерии авторства

Ищенко А.А., Филинова Н.В., Сидоров А.В. выполнили экспериментальную работу. Авторы совместно обобщили результаты, написали рукопись, имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ищенко Алексей Александрович,
к.б.н., научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
e-mail: aspt25@yandex.ru

Филинова Надежда Владимировна,
к.б.н., научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
e-mail: Filinova@sifibr.irk.ru

Сидоров Александр Владимирович,
ассистент,
Иркутский государственный медицинский
университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
e-mail: a.v.sidorov@ismu.baikal.ru

Rhizobium in induction of signaling systems at formation of legume-rhizobia symbiosis. *Vestnik Khar'kovskogo nacional'nogo agrarnogo universiteta. Seriya Biologiya* = The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology. 2014;3:6–14. (In Russian)

Contribution

Aleksei A. Ishchenko, Nadezhda V. Filinova, Aleksandr V. Sidorov carried out the experimental work. The authors on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. All authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Aleksei A. Ishchenko,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: aspt25@yandex.ru

Nadezhda V. Filinova,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: Filinova@sifibr.irk.ru

Aleksandr V. Sidorov,
Assistant,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: a.v.sidorov@ismu.baikal.ru