

ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.138.1

АКТИВНОСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗЫ В ЗОНАХ КОРНЯ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К РИЗОБИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

© 2007 г. Г. Г. Васильева, А. К. Глянько, А. А. Ищенко,
Н. В. Миронова, Т. Е. Путилина

Сибирский институт физиологии и биохимии растений

Сибирского отделения Российской академии наук

(Иркутск, Россия)

Изучали активность НАДФН-оксидазы в зонах корня проростков гороха (*Pisum sativum* L., сорт Аксайский усатый), имеющих разную чувствительность к ризобияльной инфекции, при инокуляции их клубеньковыми бактериями (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*) с разной симбиотической эффективностью и конкурентоспособностью. Установлено, что зоны корня различаются по активности НАДФН-оксидазы и неодинаково реагируют на инокуляцию клубеньковыми бактериями. Предполагается, что характер изменения активности НАДФН-оксидазы связан с генерацией активных форм кислорода, участвующих в регуляторных и защитных механизмах растения-хозяина на начальных этапах бобово-ризобияльного симбиоза.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., *Rhizobium leguminosarum*, НАДФН-оксидаза, активные формы кислорода, бобово-ризобияльный симбиоз

В настоящее время увеличивается число доказательств того, что активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в формировании и функционировании симбиоза между бобовыми растениями и клубеньковыми бактериями (ризобиями), а также при деградации симбиотической системы, то есть, необходимы для успешного прохождения всех стадий симбиоза [5, 13, 18-24, 27, 29, 31]. Образование АФК во время симбиотического процесса является основным фактором сходства ранних ответов растения на инфицирование патогенными и симбиотическими бактериями [14]. Как и для растительно-патогенных взаимодействий, они могут быть важными действующими соединениями в инициальном взаимодействии между двумя партнёрами, которое ведёт к узнаванию бактерий как партнёров или как врагов. При

этом возникает вопрос, какой механизм ризобии используют, чтобы противодействовать защитным ответам растения-хозяина. Более того, если даже ризобии первоначально супрессировали защитные ответы растения-хозяина и проникли в ткани корня, инфекционный процесс может прерываться на последующих этапах. Так, установлено, что 90% инфекционных нитей, первоначально сформированных в корневых волосках люцерны (*Medicago*), останавливают свой рост и разрушаются и только 10% участвуют в образовании клубеньков. Абортирование инфекционных нитей происходит в результате сверхчувствительной реакции (СВЧ) – хорошо известного процесса, происходящего при фитопатогенезе с участием АФК [12, 25, 35].

На начальных этапах бобово-ризобияльного симбиоза уровень АФК изменяется в зависимости от эффективности и видос-

АКТИВНОСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗЫ

пецифичности клубеньковых бактерий [2, 3] и генотипа растения-хозяина [4].

Открытым остаётся вопрос об участии ферментов, ответственных за образование АФК во время инфицирования и органогенеза клубеньков. В растительных клетках существуют многочисленные механизмы и сигнальные трансдукционные пути, ведущие к генерации АФК в различных субклеточных локусах [17, 29, 35]. Одним из важных источников АФК при фитопатогенезе является НАДФН-оксидаза, локализованная на плазмалемме клетки [8, 10]. АФК ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2), образовавшиеся в результате активации НАДФН-оксидазной сигнальной системы, защищают растительный организм от патогенной атаки путем участия в СВЧ-реакции, системной индуцированной устойчивости (СИУ) и в укреплении клеточной стенки как механического барьера на пути инфекции. Однако механизмы генерации АФК на ранних стадиях бобово-ризобиального симбиоза остаются малоизученными. Поскольку начальные этапы взаимодействия растений с патогенными и симбиотическими микроорганизмами имеют много общего [33, 34], можно предположить, что изменения в активности НАДФН-оксидазы являются одним из механизмов регуляции образования АФК на начальных этапах бобово-ризобиального симбиоза. Это подтверждается данными Lohar et al. [22, 23], которые показали, что накопление транскриптов НАДФН-оксидазы в корнях люцерны коррелирует с изменением содержания H_2O_2 в первые часы после инокуляции проростков ризобиями.

Бобово-ризобиальный симбиоз является регулируемым физиолого-биохимическим процессом. При нормальном функционировании регуляторных систем растением-хозяином определяется оптимальное при данных внешних условиях количество ризобий в тканях корня, а также ограничивается время и место их проникновения [11, 15, 28]. Известно, что не весь корень бобового растения одинаково восприимчив к инфекции клубеньковыми бактериями. Проникновение ризобий происходит только через зону, чувствительную к инфекции, у гороха это небольшой по размерам участок молодых корневых волосков [7, 9]. Ограничено также и время внедрения ризобий [16], что связано со старением корневых волосков, через которые проникновения бактерий не происходит. В дальнейшем увеличение количества клубеньковых бактерий в тканях корня идёт в основном за счёт их размножения.

Цель работы - установление влияния инокуляции корней проростков гороха клубеньковыми бактериями, различающимися по симбиотической эффективности, на активность НАДФН-оксидазы в зонах корня с неодинаковой чувствительностью к ризобиальной инфекции.

МЕТОДИКА

Исходным материалом служили проростки гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Аксайский усатый. Проростки выращивали в кюветах на влажной фильтровальной бумаге в термостате при температуре 22 °С в течение 2-х сут.

Инокуляцию корней проводили суспензией клеток *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* эффективного производственного штамма СИАМ 1026 и штамма 2496 неэффективного по азотфиксирующей активности, но с высокой конкурентоспособностью (получены из ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, Санкт-Петербург, Россия). После инокуляции кюветы с проростками помещали в термостат для дальнейшего роста. Через 1 и 2 сут после инокуляции выделяли из корней субклеточные фракции - цитозольную и микросомальную - методом дифференциального центрифугирования [32]. Для этого свежие корни (4-5 г) тщательно промывали дистиллированной водой, нарезали и гомогенизировали в предварительно охлаждённой во льду ступке с 50 мМ НЕРЕС-КОН буфером (рН 7,8), содержащим 250 мМ сахарозу и 0,1 мМ ЭДТА. Гомогенат фильтровали через капроновую ткань (для удаления нерастёртых фрагментов, например, обломков клеточной стенки) и центрифугировали при 600 g 15 мин для осаждения тяжёлых органелл и компонентов клетки. Надосадочную жидкость центрифугировали при 42000 g в течение 20 мин для осаждения митохондрий. Полученный супернатант центрифугировали в течение 1 ч при 140000 g для разделения на цитозольную (супернатант) и микросомальную (осадок) фракции. Осадок суспендировали в буфере, использованном для гомогенизации корней. В полученных фракциях (цитозольной и микросомальной) определяли НАДФН-оксидазную активность.

Активность НАДФН-оксидазы определяли по окислению НАДФН [26]. К реакционной среде, состоящей из 0,8 мл реакционного буфера (50 мМ НЕРЕС-КОН (рН 7,8), 0,1 мМ ЭДТА и 1 мкМ KCN), добавляли 0,2 мл пробы и прединкубировали 1 мин при 30 °С. Реакция инициировалась добавлением 100 мкМ НАДФН.

Активность НАДФН-оксидазы в зонах корня проростков гороха

Возраст проростков, сут	Время действия инокулята, сут	Зона корня	Активность НАДФН-оксидазы	
			мкмоль · мин ⁻¹ · мг белка ⁻¹	% к контролю
Без инокуляции (контроль)				
3		I	834,2 ± 76,1	
		II	1086,5 ± 51,2	
		III	530,1 ± 6,6	
		IV	408,6 ± 47,1	
4		I	497,8 ± 26,4	
		II	1362,8 ± 189,3	
		III	1032,8 ± 103,4	
		IV	159,4 ± 17,3	
Инокуляция <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CIAM 1026				
3	1	I	1021,1 ± 115,2	122,4
		II	1553,3 ± 149,5	143,0
		III	965,0 ± 137,4	182,0
		IV	432,3 ± 44,3	105,8
4	2	I	1388,7 ± 125,9	279,0
		II	1613,2 ± 150,4	118,4
		III	972,9 ± 52,6	94,2
		IV	212,8 ± 22,9	133,5
Инокуляция <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм 2496 (неэффективный)				
3	1	I	841,7 ± 71,9	100,9
		II	681,1 ± 35,6	62,7
		III	494,3 ± 45,0	93,2
		IV	440,3 ± 30,8	107,8
4	2	I	1454,0 ± 101,0	292,1
		II	1538,6 ± 80,1	112,9
		III	717,6 ± 48,2	69,5
		IV	179,5 ± 8,8	112,6

Скорость окисления НАДФН регистрировали на спектрофотометре "Specord S-100" (Analytik Jena, Германия) по уменьшению в адсорбции при 340 нм (A_{340}) в течение 5 мин и рассчитывали с коэффициентом экстинкции $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$. Содержание белка во фракциях оценивали с красителем амидо-чёрным [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активность НАДФН-оксидазы в зонах корня. Результаты определения НАДФН-оксидазной активности в зонах корня гороха, имеющих разную чувствительность к ризобийной инфекции, показали, что активность фермента неодинакова по длине корня. Так, наибольшая активность НАДФН-оксидазы обнаружена в зоне проникновения ризобий (зона II), наименьшая – в зоне без корневых волосков (зона IV) (табл. 1). Очевидно, что участок корня, наиболее чувствительный к ризобийной инфекции, изначально наиболее защищён от проникновения микроорганизмов, поскольку

высокая активность НАДФН-оксидазы может свидетельствовать об усилении генерации АФК в данной зоне. Для проникновения в ткани корня микроорганизмы (как патогенные, так и симбиотические) должны супрессировать или "обойти" защитные реакции растения-хозяина.

После инокуляции проростков эффективным штаммом ризобий CIAM 1026 активность НАДФН-оксидазы в зонах корня либо увеличивалась, либо оставалась без достоверного изменения (табл. 1). Через 1 сут после инокуляции наибольшее увеличение активности фермента наблюдалось в зоне зрелых корневых волосков (в 1,8 раза), через 2 сут – в зоне активного роста (в 2,8 раза). Активность фермента увеличивалась в 1,4 раза (достоверно при $P = 0,95$, $v = 4$) через 1 сут после инокуляции в зоне адгезии и проникновения ризобий. В остальных случаях активность НАДФН-оксидазы достоверно не изменялась.

Увеличение активности фермента после инокуляции эффективным штаммом ризобий в

АКТИВНОСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗЫ

указанных зонах могло быть следствием генерации АФК. Так, нами показано, что после инокуляции содержание H_2O_2 в этих зонах также увеличивается [6]. Увеличение активности НАДФН-оксидазы и содержания АФК в разных зонах могло иметь неодинаковое физиологическое значение. Так, изменение этих параметров в зоне активного роста очевидно связано с устойчивостью к ризобиальной инфекции. Что же касается увеличения активности НАДФН-оксидазы и уровня АФК в зоне адгезии и проникновения ризобий, а также в зоне зрелых корневых волосков, то это может свидетельствовать о включении растением-хозяином регуляторных механизмов. По-видимому, после проникновения определённого количества ризобий растение-хозяин включает регуляторные механизмы, направленные на ограничение дальнейшего проникновения ризобий (в зону II) или размножения и распространения по тканям корня (зона III). Регуляция общего количества ризобий в тканях корня в конечном итоге приводит к формированию оптимального количества клубеньков на корнях бобового растения.

Из литературы известно, что концентрация АФК в корнях модулируется в зависимости от восприятия ризобиального Nod-фактора бобовым растением. Так, через 20-40 мин после воздействия Nod-фактора уменьшается уровень АФК в корнях *Medicago truncatula* [23, 29, 31]. Уменьшение содержания H_2O_2 обнаружено в участках корня *Medicago truncatula*, содержащих корневые волоски, через 30 мин после воздействия синтетического Nod-фактора [23]. Содержание H_2O_2 и аккумуляция транскриптов НАДФН-оксидазы оставались меньше контрольного уровня в течение 1-1,5 ч после воздействия Nod-фактора на корни *Medicago truncatula*, при этом корневые волоски останавливали полярный рост и кончики их набухали [22, 23]. Однако уменьшение уровня АФК и аккумуляции транскриптов НАДФН-оксидазы было временным и, как делают вывод авторы, связано с началом деформации корневых волосков. Через 6 ч полярный рост корневых волосков возобновлялся и переориентировался, что приводило через 12 ч после инокуляции *S. meliloti* или обработки Nod-фактором к образованию на них коротких ветвей. При этом содержание АФК и аккумуляция транскриптов НАДФН-оксидазы увеличивались до уровня предобработки Nod-фактором и сохранялись на этих уровнях позже [19, 21]. Примерно через 12 ч после ино-

куляции *S. meliloti* корней люцерны наблюдалась аккумуляция АФК в зоне ближайшей к кончику корня [27]. Продолжающаяся деформация корневых волосков приводила через 24 ч к образованию скрученных корневых волосков, некоторые из них были инфицированы ризобиями [22]. Таким образом, обнаружена временная корреляция между аккумуляцией АФК, аккумуляцией транскриптов НАДФН-оксидазы и деформацией корневых волосков. В дальнейшем необходимо исследовать пространственный аспект аккумуляции АФК и транскриптов НАДФН-оксидазы в корневых волосках.

Аккумуляция АФК обнаружена также в инфекционных нитях и в инфицированных клетках молодых и зрелых 6-недельных клубеньков люцерны [29]. В межклеточных инфекционных карманах *Sesbania rostrata* аккумуляция АФК предшествовала стеблевой нодуляции [20].

Таким образом, изменение уровня АФК и связанной с ней активности НАДФН-оксидазы при воздействии на растение ризобий имеет временную зависимость и регулируется, по-видимому, на генном уровне.

Исследования, проведенные с неэффективным, но высококонкурентным ризобиальным штаммом 249б, показали, что активность НАДФН-оксидазы уменьшалась в зоне проникновения ризобий через 1 сут и в зоне зрелых корневых волосков через 2 сут (достоверно при $P \geq 0,95$, $v = 4$) и увеличивалась в 3 раза в зоне активного роста через 2 сут. В остальных случаях активность фермента достоверно не изменялась (табл. 1).

Поскольку штамм 249б является высококонкурентноспособным, уменьшение активности НАДФН-оксидазы в зоне проникновения и в зоне зрелых корневых волосков может происходить в результате супрессии ризобиями защитных и регуляторных реакций растения-хозяина. Это, в свою очередь, может вызывать следствием уменьшение образования АФК в данных зонах, что будет способствовать проникновению и размножению ризобий и приведёт в последствии к образованию большого количества клубеньков, не способных к эффективной азотфиксации. Увеличение активности НАДФН-оксидазы в зоне активного роста, очевидно так же как и при инокуляции эффективным штаммом *CIAM 1026*, свидетельствует о защите этого участка корня от

Активность НАДФН-оксидазы в клеточных фракциях в зонах неинокулированных корней проростков гороха

Возраст проростков, сут	Зона корня	Активность НАДФН-оксидазы, (мкмоль · мин ⁻¹ · мг белка ⁻¹)
Цитозольная фракция		
3	I (0-5 мм)	227,7 ± 17,1
	II (5-20 мм)	155,9 ± 10,6
	III (20-40 мм)	65,7 ± 3,1
	IV (от 40 мм и до семени)	44,4 ± 3,9
4	I (0-5 мм)	114,5 ± 6,4
	II (5-20 мм)	205,1 ± 10,1
	III (20-40 мм)	104,0 ± 10,1
	IV (от 40 мм и до семени)	29,1 ± 3,0
Микросомальная фракция		
3	I (0-5 мм)	606,5 ± 59,0
	II (5-20 мм)	930,6 ± 40,6
	III (20-40 мм)	464,4 ± 3,5
	IV (от 40 мм и до семени)	364,2 ± 43,2
4	I (0-5 мм)	383,3 ± 20,0
	II (5-20 мм)	1157,7 ± 179,2
	III (20-40 мм)	928,8 ± 93,3
	IV (от 40 мм и до семени)	130,3 ± 14,3

проникновения ризобий. Подтверждением этих предположений может служить уровень АФК в данных зонах.

Таким образом, инокуляция корней гороха штаммами клубеньковых бактерий, различающихся по конкурентоспособности и симбиотической эффективности, приводит к различному изменению активности НАДФН-оксидазы в зонах корня, имеющих разную чувствительность к ризобияльной инфекции, что, по-видимому, связано с генерацией АФК, защитными и регуляторными механизмами растения-хозяина.

Активность НАДФН-оксидазы в клеточных фракциях зон корня. Результаты определения НАДФН-оксидазной активности в зонах корней гороха, имеющих неодинаковую чувствительность к ризобияльной инфекции, показали, что активность фермента связана в основном с микросомальной фракцией клетки, где она в 3-9 раз превосходит цитозольную фракцию. Активность НАДФН-оксидазы имела неодинаковое распределение по длине корня. В

цитозольной фракции активность фермента постепенно снижалась в направлении от апекса корня к семени. В микросомальной фракции наибольшая активность фермента обнаружена в зоне проникновения ризобий (зона II) (табл. 2). Наименьшая активность НАДФН-оксидазы в обеих фракциях наблюдается в зоне IV.

После инокуляции корней клубеньковыми бактериями эффективного штамма *CIAM 1026* активность НАДФН-оксидазы изменялась неодинаково в клеточных фракциях зон корня (табл. 3). В цитозольной фракции активность фермента увеличивалась в зоне зрелых корневых волосков в 1,9 и 1,6 раза соответственно через 1 и 2 сут после инокуляции (достоверно при $P > 0,95$, $v = 4$).

В микросомальной фракции активность НАДФН-оксидазы увеличивалась через 1 сут после инокуляции в зоне адгезии и проникновения ризобий в 1,5 раза и зоне зрелых корневых волосков в 1,8 раза (достоверно при $P \geq 0,95$, $v = 4$). Через 2 сут наблюдалось наибольшее увеличение активности фермента в зоне

АКТИВНОСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗЫ

Таблица 3

Активность НАДФН-оксидазы в клеточных фракциях в зонах корней проростков гороха при инокуляции эффективным штаммом ризобий

Время действия инокулята, сут	Зона корня	Активность НАДФН-оксидазы, мкмоль · мин ⁻¹ /мг белка	% к контролю
Цитозольная фракция			
1	I (0-5 мм)	188,1 ± 18,1	82,6
	II (5-20 мм)	151,9 ± 29,8	97,4
	III (20-40 мм)	123,2 ± 17,4	187,5
	IV (от 40 мм и до семени)	47,3 ± 4,3	106,5
2	I (0-5 мм)	140,4 ± 25,9	122,6
	II (5-20 мм)	188,9 ± 20,4	92,1
	III (20-40 мм)	170,9 ± 20,0	164,3
	IV (от 40 мм и до семени)	38,7 ± 2,9	133,0
Микросомальная фракция			
1	I (0-5 мм)	833,0 ± 97,1	137,3
	II (5-20 мм)	1401,4 ± 120,7	150,6
	III (20-40 мм)	841,8 ± 120,0	181,3
	IV (от 40 мм и до семени)	385,0 ± 40,0	105,7
2	I (0-5 мм)	1248,3 ± 100,0	325,7
	II (5-20 мм)	1424,3 ± 130,0	123,0
	III (20-40 мм)	802,0 ± 32,6	86,3
	IV (от 40 мм и до семени)	174,1 ± 20,0	133,6

активного роста (более чем в 3 раза). В остальных случаях изменение активности фермента не было достоверным.

Как уже было отмечено выше, увеличение активности НАДФН-оксидазы в данных зонах после инокуляции, очевидно, связано с генерацией АФК и имеет временную зависимость [22].

После инокуляции неэффективным штаммом 249б активность НАДФН-оксидазы в микросомальной фракции уменьшалась в зоне проникновения ризобий через 1 сут и через 2 сут в зоне зрелых корневых волосков (достоверно при $P > 0,95$, $\nu = 4$). Очень сильное увеличение активности фермента (более чем в 3 раза) наблюдалось в зоне активного роста через 2 сут после инокуляции (табл. 4).

В цитозольной фракции активность НАДФН-оксидазы уменьшалась в зоне зрелых корневых волосков через 1 сут после инокуляции (достоверно при $P > 0,95$, $\nu = 4$). Через 2

сут после инокуляции наблюдалось увеличение активности фермента в зоне активного роста на 34,6 % (достоверно при $P > 0,95$, $\nu = 4$) (табл. 4). В остальных случаях изменение активности НАДФН-оксидазы не было достоверным.

Изменение активности фермента после инокуляции неэффективным штаммом 249б в клеточных фракциях зон корня, по-видимому, связано как с защитными механизмами растения-хозяина (увеличение активности фермента в зоне активного роста), так и с их супрессией этим высококонкурентным штаммом ризобий (увеличение активности НАДФН-оксидазы в зоне проникновения ризобий и в зоне зрелых корневых волосков).

Таким образом, установленные различия в активности НАДФН-оксидазы в зонах корня с неодинаковой чувствительностью к ризобийной инфекции, а также неодинаковое изменение активности фермента после инокуляции

Активность НАДФН-оксидазы в клеточных фракциях в зонах корней проростков гороха при инокуляции неэффективным штаммом ризобий

Время действия инокулята, сут	Зона корня	Активность НАДФН-оксидазы (мкмоль · мин ⁻¹ · мг белка ⁻¹)	% к контролю
Цитозольная фракция			
1	I (0-5 мм)	165,4 ± 20,0	72,6
	II (5-20 мм)	111,8 ± 15,6	71,7
	III (20-40 мм)	44,5 ± 6,0	67,7
	IV (от 40 мм и до семени)	59,3 ± 9,6	133,6
2	I (0-5 мм)	154,1 ± 10,5	134,6
	II (5-20 мм)	181,3 ± 9,8	88,4
	III (20-40 мм)	97,0 ± 9,2	93,3
	IV (от 40 мм и до семени)	39,7 ± 3,0	136,4
Микросомальная фракция			
1	I (0-5 мм)	676,3 ± 59,2	111,5
	II (5-20 мм)	569,3 ± 20,0	61,2
	III (20-40 мм)	449,8 ± 39,0	96,9
	IV (от 40 мм и до семени)	381,0 ± 21,2	104,6
2	I (0-5 мм)	1299,9 ± 90,5	339,1
	II (5-20 мм)	1357,3 ± 70,3	117,2
	III (20-40 мм)	620,6 ± 39,0	66,8
	IV (от 40 мм и до семени)	139,8 ± 5,8	107,3

корней гороха штаммами ризобий, различающихся по симбиотической эффективности, по-видимому, связаны с уровнем генерации АФК.

Дальнейшие исследования могут быть направлены на изучение НАДФН-оксидазной активности и генерации АФК в таких мембранах как плазмалемма, а также в мембранах эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи, микросом.

ЛИТЕРАТУРА

- Бузун Г.А., Джемухадзе К.М., Милешко Л.Ф. Определение белка в растениях с помощью амидо-чёрного // Физиология растений – 1982. – Т. 29, вып. 1. – С. 198-200.
- Васильева Г.Г., Глянько А.К., Миронова Н.В. Генерация супероксидных радикалов в проростках гороха при инокуляции азотфиксирующими бактериями разной совместимости // С.-х. биология. – 2001. – № 3. – С. 79-83.
- Васильева Г.Г., Миронова Н.В., Лузова Г.Б., Глянько А.К. Влияние инокуляции азотфиксирующими бактериями разной эффективности и совместимости на содержание перекиси водорода и активность каталазы в проростках гороха // Агрехимия. – 2004. – № 6. – С. 68-72.
- Васильева Г.Г., Глянько А.К., Миронова Н.В. Содержание пероксида водорода и активность каталазы при инокуляции клубеньковыми бактериями проростков гороха с разной способностью к нодуляции // Прикл. биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41, № 6. – С. 621-625.
- Васильева Г.Г., Глянько А.К., Миронова Н.В. и др. Активные формы кислорода в проростках гороха при взаимодействии с симбиотическими и патогенными микроорганизмами // Там же. – 2007. – Т. 43, № 2. – С. 240-245.
- Васильева Г.Г., Глянько А.К., Миронова, Шмаков В.Н. Содержание пероксида водорода и активность каталазы в участках корней гороха, проявляющих разную чувствительность к ризобийной инфекции // Вісн. Харків. нац. аг-

АКТИВНОСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗЫ

- парн. ун-ту. Серия Биология. – 2007. – Вып. 1 (10). – С. 59-64.
7. Макарова Л.Е., Нурминский В.Н. Влияние температуры на локализацию «свободных» фенольных соединений в тканях корней и деформацию корневых волосков у инокулированных *Rhizobium* проростков гороха // Цитология. – 2005. – Т. 47, № 6. – С. 519-525.
 8. Максимов И.В., Черепанова Е.А. Про-/антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам // Успехи соврем. биологии. – 2006. – Т. 126, № 3. – С. 250-261.
 9. Соколова М.Г. Физиологические особенности начальных этапов инфицирования корней гороха *Rhizobium leguminosarum* при разных температурах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Иркутск, 2001. – 21 с.
 10. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – 294 с.
 11. Хадри А-У., Бисселлинг Т. Реакции растений на Nod-факторы // *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями. – С-Пб.: РАСХН, 2002. – С. 435-450.
 12. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2004. – V. 55. – P. 373-399.
 13. Ardisson S., Frenedo P., Laurenti E. et al. Purification and physical-chemical characterization of the three hydroperoxidases from the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti* // *Biochemistry*. – 2004. – V. 43, Is. 39. – P. 12692-12699.
 14. Baron C., Zambryski P.C. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: Variations on a common theme? // *Annu. Rev. Genet.* – 1995. – V. 29. – P. 107-129.
 15. Bhuvaneshwari T.V., Turgeon B.G., Bauer W.D. Early events in the infection of soybean (*Glycine max.* L. Merr) by *Rhizobium japonicum*. I. Localization of infectible root cells // *Plant Physiol.* – 1980. V. – 66, № 6. - P. 1027-1031.
 16. Bhuvaneshwari T.V., Bhagwat A.A., Bauer W.D. Transient susceptibility of root cell in four common legumes to nodulation by rhizobia // *Ibid.* – 1981. – V. 68, № 5. – P. 1144-1149.
 17. Bolwell G.P., Wojtaszek P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense - a broad perspective // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 1997. – V. 51, № 6. – P. 347-366.
 18. Bueno P., Soto M.J., Rodrigues-Rosales M.P. et al. Time-course of lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H₂O₂ accumulation during the early stages of *Rhizobium*-legume symbiosis // *New Phytologist.* – 2001. – V. 152, Is. 1. – P. 91-96.
 19. Catoira R., Galera C., de Billy F. et al. Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway // *Plant Cell.* – 2000. – V. 12, № 9. – P. 1647-1666.
 20. D'Haese W., Rycke R. D., Mathis R. et al. Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base nodulation of a semiaquatic legume // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2003. – V. 100, Is. 20. – P. 11789-11794.
 21. Hérouart D., Baudouin E., Frenedo P. et al. Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: key role in the establishment of the legume - *Rhizobium* symbiosis // *Plant Physiol. Biochem.* – 2002. – V. 40, Is. 6-8. – P. 619-624.
 22. Lohar D.P., Sharopova N., Endre G. et al. Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula* // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 140, № 1. – P. 221-234.
 23. Lohar D.P., Haridas S., Gantt J.S., Vanden Bosch K.A. A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis // *New Phytologist.* – 2007. – V. 173, Is. 1. – P. 39-54.
 24. Pauly N., Pucciariello C., Mandon K. et al. Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume-*Rhizobium* symbiosis // *J. Exp. Bot.* – 2006. – V. 57, № 8. – P. 1769-1776.
 25. Penmetsa R.V., Cook D.R. A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbionts // *Science.* – 1997. – V. 275, № 5299. – P. 527-530.
 26. Pinton R., Cakmak I., Marschner H. Zinc deficiency enhanced NAD(P)H-dependent superoxide radical production in plasma membrane vesicles isolated from roots of bean plants // *J. Exp. Bot.* – 1994. – V. 45, № 270. – P. 45-50.
 27. Ramu S. K., Peng H.M., Cook D.R. Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene *rip1* in *Medicago truncatula* // *Mol. Plant-Microbe Interac.* – 2002. – V. 15, № 6. – P. 522-528.
 28. Roughley R.J., Dart P.J. Root temperature and root hair infection of *Trifolium subterraneum* L. Cranmere // *Plant Soil.* – 1970. – V. 32, № 2. – P. 518-520.
 29. Santos R., Hérouart D., Sigaud S. et al. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction // *Mol. Plant-Microbe Interac.* – 2001. – V. 14, № 1. – P. 86-89.

30. Scherri C.L.M., Loggini B., Puliga S., Navaria F.I. Antioxidant system in *Sporobolus stapfianus*: changes in response to desiccation and rehydration // *Phytochemistry*. – 1994. – V. 35, № 3. – P. 561-565.
31. Shaw S.L., Long S.R. Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 132, № 4. – P. 2196-2204.
32. Shen W., Nada K., Tachibana S. Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars // *Ibid.* – 2000. – V. 124, № 1. – P. 431-439.
33. Soto M.J., Sanjuan J., Olivares J. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons // *Microbiology*. – 2006. – V. 152, № 11. – P. 3167-3174.
34. Sprent J.I. Knobs, knots and nodules - the renaissance in legume symbiosis research // *New Phytologist*. – 2002. – V. 153, Is. 1. – P. 2-9.
35. Vasse J., de Billy F., Truchet G. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti-alfalfa* symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction // *Plant J.* – 1993. – V. 4, № 3. – P. 555-566.
36. Wisniewski J.P., Rathbun E.A., Knox J.P., Brewin N.J. Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of extracellular matrix: Implications for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum* // *Mol. Plant-Microbe Interac.* – 2000. – V. 13, № 4. – P. 413-420.

Поступила в редакцію
04.04.2007 г.

NADPH OXIDASE ACTIVITY IN THE ROOT ZONES OF PEA SEEDLINGS DIFFERING ON SENSITIVITY TO THE RHIZOBIA INFECTION

G. G. Vasilieva, A. K. Glyanko, A. A. Ischenko, N. B. Mironova, T. E. Putilina

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
Siberian Division of the Russian Academy Sciences
(Irkutsk, Russia)*

NADPH oxidase activity in the root zones of pea seedlings (*Pisum sativum* L., cultivar Aksayskiy moustached) differing on sensitivity to the rhizobia infection inoculated nodula bacteria (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*) distinguishing by symbiotic efficiency and competitiveness was studied. It has been established that root zones differ on NADPH oxidase activity and differently react on inoculation with nodula bacteria. It is supposed that sample of change of NADPH oxidase activity is connected to generation of the active oxygen species, participating in regulatory and defense mechanisms of the plant-host at the initial stages of legume-rhizobia symbiosis.

Key words: *Pisum sativum* L., *Rhizobium leguminosarum*, NADPH oxidase, active oxygen species, symbiosis

АКТИВНІСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗИ В ЗОНАХ КОРЕНЯ ПРОРОСТКІВ ГОРОХУ, ЩО ВІДРІЗНЯЮТЬСЯ ЗА ЧУТЛИВІСТЮ ДО РИЗОБІАЛЬНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Г. Г. Васильєва, А. К. Глянько, А. О. Іщенко, Н. В. Миронова, Т. Е. Путиліна

*Сибірський інститут фізіології і біохімії рослин
Сибірського відділення Російської академії наук
(Іркутськ, Росія)*

Вивчали активність НАДФН-оксидази в зонах кореня проростків гороху (*Pisum sativum* L., сорт Аксайський вусатий), що мають різну чутливість до ризобіальної інфекції, при інокуляції їх бульбочковими бактеріями (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*) з різною симбіотичною ефективністю і конкурентоздатністю. Встановлено, що зони кореня відрізняються за активністю НАДФН-оксидази і неоднаково реагують на інокуляцію бульбочковими бактеріями. Припускається, що характер зміни активності НАДФН-оксидази пов'язаний з генерацією активних форм кисню, що беруть участь в регуляторних і захисних механізмах рослини-живителя на початкових етапах бобово-ризобіального симбіозу.

Ключові слова: *Pisum sativum* L., *Rhizobium leguminosarum*, НАДФН-оксидаза, активні форми кисню, бобово-ризобіальний симбіоз