

УДК 581.1

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ КАЛЬЦИЕВОЙ, НАДФН-ОКСИДАЗНОЙ И NO- СИНТАЗНОЙ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА

© 2014 г. А. К. Глянько, Г. Г. Васильева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Сибирский институт физиологии и биохимии растений

Сибирского отделения Российской академии наук

(Иркутск, Россия)

Обобщены литературные и собственные данные об участии и взаимосвязи компонентов кальциевой, НАДФН-оксидазной и NO-синтазной сигнальных систем на преинфекционной и инфекционной стадиях становления бобово-ризобияльного симбиоза. Детально рассмотрена физиологическая роль АФК, кальция, НАДФН-оксидазы и оксида азота и их перекрестное влияние на процессы, определяющие формирование симбиотических структур на корнях растения-хозяина.

Ключевые слова: *бобово-ризобияльный симбиоз, активные формы кислорода, кальций (Ca^{2+}), НАДФН-оксидаза, оксид азота (NO)*

Бобово-ризобияльный симбиоз представляет собой мутуалистическое взаимодействие систематически удалённых друг от друга организмов: бобовых растений (*Fabaceae*) (макросимбионт) и клубеньковых бактерий (*Rhizobium* – (ризобии) – микросимбионт). На всех этапах становления и развития данного симбиоза от преинфекционной стадии и до деградации клубенька происходит обмен сигналами между симбиотическими партнёрами. Среди сигнальных систем, принимающих участие в формировании симбиоза, важная роль принадлежит кальциевой, НАДФН-оксидазной и NO-синтазной сигнальным системам (Васильева и др., 2011).

Обмен сигналами (сигналинг) на преинфекционной стадии симбиоза

Необходимой предпосылкой для инфекции и клубенькообразования (нодуляции) бобовых растений является прикрепление ризобий к кончику (верхушке) растущей клетки корневого волоска. У адсорбированных на поверхности

корня бактерий под влиянием специфических для ризобий растительных флавоноидов, выделяемых корнями в ризосферу, инициируется экспрессия бактериальных *nod*-генов, конечными продуктами которых являются сигнальные молекулы – липохитоолигосахариды, получившие название ризобияльных Nod-факторов (NF). Эти сигналы воспринимаются эпидермальными клетками растения, на плазмалемме которых, как предполагают, локализованы рецепторы Nod-фактора(ов) – рецептор-подобные киназы (receptor-like kinases, RLK). Одна из них – белок LysM RLK, содержит внеклеточные лизиновые мотивы (LysM), другая – leucine rich repeat (LRR RLK), богата лейциновыми повторами (Ferguson et al., 2010). Так, у *Lotus japonicum* такими рецепторами типа LysM являются протеинкиназы NFP5 и NFP1, у гороха – SYM10/SYM2, у люцерны – LYK3/LYK4 (Oldroyd, Downie, 2008). Примерами LRR RLK белков у *Lotus japonicum* являются SYMRK, у люцерны DMI2 (Popp, Ott, 2011).

Наличие двух (или более?) рецепторов в эпидермальных клетках объясняется их разной ролью в инициации включения сигнальных путей, ведущих к инфицированию растения ризобиями и образованию корневых клубеньков (Limpens et al., 2003; 2006; Madsen et al., 2003;

Адрес для корреспонденции: Глянько Анатолий Константинович, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, а/я 317, Иркутск, 664033, Россия; e-mail: akglyanko@sifibr.irk.ru

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ КАЛЬЦИЕВОЙ

Radutoiu et al., 2003; Arrighi et al., 2006). Предполагают, что LRR RLK участвует в первоначальной инициации путей бактериальной инвазии (скручивание корневых волосков, образование инфекционных нитей), а LysM RLK может играть ключевую роль в дальнейшем развитии сигнального каскада, ведущего к органогенезу клубеньков в клетках коры и перидикла. Но в то же время активация LysM RLK является необходимым условием для функционирования LRR RLK (Ferguson et al., 2010).

Молекулярный скелет NF представляет хитоолигосахарид (N-ацетил-D-глюкозамин), который является элиситором у грибных патогенов и инициирует защитные реакции у растений. Бобовые растения отличают бактериальные липохитоолигосахариды от хитоолигосахаридов, по-видимому, за счет того, что основной скелет NF имеет модификации, различающиеся у разных видов ризобий главным образом длиной и степенью насыщенности боковых остатков жирных кислот (Gough, Cullimore, 2011). Поэтому считают, что боковые цепи NF специфически реагируют с RLK бобовых растений и этот молекулярный комплекс двух организмов осуществляет трансдукцию сигнала, блокирующего включение защитных реакций бобовых растений, и направляющего метаболизм организмов на мутуалистическое сожительство (Gough, Cullimore, 2011). Таким образом, процесс узнавания молекул NF и RLK является необходимым условием для запуска генетических программ инфекции и нодуляции корней бобовых растений.

Взаимодействие NF и RLK вызывает такие преинфекционные ответы растения-хозяина как перестройка цитоскелета, защелачивание цитоплазмы, набухание и скручивание кончика корневого волоска, формирование в наружных кортикальных клетках (кортексе) радиально направленных цитоплазматических мостиков, называемых преинфекционными нитями. Далее на деформированном корневом волоске образуется бактериальная микроколония, осуществляющая локальный гидролиз клеточной стенки корневого волоска, что даёт возможность ризобиям инфицировать клетки корня бобового растения.

Обмен сигналами на стадии ризобияльной инфекции

После локального гидролиза клеточной стенки корневого волоска последний прекращает наружный рост и начинает расти внутрь, образуя трубчатую инвагинацию клеточной стенки и мембраны – инфекционную нить (in-

fection thread) (IT), в которой(ых) бактерии размножаются и перемещаются к клеткам кортекса. Формирование IT скоординировано с морфогенезом клубенька в противолежащих кортикальных клетках. Участие NF-сигналинга в этих событиях доказано в опытах с мутантными организмами (Gough, Cullimore, 2011). Были охарактеризованы определённые гены, вовлечённые в NF-сигналинг и транскрипционные факторы (например, белки NIN, RPG, ERN, CYCLOPS, CERBERUS), необходимые для инфекции и формирования примордия (зачатка) клубенька, а также идентифицированы гены, которые играют прямую роль в инфицировании, актиновой перестройке, синтезе ранних белков-нодулинов (ENODs), секреции и других событиях (Ferguson et al., 2010). Доказано, что в инициации деления кортикальных клеток корня и образования примордия клубенька принимает участие цитокинин, рецептор которого – гистидинкиназа (MtCRE1/LjHK1) активируется кальций-кальмодулинкиназой (CCaMK) (Ferguson et al., 2010). Кроме того, связывание цитокинина с рецептором усиливает синтез раннего симбиотического белка Enod40, играющего важную роль в образовании примордия клубенька (Batut et al., 2011).

Инфицирование ризобиями может происходить и другим путем – через трещины на поверхности корневых клеток. В этом случае участие Nod-сигнальной системы (как в случае инфекции через корневую волосок) может быть ограничено. Однако роль ризобий и их NF в этом случае может быть связана с модификацией гормонального ответа растения при образовании меристемы клубенька и регуляцией изменений в генном аппарате растения-хозяина (Oldroyd, Downie, 2008).

При прохождении этапов инфицирования и развития клубенька, также как и на преинфекционной стадии, могут индуцироваться определённые защитные ответы растения (Vasse et al., 1993; Gamas et al., 1998). Показано, что у люцерны многие IT прерывают рост даже при совместимых симбиотических взаимоотношениях вследствие развития сверхчувствительной реакции в клетках коры корня (Vasse et al., 1993). У гороха защитный ответ более выражен при несовместимом взаимодействии с микросимбионтом, что, по-видимому, связано с ограничением распространения ризобияльной инфекции (Perotto et al., 1994). Следует отметить, что ризобияльная инфекция также вызывает системную передачу сигналов на длинные дистанции, что связано, очевидно, с формиро-

ванием системной устойчивости. Такой эффект показан в работе Васильевой (2004) по увеличению содержания $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 в эпикотильях проростков гороха в ответ на инокуляцию ризобиями. Волновая природа функционирования АФК (H_2O_2) в растительных клетках доказана в работах Miller et al. (2009) и Mittler et al. (2011), где показано на генетическом уровне наличие в клетках арабидопсиса АФК-волн, выполняющих функцию системного сигнала на длинные дистанции – от одной клетки к другой и от одного органа к другому, связанного с формированием системной устойчивости к действию стрессора. Главную роль в этих процессах играет НАДФН-оксидаза (RbohD-oxidase) – генератор АФК, активность которой связана с Ca^{2+} -сигналом и Ca^{2+} -регулируемыми киназами (Steinhorst, Kudle, 2013). Исходя из этого, можно, вероятно, говорить о ризобияльной инфекции как о внешнем факторе, вызывающем формирование системной устойчивости против нежелательных для растения внешних воздействий.

Роль кальциевой сигнальной системы на ранних стадиях симбиоза

Большинство бобовых растений являются кальциефилами наряду с такими растениями как гречиха, подсолнечник, картофель, капуста, конопля. Это не случайно, так как в настоящее время Ca^{2+} рассматривается как универсальный регулятор клеточных функций и изменение его уровня в клетке служит триггером для многих физиологических ответов. Ионы кальция принимают участие в регуляции вязкости протоплазмы, состояния цитоскелета, прооксидантно-антиоксидантного равновесия, оказывают влияние на структуру мембран, ионные потоки и биоэлектрические явления. Ca^{2+} влияет на проницаемость мембран, движение цитоплазмы, активность ферментов, секрецию, деление клеток и играет ведущую роль в регуляции жизненно важных процессов, связанных с развитием и дифференциацией клеток, трансдукцией гормональных сигналов, тропизмами, запрограммированной гибелью клеток и устойчивостью растений к стрессовым воздействиям (Bolwer, Fluhr, 2000; Колупаев, 2007; Медведев, 2010).

Метаболическая функция кальция как вторичного мессенджера при проведении экзогенных и эндогенных сигналов была сформулирована в начале 80-х годов прошлого столетия (Rasmussen, 1981) и его ключевая роль как универсального триггера клеточных реакций растительных и животных организмов в насто-

ящее время не вызывает сомнений (Kaur, Gupta, 2005; Медведев, 2005, 2010; Колупаев, 2007). Доказано, что цитозольный кальций является составной частью общей сигнальной системы и эффективным регулятором процессов обмена веществ у растений.

При бобово-ризобияльном симбиозе NF вызывает быстрый (спустя 1 мин после воздействия NF) транспорт ионов кальция в цитозоль через плазматическую мембрану (Shaw, Long, 2003a). В результате происходит деполяризация плазмалеммы и отток ионов хлора и калия из цитоплазмы клеток корневых волосков (Cardenas et al., 2000). Таким образом, кальциевая сигнальная система участвует в рецепции симбиотических сигналов на самых ранних стадиях взаимодействия симбионтов. Следует отметить, что повышение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме – одна из самых ранних реакций клетки и на различные абиотические и биотические стрессоры. Очевидно, что растение-хозяин первоначально реагирует на ризобии как на стрессор, но затем в процессе «узнавания» снимает защитный механизм.

Инициация функционирования кальциевой сигнальной системы под влиянием цитоплазматического Ca^{2+} носит кратковременный характер: быстрый Ca^{2+} -поток имеет место в пределах только 5 мин после обработки очищенным NF (10^{-8} M) (Shaw, Long, 2003a). Затем Ca^{2+} -поток быстро сменяется снижением его содержания, что является, по-видимому, необходимым условием для функционирования этой сигнальной системы.

Повышение концентрации кальция в цитоплазме сменяется колебаниями в его уровне, что проявляется в виде спайков (calcium spiking): одиночных колебаний уровня ионов кальция, осцилляций (повторяющихся спайков в виде ритмических изменений концентрации кальция в цитоплазме и органеллах) и распространяющихся по клетке Ca^{2+} -волн. В последнее время это явление в литературе обозначается термином « Ca^{2+} -сигнатура» (calcium signatures), который характеризует флуктуации в концентрации внутриклеточного кальция по таким параметрам как: амплитуда, частота, количество пульсов (Whalley, Knight, 2013). Эти процессы осуществляются за счет мембранного транспорта, активации вторичных посредников (Ca^{2+} -связывающих белков, например Ca^{2+} -АТФазы, киназ, белков-сенсоров) и других процессов (Медведев, 2010). Особую роль в этом выполняют кальмодулин и протеинкиназы, зависимые от Ca^{2+} и осуществляющие фос-

форилирование белков – факторов регуляции транскрипции (Тарчевский, 2002).

Осцилляции в концентрации цитозольного Ca^{2+} наблюдаются спустя минуты после индукции потока Ca^{2+} (приблизительно через 10-15 мин после воздействия NF) (Ehrhard et al., 1996). Следует отметить, что для индукции потока Ca^{2+} в цитоплазму и Ca^{2+} -спайков требуются разные концентрации NF: в первом случае на 2-3 порядка выше, чем во втором (Shaw, Long, 2003a). Это может свидетельствовать о разной чувствительности NF к растительным рецепторам, ответственным за включение процессов, модулирующих сигнальные функции кальция.

Спайки происходят с участием белков ионных каналов (CASTOR, POLLUX) и нуклеопоринов (NUP85, NUP133), а активация Ca^{2+} -кальмодулинзависимой киназы (ССаМК) инициируется ритмическими изменениями концентрации Ca^{2+} в цитоплазме и органеллах. Мутация по Ca^{2+} -спайкам ингибирует органогенез клубеньков у *L. japonicus*, который снимается предварительно активированной формой ССаМК (Hayashi et al., 2010). Подобные флуктуации в концентрации Ca^{2+} вызывают (с участием активированной ССаМК) фосфорилирование белков – транскрипционных факторов, дальнейшую трансдукцию NF-сигнала, ведущего к экспрессии симбиотических генов в ядре.

Однако взаимодействие Nod-фактора с растительным рецептором на поверхности эпидермальных клеток корневого волоска происходит по меньшей мере по двум сигнальным путям: в один из них вовлечены Ca^{2+} -спайки, что ведет к экспрессии генов, синтезу белков-нодулинов и морфогенезу клубенька. В другом, связанном с деформацией корневого волоска, Ca^{2+} -спайки не участвуют (Miwa et al., 2006). В первом сигнальном пути (NSP 1/2), ведущем к синтезу белков-нодулинов в эпидермисе и делению кортикальных клеток, участвуют NF, LysM-RLK, Ca^{2+} -спайки, ССаМК, NIN (транскрипционный фактор), цитокинин, гистидинкиназа (MtCRE1/LjHK1). Второй путь инициируется NF и LRR-RLK (Oldroyd, Downie, 2008). В работе Miwa et al. (2006) с применением мутантов проведен генетический анализ сигнальных симбиотических путей (NSP1/2) у *L. japonicus* и проанализированы гены, участвующие в инициации Ca^{2+} -потока в цитоплазму и возникновении Ca^{2+} -спайков. Показано, что только два гена (*Nfr1* и *Nfr5*) под воздействием NF инициируют поток кальция в цитоплазму, деформацию корневого волоска и инфекцию.

Экспрессия других пяти генов (*SymRK*, *Castor*, *Pollux*, *Nur133*, *Sym24*) ведет к возникновению кальциевых осцилляций, активированию кальций-кальмодулинзависимой киназы, синтезу NIN-белка и морфогенезу клубенька.

Хотя функции кальция и активных форм кислорода (АФК) в растительном организме изучены достаточно хорошо, остаётся много неясного относительно взаимодействия этой сигнальной молекулы с другими сигнальными посредниками, например, АФК и активными формами азота – АФА, на начальных этапах бобово-ризобиального симбиоза (Глянько, Васильева, 2010; Колупаев, Карпец, 2010).

Роль активных форм кислорода

Литературные и наши собственные данные свидетельствуют о том, что кроме ионов кальция сигнальную роль на ранних этапах симбиоза могут играть АФК, такие как супероксидный анион-радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), пероксид водорода (H_2O_2) и др. (Shaw, Long, 2003a; Pauly et al., 2006; Васильева и др., 2011). Ca^{2+} как вторичный мессенджер связан в растениях с АФК в сигнальном трансдукционном пути (Sama et al., 2004). Считается, что АФК, наряду с жасмоновой кислотой и этиленом, являются отрицательными регуляторами формирования бобово-ризобиального симбиоза (Ferguson, Mathesius, 2003). Эти соединения принимают участие в защитных реакциях растения-хозяина, поскольку первоначально ризобии могут узнаваться как патогены, но затем они преодолевают защитный ответ бобового растения. Показано, что у гороха защитный ответ растения-хозяина более выражен при несовместимом ризобиальном взаимодействии, что, по-видимому, связано с ограничением распространения ризобиальной инфекции (Perotto et al., 1994). Тем не менее ризобиальная инфекция способна регулировать содержание цитотоксических соединений, например, пероксида водорода и оксида азота в корнях. Так, по данным Митановой (2010), пик в накоплении пероксида водорода при инокуляции проростков гороха ризобиями наблюдается спустя 30 мин после инокуляции, а в последующие экспозиции (1, 2, 6, 24 и 48 ч) содержание пероксида водорода в корнях снижается и не отличается от контроля. Анализируя эти данные, следует отметить, что резкое повышение содержания H_2O_2 (в 2,6 раза) через 30 мин после воздействия на корни ризобий, по-видимому, характеризует неспецифическую реакцию растения на патогенные и симбиотические микроорганизмы. При более длительном воздействии биотических факторов

наблюдается, по-видимому, специфическая реакция организма, характеризующая либо усилением синтеза АФК растением (как при действии авирулентного патогена), либо уменьшением синтеза – как в случае вирулентного патогена и симбиотических бактерий. В последнем случае растение-хозяин «узнает» микроорганизмы как «свои» и «снимает» защитные барьеры, «позволяя» ризобиальное инфицирование.

Определённые защитные ответы растения индуцируются и во время развития клубенька (Gamas et al., 1998). Показано, что у люцерны многие ИТ прерывают рост даже при совместимых симбиотических взаимоотношениях вследствие развития сверхчувствительной реакции в клетках коры корня (Vasse et al., 1993).

Многочисленные исследования по вовлечению АФК в сигналинг растений также подтверждают их взаимосвязь с Ca^{2+} (Jabs et al., 1997; Blume et al., 2000; Pei et al., 2000; Baxter-Burrell et al., 2002; Foreman et al., 2003; Kwak et al., 2003). Показано, что АФК активируют Ca^{2+} -каналы, которые вовлекаются в установление апикального кальциевого градиента (Potocky et al., 2007; Coelho et al., 2008) и являются сигнальным механизмом, ведущим к полярному росту корневого волоска (Foreman et al., 2003; Mori and Schroeder, 2004). Обнаружено, что раннее образование и распределение АФК тесно связано не только с Ca^{2+} -сигналингом, но и с АТФ в корневых волосках бобовых (Cardenas et al., 2008).

Взаимосвязь между АФК и Ca^{2+} неоднозначна. Как доказано с использованием мутанта люцерны *dmi*, Ca^{2+} -осцилляции не требуются для модуляции АФК или деформации корневого волоска (Catoira et al., 2000; Shaw, Long, 2003a; Shaw, Long, 2003b; Esseling et al., 2004; Lohar et al., 2007). Быстрый Ca^{2+} -поток имеет место в пределах только 5 мин после обработки NF (10^{-8} М) (Shaw, Long, 2003a) и происходит намного раньше, чем начинается модуляция АФК в корнях (через 20–40 мин после обработки NF) (Shaw, Long, 2003b; Lohar et al., 2007). Таким образом, модуляция Ca^{2+} -потока не совпадает по времени с модуляцией АФК и деформацией корневого волоска при бобово-ризобиальном симбиозе.

Есть результаты опытов, в которых кальций вызывает генерацию АФК, в других опытах АФК способствуют выходу Ca^{2+} в цитозоль. Возможно взаимное усиление действия АФК и кальция как мессенджеров единой сигнальной системы (Медведев, 2005; Колупаев, 2007). При бобово-ризобиальном симбиозе роль этих со-

единений, по-видимому, сводится прежде всего к регуляции процессов метаболизма растения, обусловленных перестройкой обмена веществ на уровень мутуалистического взаимодействия и недопущения включения защитных реакций против симбиотического партнера – ризобий.

Одним из важных источников генерации АФК в растениях является НАДФН-оксидаза, локализованная на плазматической мембране клетки. Ингибирование активности этого фермента ведет не только к уменьшению генерации АФК, но и к торможению образования ИТ при симбиотических отношениях люцерны и *Sinorhizobium meliloti* (Peleg-Grossman et al., 2007; Cardenas et al., 2008).

Связь НАДФН-оксидазы с кальциевой сигнальной системой и АФК

Усиление Ca^{2+} -сигнала происходит и за счет его связывания с различными белками, которые после этого способны осуществлять ионный транспорт, регуляторные и другие функции, поддерживать низкий уровень Ca^{2+} в органеллах клетки и др. Количество Ca^{2+} -связывающих белков в растениях достаточно велико: у арабидопсиса их более 150 (Reddy, 2001). Один из таких белков НАДФН-оксидаза (КФ 1.6.99.6) – стартовый фермент НАДФН-оксидазной сигнальной системы, связывающий, по крайней мере, два звена: генерацию АФК и потоки Ca^{2+} (Sagi, Fluhr, 2006). Мембранная субъединица растительной НАДФН-оксидазы обозначается как Rboh (respiratory burst oxidase homologs) и является гомологом β -субъединицы (*gp91^{phox}*) НАДФН-оксидазы фагоцитов. N-концевой участок Rboh связывает ионы Ca^{2+} с помощью двух мотивов (EF-рука). Предполагается, что цитозольные потоки кальция активируют кальций-зависимые протеинкиназы (CDPK), которые фосфорилируют N-терминальный участок Rboh и тем самым активируют фермент и генерацию АФК (Kobayashi et al., 2006; Kimura et al., 2012). Все это дает возможность говорить о регулирующей роли Ca^{2+} и АФК в активности НАДФН-оксидазы растений (Глянько, Ищенко, 2010б).

НАДФН-оксидаза, локализованная на плазматической мембране, активируется при действии на организмы абиотических и биотических факторов (Глянько и др., 2010а). Образовавшиеся в результате активации этого фермента АФК защищают растение от патогенов путем участия в реакции сверхчувствительности клеток, системной приобретенной и индуцированной устойчивости, в укреплении клеточной стенки как механического барьера на

пути инфекции (Sagi, Fluhr, 2001; Marino et al., 2012).

В отличие от патогенного воздействия на растительный организм, роль НАДФН-оксидазы и связанного с ее функциональной активностью кальция в мутуалистическом взаимодействии до конца не ясна. Одним из таких вопросов является познание регуляторных механизмов НАДФН-оксидазы растений. Есть данные о том, что S-нитрозилирование НАДФН-оксидазы с участием NO может выступать как фактор регуляции активности этого фермента и генерации АФК как у растений, так и у животных (Yun et al., 2011). Но, как уже говорилось, важнейшим элементом регуляции активности НАДФН-оксидазы является кальций (Sagi, Fluhr, 2006). Этим растительная НАДФН-оксидаза отличается от животной, поскольку содержит Ca^{2+} -связывающие мотивы (EF-рука). Это обеспечивает непосредственное стимулирование активности фермента с помощью ионов кальция, выход которых из внеклеточного пространства в цитоплазму инициируется экзо- и эндогенными факторами. По мнению Marino et al. (2012), НАДФН-оксидаза может быть ключевым компонентом молекулярных механизмов, регулирующих симбиотические и патогенные взаимодействия. Действительно, опыты с ингибитором НАДФН-оксидазы дифенилениодониумом (ДФИ) показали необходимость этого фермента для деформации корневого волоска и образования инфекционной нити (Lohar et al., 2007; Peleg-Grossman et al., 2007). На генетическом уровне доказана положительная роль НАДФН-оксидазы в функционировании клубеньков при симбиозе люцерны с *Sinorhizobium meliloti* (Marino et al., 2011).

По нашим данным (Глянько, Ищенко, 2013), активность НАДФН-оксидазы в микросомальной фракции корней этиолированных проростков гороха резко возрастала (в 3 – 4 раза) спустя 5-10 мин после инокуляции корней *Rhizobium leguminosarum* и не отличалась от контроля через 15-30 мин. Это совпадает с максимальным увеличением содержания H_2O_2 в корнях гороха через 30 мин после инокуляции проростков ризобиями (Митанова, 2010). Опыты с действием на инокулированные проростки гороха экзогенного кальция в концентрации 10-100 мкМ показало синергическое влияние ризобияльной инфекции на активность НАДФН-оксидазы спустя 1 сут после воздействия и снижение активности фермента до уровня контроля через 48 ч. (Глянько и др., 2010). Таким образом, данные результаты свидетельствуют о

влиянии как эндогенного, так и экзогенного кальция на функциональную активность НАДФН-оксидазы, что подтверждает участие Ca^{2+} в регуляции уровня АФК в клетке.

Следует отметить, что, возможно, цитозольный компонент растительной НАДФН-оксидазы – Rop ГТФазы, связывается с основным компонентом фермента после активации Ca^{2+} -зависимой киназы (ССаМК), обеспечивающей фосфорилирование N-терминального участка Rboh и активирование фермента, что ведет к усилению образования АФК. По мнению Wong et al. (2007), увеличение генерации АФК вызывает вторую фазу накопления кальция в цитоплазме, стимулируя открытие Ca^{2+} -каналов на плазматической мембране. Накопление Ca^{2+} в цитоплазме может быть причиной ингибирования взаимодействия комплекса Rop ГТФазы – Rboh и вследствие этого снижения активности НАДФН-оксидазы. Таким образом, эти результаты позволяют предполагать, что концентрация цитозольного Ca^{2+} может модулировать активность НАДФН-оксидазы, регулируя взаимодействие между Rop ГТФ-азой и Rboh. Уровень кальция в цитоплазме, зависящий от АФК, может служить частью механизма, регулирующего взаимодействие мембранной (Rboh) и цитозольной субъединицы (Rop ГТФазы), что оказывает влияние на активность НАДФН-оксидазы – генератора АФК.

По мнению других авторов (Sagi, Fluhr, 2001), стимулирование активности НАДФН-оксидазы растений может осуществляться непосредственно ионами кальция без участия Rop ГТФазы. Эти авторы предполагают, что регуляция активности фермента происходит по принципу «самоусиливающейся петли», в которую вовлечены Ca^{2+} и АФК.

Таким образом, на ранних стадиях симбиотического взаимодействия кальций, АФК и НАДФН-оксидаза играют ключевые роли, усиливая или подавляя взаимовлияние на процессы. Действительно, уровни АФК и кальция увеличиваются после обработки корневых волосков NF (Cardenas et al., 1999; 2008; Shaw, Long, 2003b). В свою очередь АФК могут активировать кальциевые каналы (Foreman et al., 2003; Mori, Schroeder, 2004; Kimura et al., 2012).

Усиленный вход кальция в цитоплазму, наблюдаемый после воздействия NF, может вовлекаться во временное усиление генерации АФК (Cardenas et al., 2008). Предполагается, что EF-рука и кальмодулин-связывающие домены у растительных НАДФН-оксидаз хорошо подходят для этого типа регуляции (Banfi et al.,

2004; Tirone, Cox, 2007). В связи с этим было также показано, что некоторые кальмодулины по-разному экспрессируются в ответ на NF (Camas et al., 2002).

Роль оксида азота (NO)

NO играет специфическую роль в регуляции Ca^{2+} -гомеостаза путем модуляции активности Ca^{2+} -каналов как на плазмалемме, так и на мембранах внутриклеточных органелл (Benson-Bard et al., 2008). Прямое влияние NO на активность Ca^{2+} -каналов связано с S-нитрозилированием белков каналов (обратимым образованием ковалентной связи между остатком цистеина и NO). Также возможно косвенное влияние NO на кальциевые каналы – через каскад реакций, в который вовлекаются циклические ГМФ, АДФ-рибоза, протеинкиназы (Courtois et al., 2008). Активация Ca^{2+} -каналов внутриклеточных органелл и плазмалеммы ведет к повышению концентрации цитозольного кальция. С другой стороны, уменьшение концентрации цитозольного кальция оказывает стимулирующее влияние на NO-синтез (Benson-Bard et al., 2008).

При инфицировании ризобиями увеличивается поглощение нитратов корнями гороха, что, вероятно, связано с влиянием NF-сигналов на анионные каналы (Митанова и др., 2006). Возникает вопрос: каким образом усиление поглощения нитратов посредством активации анионных каналов может влиять на сигнальные пути, задействованные в бобово-ризобияльном симбиозе? Как известно, одним из основных путей образования NO в растениях является восстановление нитратов с помощью нитрат/нитрит восстанавливающих ферментов (Rockel et al., 2002). Это восстановление может происходить уже на плазмалемме с участием корнеспецифичных, локализованных на плазматической мембране нитратредуктазы (PM-NR) и нитрит-NO-редуктазы (NI-NOR). По мнению Stohr et al. (2001, 2006), функционирование этих ферментов скоординировано и скорость ферментативной продукции NO зависит от силы стрессового воздействия. Действительно, по нашим данным, в опытах с концентрацией нитратов 20 мМ наблюдается пик в накоплении NO в корнях этиолированных проростков гороха через 30 мин (Глянько и др., 2010). Однако, с другой стороны ризобияльная инфекция способна снижать уровень NO в корнях (Глянько и др., 2012). Таким образом, ризобияльная инфекция может оказывать влияние как на поглощение нитратов, так и на уровень оксида азота в корнях, что несомненно влияет на мета-

болические пути, задействованные в развитии бобово-ризобияльной интеграции.

В этой связи следует также отметить активацию анионных каналов в плазматической мембране суспензионных клеток табака под воздействием грибного элиситора (сгуптогеин), что усиливает отток нитратов из клеток и оказывает влияние на экспрессию генов защиты, генерацию АФК, модуляцию активности протеинкиназ, на сверхчувствительную реакцию клеток и их гибель при патогенезе (Wendehenne et al., 2002). Эти процессы блокируются ингибиторами анионных каналов.

О влиянии минерального азота на взаимодействие патогенного гриба и растения свидетельствуют также результаты других исследователей (Alkan et al., 2009). По их данным, аммоний (NH_4^+), секретируемый патогенным грибом *Colletotrichum coccodes*, активировал растительную НАДФН-оксидазу, что вызывает накопление АФК и гибель клеток плодов томата. Механизм регуляции потоков Ca^{2+} на плазматической мембране с участием NO может быть применен для объяснения механизмов функциональной активности НАДФН-оксидазы, в частности, при симбиотических взаимодействиях организмов, когда чрезмерное накопление АФК может препятствовать установлению симбиоза между бобовым растением и клубеньковыми бактериями (Shaw, Long, 2003b).

В то же время из литературы известно, что как ризобии, так и нитраты, способствуют синтезу в корнях соединения Q, представляющего собой связанные пептиды – CLAVATA3/ESP (CLE) (Okamoto et al., 2009). Q (CLE) участвует в авторегуляции образования корневых клубеньков. В случае ризобияльной инфекции Q-сигнал перемещается в надземную часть растения, а в случае нитратов остается в корнях. Связывание Q с растительным рецептором LRR RLK в корнях или надземных органах инициирует, как предполагают, синтез соединения (фактора), оказывающего ингибирующий эффект на образование клубеньков (в случае нитратов) или осуществляющего авторегуляцию образования симбиотических структур (как в случае ризобияльной инфекции) (Ferguson et al., 2010).

Инфицирование корней проростков гороха клубеньковыми бактериями снижает уровень оксида азота в корнях в 1,9 раза через 30 мин после инокуляции (Глянько и др., 2012). Уменьшение уровня АФК и АФА под действием ризобияльной инфекции свидетельствует,

по-видимому, о важной сигнальной роли ризобияльных NF и растительных RLK для узнавания партнеров и блокирования защитных механизмов растения-хозяина. По данным Sanchez et al. (2011), при взаимодействии люцерны с *Sinorhizobium meliloti* усиливается синтез NO в растении, а также экспрессируется ген, ответственный за синтез несимбиотической формы гемоглобина. Роль гемоглобина в этом случае может состоять в связывании образованного в ответ на ризобияльное инфицирование NO и таким образом устранении его цитотоксических свойств. Интересно отметить, что инфицирование *Lotus japonicum* патогеном ведет также к усилению синтеза NO, но при этом экспрессии гена гемоглобина у растения не происходит (Nagata et al., 2008).

АФА связаны в растениях с АФК и Ca^{2+} в сигнальном трансдукционном пути (Sama et al., 2004). Представляет интерес возможность участия свободного радикала NO в регуляции активности НАДФН-оксидазы. NO играет важную роль в ключевых физиологических процессах как в животных, так и растительных организмах (Глянько, Васильева, 2010). Заслуживает внимания гипотеза о возможном влиянии NO на потоки вне- и внутриклеточного Ca^{2+} , который, как уже обсуждалось, оказывает влияние на активность НАДФН-оксидазы. Суть гипотезы в том, что NO может повышать или тормозить индуцированный действием экзогенных факторов поток Ca^{2+} в цитоплазму путем изменения проницаемости Ca^{2+} -каналов с участием сигнальных белков, подвергшихся посттрансляционной модификации оксидом азота (нитрозилирование и нитрование белков) (Besson-Bard et al., 2008). Этот механизм регуляции потоков Ca^{2+} на плазмалемме и мембранах внутриклеточных органелл с участием NO (Courtois et al., 2008) также может быть применен для объяснения функциональной активности НАДФН-оксидазы при бобово-ризобияльном симбиозе, когда чрезмерное накопление АФК будет препятствовать установлению мутуалистических взаимоотношений (Shaw, Long, 2003a). Последнее может быть снято антиоксидантными ферментами, в активации которых, по-видимому, также участвует кальций, поскольку АФК-генерирующие ферменты ингибируются антагонистами кальция (Grant et al., 2000).

Заключение

Взаимодействие Ca^{2+} , АФК и АФА (NO) на начальных этапах бобово-ризобияльного симбиоза в нормальных физиологических

условиях и особенно при действии неблагоприятных биотических и абиотических факторов является важнейшей частью проблемы симбиотического взаимодействия организмов. Существенную роль в этих процессах играет кальций, который необходим для функционирования НАДФН-оксидазы – генератора АФК. Есть данные о потребности Ca^{2+} для растительного фермента(ов), генерирующего(их) NO с использованием в качестве субстрата L-аргинина. Усиление образования NO в апопласте клеток листьев проростков пшеницы связано с увеличением накопления H_2O_2 в межклеточном пространстве. С другой стороны, АФК могут увеличивать содержание NO путем изменения активности ферментов, генерирующих оксид азота.

По нашим данным, ризобияльная инфекция влияет на уровень NO и H_2O_2 в тканях корневых проростков гороха. Участие Ca^{2+} в этих обоих процессах очевидно, но каков механизм действия бобово-ризобияльного симбиоза на гомеостаз кальция и каким образом кальциевый сигнал реализуется при симбиотическом взаимодействии, предстоит выяснить.

В перспективе важно понять основные механизмы АФК-сигналинга при раннем симбиотическом взаимодействии в дополнение к тесным связям между Ca^{2+} -сигналингом, экстраклеточной АТФ, активностью пероксидазы клеточной стенки и потенциальной перестройкой цитоскелета, включаемых временным увеличением концентрации Ca^{2+} и образованием АФК. Следует обратить внимание на ритмичные изменения концентрации кальция в цитоплазме в ответ на различные абиотические и биотические факторы (Ca^{2+} -сигнатура) и влияние этого процесса на изменение концентрации в клетке оксида азота, которое также, по-видимому, носит пульсирующий характер и зависит от кальция (Глянько и др., 2013). Важным для изучения является вопрос о развиваемой ризобияльной инфекцией системной устойчивости бобового растения против бактериальных и грибных патогенов.

ЛИТЕРАТУРА

Васильева Г.Г. Активные формы кислорода и антиоксидантные ферменты на начальных стадиях взаимодействия гороха с клубеньковыми бактериями (*Rhizobium leguminosarum*): Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Иркутск: СИФИБР СО РАН, 2004. – 23 с.

Васильева Г.Г., Ищенко А.А., Глянько А.К. Физиологическая роль кальция при бобово-ризобияльном

- симбиозе // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2011. – Т. 7, № 4. – С. 398-414.
- Викторова Л.В., Максютова Н.Н., Трифонова Т.В., Андрианов В.В. Образование пероксида водорода и оксида азота при введении нитрата и нитрита в апопласт листьев пшеницы // Биохимия. – 2010. – Т. 75, № 1. – С. 117-124.
- Глянько А.К., Васильева Г.Г. Активные формы кислорода и азота при бобово-ризобийном симбиозе // Прикл. биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, № 1. – С. 21-28.
- Глянько А.К., Васильева Г.Г., Ищенко А.А., Миронова Н.В., Алексеенко А.Л. Активность НАДФН-оксидазы в корнях проростков гороха при ризобийной инфекции в зависимости от действия абиотических и биотических факторов // Прикл. биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, № 4. – С. 479-485.
- Глянько А.К., Ищенко А.А. Структурные и функциональные особенности НАДФН-оксидазы растений // Прикл. биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, № 5. – С. 509-518.
- Глянько А.К., Ищенко А.А. Влияние ризобийной (*Rhizobium leguminosarum*) инокуляции и ионов кальция на активность НАДФН-оксидазы в корнях этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L.) // Прикл. биохимия и микробиология. – 2013. – Т. 49, № 3. – С. 236-241.
- Глянько А.К., Ищенко А.А., Степанов А.В., Васильева Г.Г., Пройдакова О.А. Ритмичные изменения содержания оксида азота (NO) в корнях этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L.) // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2013. – Вип. 3 (30). – С. 32-38.
- Глянько А.К., Митанова Н.Б., Степанов А.В. Влияние факторов среды на генерацию оксида азота (NO) в корнях этиолированных проростков гороха // Прикл. биохимия и микробиология. – 2012, № 1. – Т. 48. – С. 95-102.
- Колупаев Ю.Е. Кальций и стрессовые реакции растений // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2007. – Вип. 1 (10). – С. 24-41.
- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. – Киев: Основа, 2010. – 352 с.
- Медведев С.С. Кальциевая сигнальная система растений // Физиология растений. – 2005. – Т. 52. – С. 283-305.
- Медведев С.С. Кальциевая сигнальная система растительной клетки // Клеточная сигнализация / Ред. А.Н. Гречкин. – Казань: ФЭН, 2010. – С. 26-36.
- Митанова Н.Б., Миронова Н.В., Глянько А.К. Поглощение нитратов проростками гороха в зависимости от дозы азота и инокуляции клубеньковыми бактериями // Агробиохимия. – 2006. – № 1. – С. 32-33.
- Митанова Н.Б. Влияние минерального азота на начальные этапы формирования бобово-ризобийного симбиоза: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Иркутск: СИФИБР СО РАН, 2010. – 19 с.
- Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – 294 с.
- Шишова М.Ф., Танкелюн О.В., Емельянов В.В., Полевой В.В. Рецепция в системе растение-симбионт // Рецепция и трансдукция сигналов у растений. – СПб: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2008. – С. 43-51.
- Alkan N., Davydov O., Sagi M., Fluhr R., Prusky D. Ammonium secretion by *Colletotrichum coccodes* activates host NADPH oxidase activity enhancing host cell death and fungal virulence in tomato fruits // Mol. Plant Microbe Interact. – 2009. – V. 22. – P. 1484-1491.
- Arrighi J.F., Barre A., Ben Amor B., Bersoult A., Soriano L.C., Mirabella R., de Carvalho-Niebel F., Journet E-P., Gherardi M., Huguet T., Geurts R., Denarie J., Rouge P., Gough C. The *Medicago truncatula* lysine motif–receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule expressed genes // Plant Physiol. – 2006. – V. 142. – P. 265-279.
- Batut J., Mergaert P., Masson-Boivin C. Peptide signaling in the rhizobium-legume symbiosis // Cur. Opin. Microbiol. – 2011. – V. 14. – P. 181-187.
- Banfi B., Tirone F., Durussel I., Knisz J., Moskwa P., Molnar G.Z., Krause K.-H., Cox J.A. Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5) // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279. – P. 18583-18591.
- Besson-Bard A., Courtois C., Gauthier A., Dahan J., Dobrowolska G., Jeandroz S., Pugin A., Wendehenne D. Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca²⁺ signaling // Mol. Plant. – 2008. – V.1. – P. 218-228.
- Baxter-Burrell A., Yang Z., Springer P.S., Bailey-Serres J. Rop GAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of Arabidopsis oxygen deprivation tolerance // Science. – 2002. – V. 296. – P. 2026-2028.
- Blume B., Nurnberger T., Nass N., Scheel D. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley // Plant Cell. – 2000. – V. 12. – P. 1425-1440.
- Bolwer C., Fluhr R. The role calcium and activated oxygen as signals for controlling cross-tolerance // Trends Plant Sci. – 2000. – V. 5. – P. 241-246.
- Camas A., Cardenas L., Quinto C., Lara M. Expression of different calmodulin genes in bean (*Phaseolus vulgaris* L.): role of Nod factor on calmodulin gene regulation // Mol. Plant Microbe Interact. – 2002. – V. 15. – P. 428-436.
- Cardenas L., Feijo J.A., Kunkel J.G., Sanchez F., Holdaway-Clarke T., Quinto C. Rhizobium Nod factors induce increases in intracellular free calcium and in-

- tracellular calcium influxes in bean root hairs // *Plant J.* – 1999. – V. 19. – P. 347-352.
- Cardenas L., Holdaway-Clarke T.L., Sanchez F., Quinto C., Feijo J.A., Kunkel J.G., Hepler P.K. Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors // *Plant Physiol.* – 2000. – V. 123. – P. 443-452.
- Cardenas L., Martinez A., Sanchez F., Quinto C. Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NF) // *Plant J.* – 2008. – V. 56. – P. 802-813.
- Catoira R., Galera C., de Billy F., Penmetsa R.V., Journet EP., Maillat F., Rosenberg C., Cook D., Gough C., Denarie J. Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway // *Plant Cell.* – 2000. – V. 12. – P. 1647-1666.
- Coelho S.M., Brownlee C., Bothwell J.H. A tip-high, Ca²⁺-interdependent, reactive oxygen species gradient is associated with polarized growth in *Fucus serratus* zygotes // *Planta.* – 2008. – V. 227. – P. 1037-1046.
- Courtois C., Besson A., Dahan J., Bourque S., Dobrowolska G., Pugin A., Wendehenne D. Nitric oxide signaling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases // *J. Exp. Bot.* – 2008. – V. 59. – P. 155-163.
- Esseling J.J., Lhuissier F.G.P., Emons A.M.C. Nonsymbiotic root hair tip growth phenotype in NORK-mutated legumes: implications for nodulation factor-induced signaling and formation of a multifaceted root hair pocket for bacteria // *Plant Cell.* – 2004. – V. 16. – P. 933-944.
- Ehrhard D.W., Atkinson E.M., Long S.R. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals // *Cell.* – 1996. – V. 85. – P. 673-681.
- Ferguson B.J., Mathesius U. Signaling interactions during nodule development // *J. Plant Growth Regul.* – 2003. – V. 22. – P. 47-72.
- Ferguson B.J., Indrasumunar A., Hayashi S., Lin Y-H., Reid D.E., Gresshoff P.M. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation // *J. Integr. Plant Biol.* – 2010. – V. 52. – P. 61-76.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H., Torres M.A., Linstead P., Brownlee C., Jones J.D.G., Davies J.M., Dalan L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth // *Nature.* – 2003. – V. 422. – P. 442-446.
- Gough C., Cullimore J. Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2011. – V. 24. – P. 867-878.
- Courtois C., Besson A., Dahan J., Dahan J., Bourque S., Dobrowolska G., Pugin A., Wendehenne D. Nitric oxide signaling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases // *J. Exp. Bot.* – 2008. – V. 59. – P. 155-163.
- Gamas P., de Billy F., Truchet G. Symbiosis-specific expression of two *Medicago truncatula* nodulin genes, *MtNI* and *MtI3*, encoding products homologous to plant defense proteins // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 1998. – V. 11. – P. 393-403.
- Hayashi T., Banda M., Shimoda Y., Kouchi H., Hayashi M., Imaizumi-Anraku H. A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts // *Plant J.* – 2010. – V. 63. – P. 141-154.
- Jabs T., Tschöpe M., Colling C., Hahibrock K., Scheel D. Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – V. 94. – P. 4800-4805.
- Kimura S., Kaya H., Kawarazaki T., Hiraoka G., Senzaki E., Michikawa M., Kuchitsu K. Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca²⁺-dependent activation of *Arabidopsis* NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca²⁺ and reactive oxygen species // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – V. 1823. – P. 398-405.
- Kaur N., Gupta A.K. Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants // *Curr. Sci.* – 2005. – V. 88. – P. 1771-1780.
- Kobayashi M., Kawakita K., Maeshima M., Doke N., Yoshioka H. Subcellular localization of Strbon proteins and NADPH-dependent O₂⁻-generating activity in potato tuber tissues // *J. Exp. Bot.* – 2006. – V. 57. – P. 1373-1379.
- Kwak J.M., Mori I.C., Pei Z.M., Leonhardt N., Torres M.A., Dangl J.L., Bloom R.E., Jones J.D.G., Schroeder J.I. NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis* // *EMBO J.* – 2003. – V. 22. – P. 2623-2633.
- Limpens E., Franken C., Smit P., Willemse J., Bisseling T., Geurts R. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection // *Science.* – 2003. – V. 302. – P. 630-633.
- Lohar D.P., Haridas S., Gantt J.S., VandenBosch K.A. A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis // *New Phytol.* – 2007. – V. 173. – P. 39-49.
- Madsen E.B., Madsen L.H., Radutoiu S., Olbryt M., Rakwalaka M., Szczyglowski K., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals // *Nature.* – 2003. – V. 425. – P. 637-640.
- Marino D., Andrio E., Danchin E.G.J., Oger E., Gucciardo S., Lambert A., Puppo A., Pauly N. A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning // *New Phytol.* – 2011. – V. 189. – P. 580-592.

- Marino D., Dunand C., Puppo A., Pauly N. A burst of plant NADPH oxidases // *Trend Plant Sci.* – 2012. – V. 17. – P. 9-15.
- Miller G., Schlauch K., Tam R., Cortes D., Torres M.A., Shulaev V., Dangi J.L., Mittler R. The plant NADPH oxidase RBohD mediates rapid systemic in response to diverse stimuli // *Sci. Signal.* – 2009. – V. 2, Is.84. – Ra 45.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. ROS signaling: the new wave? // *Trends Plant Sci.* – 2011. – V. 16. – P. 300-309.
- Miwa H., Sun J., Oldroyd G.E., Downie J.A. Analysis of Nod-factor-induced calcium signaling in root hairs of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus* // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2006. – V.19. – P. 914-923.
- Nagata M., Murakami E., Shimoda-Sasakura F., Kucho K., Susuki A., Abe M., Higashi S., Uchiumi T. Expression of a class 1 hemoglobin gene and production of nitric oxide in response to symbiotic and pathogenic bacteria in *Lotus japonicus* // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2008. – V. 21. – P. 1175-1183.
- Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D., Wilson I. Nitric oxide evolution and perception // *J. Exp. Bot.* – 2008. – V. 59. – P. 165-176.
- Oldroyd G.E., Downie J.A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2008. – V. 59. – P. 519-546.
- Okamoto S., Ohnishi E., Sato S., Takahashi H., Nakazono M., Tabata S., Kawaguchi M. Nod factor / nitrate-induced *CLE* genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation // *Plant Cell Physiol.* – 2009. – V. 50. – P. 67-77.
- Pauly N., Pucciariello C., Mandon K., Innocenti G., Jamet A., Baudouin E., Frendo P., Puppo A. Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume-*Rhizobium* symbiosis // *J. Exp. Bot.* – 2006. – V. 57. – P. 1769-1776.
- Pei Z.M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G.J., Grill E., Schroeder J.I. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells // *Nature.* – 2000. – V. 406. – P. 731-734.
- Peleg-Grossman S., Volpin H., Levine A. Root hair curling and *Rhizobium* infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositol – regulated endocytosis and reactive oxygen species // *J. Exp. Bot.* – 2007. – V. 58. – P. 1637-1649.
- Perotto S., Brewin N.J., Kannenberg E.L. Cytological evidence for a host defense response that cell and tissue invasion in pea nodules by lypopolysaccharide-defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841 // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 1994. – V.7. – P. 99-112.
- Popp C., Ott T. Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2011. – V. 14. – P. 458-467.
- Potocky M., Jones M.A., Bezdova R., Smirnov N., Zarsky V. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth // *New Phytol.* – 2007. – V. 174. – P. 742-751.
- Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Felle H.H., Umehara Y., Gronlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases // *Nature.* – 2003. – V. 425. – P. 585-592.
- Rasmussen H. Calcium and cAMP as a synarchic messengers. – N.Y.: Wiley, 1981. – 370 p.
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wild J., Kaizer W.M. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro // *J. Exp. Bot.* – 2002. – V. 53. – P. 103-110.
- Sagi M., Fluhr R. Superoxide production by plant homologues of the gp91 (phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection // *Plant Physiol.* – 2001. – V. 126. – P. 1281-1290.
- Sagi M., Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // *Plant Physiol.* – 2006. – V.141. – P. 336-340.
- Sama J., Baluska F., Menzel D. New signaling molecules regulating root hair tip growth // *Trends Plant Sci.* – 2004. – V. 9. – P. 217-220.
- Sanchez C., Cabrera J.J., Gates A., Bedmar E.J., Richardson D.J., Delgado M.J. Nitric oxide detoxification in the rhizobium-legume symbiosis // *Biochem. Soc. Transactions.* – 2011. – V. 39. – P. 184-188.
- Shaw S.L., Long S.R. Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells // *Plant Physiol.* – 2003a. – V. 131. – P. 976-984.
- Shaw S.L., Long S.R. Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in host legume // *Plant Physiol.* – 2003b. – V. 132. – P. 2196-2204.
- Steinhorst L., Kudla J. Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling // *Plant Physiol.* – 2013. – V. 163. – P. 471-485.
- Tirone F., Cox J.A. NADPH oxidase 5 (NOX5) interacts with and is regulated by calmodulin // *FEBS Lett.* – 2007. – V. 581. – P. 1202-1208.
- Vasse J., de Billy F., Truchet J. Abortion of infection during the *Rhizobium-meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by hypersensitive reaction // *Plant J.* – 1993. – V. 4. – P. 555-566.
- Wong H.L., Pinontoan R., Hayashi K., Tabata R., Yaeno T., Hasegawa K., Kojima C., Yoshioka H., Iba K., Kawasaki T., Shimamoto K. Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ КАЛЬЦИЕВОЙ

- terminal extension // *Plant Cell.* – 2007. – V. 19. – P. 4022-4034.
- Wendehenne D., Lamotte O., Frachisse J.M., Barbier-Brygoo H., Pugin A. Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco // *Plant Cell.* – 2002. – V. 14. – P. 1937-1951.
- Whalley H.J., Knight M.R. Calcium signatures are decoded by plants to give specific gene responses // *New Phytol.* – 2013. – V. 197. – P. 690-693.
- Yun B.W., Feechan A., Yin M., Saidi N.B.B., Bihan T.L., Yu M., Moore J.W., Kang J.G., Kwon E., Spoel S.H., Pallas J.A., Loake G.J. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity // *Nature.* – 2011. – V. 478. – P. 264-268.

Поступила в редакцию
08.10.2013 г.

PHYSIOLOGICAL ROLE Ca^{2+} , NADPH-OXIDASE AND NO-SYNTASE SIGNALING SYSTEMS AT INITIAL STAGES LEGUME-RHIZOBIUM SYMBIOSIS

A. K. Glyan'ko, G. G. Vasil'eva

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry,
Siberian Branch of Russian Academy of Sciences
(Irkutsk, Russia)
e-mail: akglyanko@sifibr.irk.ru*

The literary and own data on participation and interrelation of components calcium, NADPH-oxidase and NO-synthase signaling systems on preinfectious and infectious stages the formation of legume-rhizobium symbiosis are generalized. Physiological role reactive oxygen species (ROS), NADPH oxidase and nitric oxide (NO) and their cross influence on the processes determining the formation of symbiotic structures on roots of the plant-owner is details considered.

Key words: *legume-rhizobium symbiosis, calcium (Ca^{2+}), reactive oxygen species, NADPH oxidase, nitric oxide (NO)*

ФІЗИОЛОГІЧНА РОЛЬ КАЛЬЦІЄВОЇ, НАДФН-ОКСИДАЗНОЇ ТА NO-СИНТАЗНОЇ СИГНАЛЬНИХ СИСТЕМ НА ПОЧАТКОВИХ ЕТАПАХ БОБОВО-РИЗОБІАЛЬНОГО СИМБІОЗУ

А. К. Глян'ко, Г. Г. Васильєва

*Федеральна державна бюджетна установа науки
Сибірський інститут фізіології і біохімії рослин
Сибірського відділення Російської академії наук
(Іркутськ, Росія)
e-mail: akglyanko@sifibr.irk.ru*

Узагальнені літературні і власні дані про участь та взаємозв'язок компонентів кальцієвої, НАДФН-оксидазної і NO-синтазної сигнальних систем на передінфекційній та інфекційній стадіях становлення бобово-ризобіального симбіозу. Детально розглянута фізіологічна роль активних форм кисню, кальцію, НАДФН-оксидази і оксиду азоту та їх перехресний вплив на процеси, що визначають формування симбіотичних структур на коренях рослини-хазяїна.

Ключові слова: *бобово-ризобіальний симбіоз, активні форми кисню, кальцій Ca^{2+} , НАДФН-оксидаза, оксид азоту (NO)*