

УДК 581.138.1

ВЛИЯНИЕ РИЗОБИАЛЬНОЙ (*Rhizobium leguminosarum*) ИНОКУЛЯЦИИ И ИОНОВ КАЛЬЦИЯ НА АКТИВНОСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗЫ В КОРНЯХ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА (*Pisum sativum* L.)

© 2013 г. А. К. Глянько, А. А. Ищенко

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033

e-mail: akglyanko@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 11.05.2012 г.

Показаны изменения в функциональной активности НАДФН-оксидазы в микросомальной фракции корней этиолированных проростков гороха под влиянием ризобияльной инокуляции и ионов кальция (Ca^{2+}). Обнаружены колебания активности фермента на среде с экзогенным источником Ca^{2+} (CaCl_2 , 100 мкМ): повышение через 5 и 20 мин и снижение через 10 и 30 мин. Хелатор кальция (этиленгликоль тетрауксусная кислота, 100 мкМ) способствовал снижению активности фермента на фоне экзогенного кальция. Ризобияльная инокуляция в 3.9 раза увеличивала активность фермента через 5 мин по сравнению с контролем (без инокуляции). Активатор Ca^{2+} -каналов амиодарон (300 мкМ) и блокатор Ca^{2+} -каналов – хлорид лантана (400 мкМ), снижали активность НАДФН-оксидазы на фоне ризобияльной инокуляции до уровня контроля (без инокуляции). Делается вывод об участии Ca^{2+} и активных форм кислорода в регуляции активности мембранной НАДФН-оксидазы в корнях проростков гороха.

DOI: 10.7868/S0555109913030082

Мутуалистический симбиоз между клубеньковыми бактериями (*Rhizobium leguminosarum*) и бобовыми растениями (*Leguminosae*) – уникальное биологическое явление, изучение теоретических основ которого важно в практическом аспекте для получения высоких урожаев бобовых растений, повышения азотного плодородия почв, сохранения экологической стабильности почвенной среды. В отличие от патогенеза, бобово-ризобияльный симбиоз – полезное для обоих организмов сожительство. Проникая в клетки растения, клубеньковые бактерии способствуют формированию “эндоэкологической ниши” в виде корневых клубеньков, в которых ризобии фиксируют атмосферный азот (N_2) за счет энергетических ресурсов растения-хозяина, давая растению взамен усвояемый им минеральный азот (NH_3).

Формирование бобово-ризобияльного симбиоза требует успешного инфицирования корней бобовых растений ризобиями (микросимбионт) и образования симбиотических структур. Это сложные постепенно развивающиеся процессы, осуществляемые клубеньковыми бактериями под контролем растения-хозяина (макросимбионт) [1, 2].

Необходимым условием для инфицирования и образования клубеньков (нодуляция) бобовых растений является прикрепление ризобий к кончику корневого волоска. У адсорбированных на поверхности корня бактерий под влиянием специфических для ризобий растительных флавоно-

идов (дайдзеин, апигенин, лютеолин и др.) инициируется экспрессия *Nod*-генов, конечными продуктами которых являются бактериальные сигнальные молекулы – липохитоолигосахариды – *Nod*-факторы (NF). Эти сигналы воспринимаются эпидермальными клетками корня, на плазмалемме которых локализованы рецепторы NF – рецептор-подобные киназы (receptor-like kinases, RLK): LysM RLK и LRR (leucine rich repeat) RLK. Первая из них содержит внеклеточные лизиновые мотивы, вторая (LRR) – богата лейциновыми повторами [3]. Наличие двух (или более) рецепторов в эпидермальных клетках объясняется, вероятно, их разной ролью в инициации включения сигнальных путей, ведущих к инфицированию растения ризобиями и образованию корневых клубеньков [4, 5]. Молекулярное взаимодействие NF и RLK включает определенные ответы макросимбионта, такие, как ионные изменения, защелачивание цитоплазмы, колебания концентрации Ca^{2+} и экспрессия генов, которые приводят к бактериальной инвазии и формированию клубенька [6, 7]. В первые минуты после воздействия на клетки корня очищенного NF или ризобий наблюдается быстрый транспорт ионов кальция в цитоплазму через плазмалемму, что сопровождается деполяризацией мембраны и оттоком ионов хлора и калия из цитоплазмы во внеклеточное пространство корневых волосков. Колебания в концентрации цитозольного Ca^{2+} наблюдаются спустя 10–15 мин после индукции потока

кальция в цитоплазму [8]. Подобные изменения в концентрации Ca^{2+} вызывают (с участием активированной Ca^{2+} -кальмодулинзависимой киназы) фосфорилирование белков — транскрипционных факторов, дальнейшую трансдукцию NF-сигнала и экспрессию ядерных симбиотических генов [9]. Таким образом, этим самым Ca^{2+} -сигнальная система участвует в рецепции симбиотических сигналов на самых ранних стадиях взаимодействия симбионтов.

Кроме ионов Ca^{2+} сигнальную роль на ранних этапах симбиоза играют активные формы кислорода (АФК), такие, как супероксидный анион-радикал (O_2^-), пероксид водорода (H_2O_2) и др. Показано, что АФК активируют Ca^{2+} -каналы, которые являются сигнальным механизмом, ведущим к полярному росту корневого волоска [10]. Многочисленные исследования по вовлечению АФК в систему сигнализации растений также подтверждают участие Ca^{2+} в этих процессах [11–13].

Одним из важных источников генерации АФК в растениях является НАДФН-оксидазная ферментная система, локализованная на плазматической мембране клетки. Ингибирование активности НАДФН-оксидазы ведет не только к уменьшению генерации АФК, но и к торможению образования инфекционных нитей при симбиотических взаимоотношениях люцерны и *Sinorhizobium meliloti* [14, 15]. Необходимо отметить, что усиление Ca^{2+} -сигнала происходит в том числе и за счет его взаимодействия с различными белками, которые после этого способны осуществлять ионный транспорт, функциональные, регуляторные и другие функции, поддерживать определенный уровень кальция в структурах и органеллах клетки.

С ферментом НАДФН-оксидазой (КФ 1.6.3.1) связывают, по крайней мере, два звена в метаболизме: генерацию АФК и потоки Ca^{2+} [16]. Предполагается, что АФК и Ca^{2+} являются основными сигнальными элементами в механизме регуляции активности мембранной НАДФН-оксидазы у растений [17]. НАДФН-оксидаза растений локализована на плазмалемме клеток корня и активируется при действии на растение абиотических и биотических стрессоров [18]. 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 [19]. Роль АФК при мутуалистических взаимодействиях неоднозначна: с одной стороны, они способствуют развитию бобово-ризобиального симбиоза; с другой — выполняют защитную роль как сигнальные и цитотоксические соединения [20].

В отличие от патогенного воздействия на растения, роль НАДФН-оксидазы и связанного с ее функциональной активностью кальция в мутуалистических взаимодействиях до конца не ясна. В частности, нерешенным остается вопрос о механизмах регуляции НАДФН-оксидазы растений. Как уже отмечалось, важную роль в этом механизме может играть Ca^{2+} [16]. Этим растительная НАДФН-оксидаза отличается от животной, поскольку содержит на цитозольном N-терминальном участке Ca^{2+} -связывающие мотивы (EF-рука) [17]. Это обеспечивает непосредственное стимулирование активности фермента с помощью ионов кальция, выход которых из внеклеточного пространства в цитоплазму инициируется экзогенными и эндогенными факторами.

Цель работы — изучение влияния ионов Ca^{2+} на функциональную активность НАДФН-оксидазы в корнях этиолированных проростков гороха и влияние клубеньковых бактерий на этот процесс.

МЕТОДИКА

Объектом исследований служили проростки гороха посевного (*Pisum sativum* L.), сорт Ямальский, выращенные в пластмассовых кюветах на влажной фильтровальной бумаге при 22°C. Для поддержания заданной температуры с точностью до $\pm 0.5^\circ\text{C}$ использовали электрический термостат с водяной рубашкой ЗЦ-1125М (Россия). Перед замачиванием семена трижды промывали теплой проточной водой с мылом и обеззараживали 3%-ным раствором H_2O_2 в течение 15 мин. Затем семена заливали дистиллированной водой (60°C) и помещали в термостат для набухания при 22°C на 3–4 ч. После этого семена перекладывали в кювету на влажную фильтровальную бумагу и проращивали при 22°C в течение 48 ч. Полученные таким образом исходные растения использовали для дальнейшей работы, для чего выбирали проростки с одинаковыми размерами корней. В экспериментах использовали 48-часовые проростки гороха, которые в зависимости от варианта опыта инокулировали клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv *viceae*, эффективного производственного штамма 1060 в концентрации 2×10^8 кл./мл (1 мл/проросток). Штамм получен из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (Санкт-Петербург, Россия). Контрольным вариантом служили неинокулированные ризобиями проростки, выращенные на дистиллированной воде.

Проростки инкубировали на растворах изучаемых соединений в течение 5, 10, 20 и 30 мин. В исследованиях применяли экзогенный кальций (100 мкМ CaCl_2), а интенсивность потока в клетках эндогенного кальция изменяли путем дей-

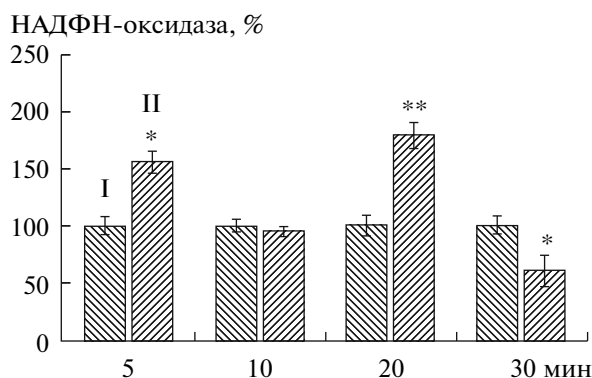


Рис. 1. Динамика активности НАДФН-оксидазы корневых проростков гороха на фоне экзогенного источника кальция. I – контроль, II – 100 мкМ CaCl₂.

На рис. 1, 2 и 3: * – достоверно при $P \geq 0.95$, ** – при $P \geq 0.99$.

ствия на проростки активатора кальциевых каналов амиодарона (“Sigma-Aldrich”, США) в концентрации 300 мкМ и блокатора кальциевых каналов хлорида лантана в концентрации 400 мкМ. В качестве хелатора ионов кальция использовали 100 мкМ раствор этиленгликоль тетрауксусной кислоты (ЭГТА) (“Sigma-Aldrich”, США).

Активность НАДФН-оксидазы измеряли в микросомальной клеточной фракции корней, полученной методом дифференциального центрифугирования. Для этого корни отмывали дистиллированной водой, взвешивали и гомогенизировали в предварительно охлажденной ступке в буферном растворе (50 мМ HEPES-КОН, pH 7.8), содержащем 250 мМ сахарозу и 0.1 мМ ЭДТА [23]. Далее гомогенат фильтровали через капроновую ткань и центрифугировали при 600 г в течение 15 мин для осаждения тяжелых органелл и компонентов клетки. Надосадочную жидкость центрифугировали при 42000 g в течение 20 мин для осаждения митохондрий. Полученный супернатант вновь центрифугировали при 140000 g в течение 1 ч. Микросомальную клеточную фракцию выделяли с помощью дифференциального центрифугирования на препаративной центрифуге “Sorvall Discovery 90SE” (“Hitachi”, Япония-США). Супернатант, содержащий цитозольную фракцию, отделяли, осадок (микросомальная фракция, включающая в себя плазмалемму, тонопласт, мембраны аппарата Гольджи и эндоплазматический ретикулум) суспендировали в том же буфере, который использовали для гомогенизации корней.

В полученной таким образом микросомальной фракции определяли НАДФН-оксидазную активность. Для этого к реакционной среде, состоящей из 0.8 мл буферного раствора (50 мМ HEPES-КОН, pH 7.8), 0.1 мМ ЭДТА и 1.0 мкМ KCN до-

бавляли 0.2 мл пробы и инкубировали 1 мин при 30°C. Реакцию инициировали добавлением 100 мкМ НАДФН. Скорость окисления регистрировали на спектрофотометре Spcord S-100 (“Analytik Jena”, Германия) по уменьшению в адсорбции при $\lambda = 340$ нм (A_{340}) в течение 5 мин и рассчитывали с коэффициентом экстинкции $6.22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Активность фермента выражали в нмоль/мин · мг белка. Содержание белка в ферментном препарате определяли с красителем амидо-черным [21]. Средние значения и их стандартные ошибки вычислены из трех независимых экспериментов, каждый из которых состоял из трех повторений. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментами было установлено, что на фоне экзогенного источника кальция (CaCl₂, 100 мкМ) наблюдались колебания в активности НАДФН-оксидазы (рис. 1). Так, активность фермента значительно повышалась через 5 и 20 мин (на 56 и 80% соответственно), а через 10 и 30 мин, наоборот, снижалась: в первом случае до уровня контроля, во втором – на 40% ниже контрольного уровня. Эти данные, очевидно, свидетельствуют о наличии в растительных клетках механизма, регулирующего активность НАДФН-оксидазы путем изменения концентрации ионов кальция. При этом первая фаза связана с притоком Ca²⁺ в цитоплазму и вызывает активацию фермента, а вторая – обусловлена накоплением Ca²⁺ в цитоплазме и ведет к снижению активности фермента. Возможные механизмы влияния кальция на активность НАДФН-оксидазы описаны в статьях [19, 22]. Так, по мнению Уонг с соавт. [22], основным фактором, модулирующим активность НАДФН-оксидазного ферментного комплекса, является концентрация Ca²⁺ в цитоплазме растительной клетки, регулирующей взаимодействие между субъединицами фермента – цитозольной Рас-ГТФазы и мембранной субъединицей gp91phox, гомологичной субъединице НАДФН-оксидазы (NOX2) из животных клеток. Однако, по данным Саги и Флюр [19], растительная НАДФН-оксидаза может продуцировать O₂⁻ и в отсутствие цитозольного компонента Рас-ГТФазы.

Таким образом, увеличение образования АФК при активации НАДФН-оксидазы может вызывать вторую фазу накопления кальция в цитоплазме в результате стимулирования открытия Ca²⁺-каналов на плазматической мембране, а это является причиной ингибирования активности фермента.

Присутствие в среде экзогенного Ca²⁺ усиливало при экспозиции в течение 20 мин актив-

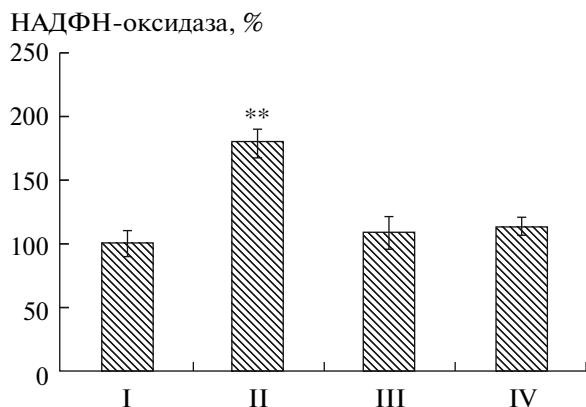


Рис. 2. Влияние хелатора кальция (ЭГТА) на активность НАДФН-оксидазы корней проростков гороха на фоне экзогенного источника кальция (CaCl_2) при времени экспозиции 20 мин. I – контроль (H_2O), II – 100 мкМ CaCl_2 , III – 100 мкМ ЭГТА, IV – 100 мкМ CaCl_2 + 100 мкМ ЭГТА.

ность фермента на 80% по сравнению с контролем (рис. 2). Добавление в среду с CaCl_2 хелатора кальция – ЭГТА, приводило к снижению активности изучаемого фермента до уровня контроля при экспозиции 20 мин. При этом сама ЭГТА при той же экспозиции не вызвала достоверных изменений в активности НАДФН-оксидазы по сравнению с контролем. Таким образом, связывание кальция хелатором ведет к снижению активности фермента, что свидетельствует о вовлечении кальция в регуляцию активности его в корнях проростков гороха. В этих вариантах действие Ca^{2+} проявляется как в увеличении, так и в снижении активности НАДФН-оксидазы, что может быть связано с регуляцией уровня АФК в клетке.

Цель последующих экспериментов – изучение влияния ризобиальной инокуляции на активность НАДФН-оксидазы. Из полученных данных (рис. 3) следует, что инокуляция проростков клубеньковыми бактериями приводила через 5 мин к увеличению активности фермента в 3.9 раза по сравнению с контролем (без инокуляции). Возможный механизм активации фермента может быть также связан с Ca^{2+} -гомеостазом. По данным Шоу и Лонг [8], спустя 1–5 мин после ризобиальной инфекции наблюдается быстрый приток ионов кальция в цитоплазму. Предполагается, что цитозольные потоки кальция активируют Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы, которые фосфорилируют N-терминальный участок НАДФН-оксидазы и тем самым активируют фермент [23]. Влияние ризобий на Ca^{2+} -каналы, очевидно, обусловлено взаимодействием бактериального NF и растительного рецептора (*LysM RLK*), что ведет к открыванию Ca^{2+} -каналов и усилению притока кальция в цитоплазму. Считают, что кальций и кальмодулинзависимая киназа являются ключе-

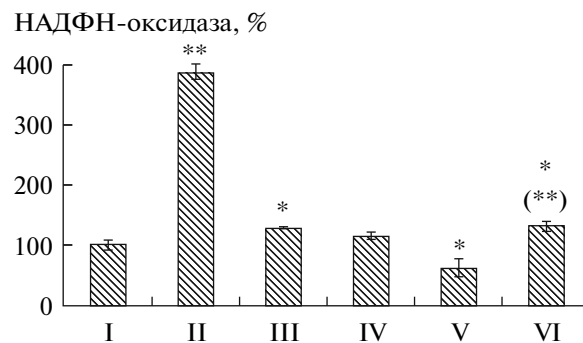


Рис. 3. Влияние ризобиальной инокуляции, амиодарона (АМД) и хлорида лантана (LaCl_3) на активность НАДФН-оксидазы корней проростков гороха, экспозиция 5 мин. I – контроль (H_2O), II – инокуляция, III – 300 мкМ АМД, IV – 300 мкМ АМД + инокуляция, V – 400 мкМ LaCl_3 , VI – 400 мкМ LaCl_3 + инокуляция.

В скобках указана достоверность по сравнению с вариантом “инокуляция”.

выми медиаторами симбиотического взаимодействия [24].

Чтобы проверить предположение об активации НАДФН-оксидазы ризобиальной инфекцией через ее влияние на поток Ca^{2+} из внеклеточного пространства в цитоплазму, были проведены опыты с амиодароном – активатором Ca^{2+} -каналов в дрожжевых клетках [25] и блокатором каналов – хлоридом лантана [26]. Представленные на рис. 3 данные свидетельствуют о том, что амиодарон в применяемой концентрации сам по себе стимулирует активность фермента на 30% по сравнению с контролем, а в сочетании с ризобиальной инокуляцией снимает стимулирующее влияние ризобий на активность фермента до уровня контроля, уменьшая его активность в 3.4 раза. Таким образом, стимуляция активности НАДФН-оксидазы под влиянием амиодарона в концентрации 300 мкМ свидетельствует об участии ионов кальция в функционировании фермента. Снижение активности НАДФН-оксидазы под влиянием амиодарона на фоне ризобиальной инокуляции, возможно, связано с избыточным поступлением Ca^{2+} в цитозоль, вызванного активирующим действием амиодарона на Ca^{2+} -каналы.

Неселективный блокатор кальциевых каналов хлорид лантана, как и амиодарон, снимает стимулирующее влияние клубеньковых бактерий на активность фермента, что проявилось в снижении активности фермента в 2.9 раза. Однако в отличие от амиодарона снижение активности фермента в этом варианте, вероятно, связано с недостатком ионов кальция в цитоплазме для активации фермента. В варианте опыта с влиянием только одного хлорида лантана наблюдалось снижение активности НАДФН-оксидазы на 36% по сравнению с контролем (без инокуляции). Это, по-видимому,

можно объяснить недостаточным количеством в цитоплазме ионов кальция вследствие блокирования Ca^{2+} -каналов хлоридом лантана. Эти данные согласуются с представлением о том, что кальций играет двойную роль в клетке [27]. Так, он в зависимости от концентрации может способствовать формированию бобово-ризобияльного симбиоза или подавлять этот процесс.

В заключение следует отметить, что участие Ca^{2+} в бобово-ризобияльном симбиозе тесно связано с его взаимодействием с АФК, а также с активными формами азота (АФА) [27]. Полученные нами данные подтверждают необходимость ионов кальция для функционирования НАДФН-оксидазы – генератора O_2^- и H_2O_2 . В литературе есть также данные о потребности Ca^{2+} для функционирования растительного фермента(ов), генерирующего(их) другую сигнальную молекулу – оксид азота (NO), которая может повышать или тормозить поток Ca^{2+} в цитоплазму путем изменения проницаемости кальциевых каналов с участием сигнальных белков, подвергшихся посттрансляционной модификации NO (S-нитрозилирование, металлонитрозилирование и нитрование белков) [28, 29]. Этот механизм регуляции потоков Ca^{2+} на плазмалемме и мембранах внутриклеточных органелл с участием NO (АФА) также может быть применен для объяснения функциональной активности НАДФН-оксидазы при бобово-ризобияльном симбиозе. Участие Ca^{2+} в этих процессах очевидно, но каков механизм влияния бобово-ризобияльного симбиоза на функции кальция и каким образом кальциевый сигнал реализуется при симбиотическом взаимодействии, предстоит выяснить.

Авторы выражают благодарность Путилиной Т.Е., Галиченко В.А., Грабельных О.И. за техническую помощь при проведении экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kouchi H., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M., Nakoyama T., Nakagawa T., Umehara Y., Sugunuma N., Kawaguchi M. // *Plant Cell Physiol.* 2010. V. 51. № 9. P. 1381–1397.
2. Downie J.A. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2010. V. 34. № 2. P. 150–170.
3. Ferguson B.J., Indrasumunar A., Hayashi S., Lin Y-H., Reid D.E., Gresshoff P.M. // *J. Integr. Plant Biol.* 2010. V. 52. № 1. P. 61–76.
4. 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. // *Nature.* 2003. V. 425. № 6958. P. 585–592.
5. 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. // *Plant Physiol.* 2006. V. 142. № 1. P. 265–279.
6. Cardenas L., Holdaway-Clarke T.L., Sanchez F., Quinto C., Feijo J.A., Kunkel J.G., Hepler P.K. // *Plant Physiol.* 2000. V. 123. № 2. P. 443–452.
7. Oldroyd C.E.D., Downie J.A. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004. V. 5. № 7. P. 566–576.
8. Shaw S.L., Long S.R. // *Plant Physiol.* 2003. V. 131. № 3. P. 976–984.
9. Hayashi T., Banda M., Shimoda Y., Kouchi H., Hayashi M., Imaizumi-Anraku H. // *Plant J.* 2010. V. 63. № 1. P. 141–154.
10. Mori I.C., Schroeder J.I. // *Plant Physiol.* 2004. V. 135. № 2. P. 702–708.
11. Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H., Torres M.A., Linstead P., Brownlee C., Jones J.D.G., Davies J.M., Dalan L. // *Nature.* 2003. V. 422. № 6930. P. 442–446.
12. Kwak J.M., Mori I.C., Pei Z.M., Leonhardt N., Torres M.A., Dangl J.L., Bloom R.E., Jonea J.D.G., Schroeder J.I. // *EMBO J.* 2003. V. 22. № 11. P. 2623–2633.
13. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. Киев: Основа, 2010. 350 с.
14. Peleg-Grossman S., Volpin H., Levine A. // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. № 7. P. 1637–1649.
15. Cardenas L., Martinez A., Sanchez F., Quinto C. // *Plant J.* 2008. V. 56. № 5. P. 802–813.
16. Sagi M., Fluhr R. // *Plant Physiol.* 2006. V. 141. № 2. P. 336–340.
17. Глянько А.К., Ищенко А.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2010. Т. 46. № 5. С. 509–518.
18. Глянько А.К., Васильева Г.Г., Ищенко А.А., Миронова Н.В., Алексеенко А.Л. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2010. Т. 46. № 4. С. 479–485.
19. Sagi M., Fluhr R. // *Plant Physiol.* 2001. V. 126. № 3. P. 1281–1290.
20. Marino D., Dunand C., Puppo A., Pauly N. // *Trends Plant Sci.* 2012. V. 17. № 1. P. 9–15.
21. Бузун Г.А., Джемухадзе К.М., Милешко Л.Ф. // *Физиология растений.* 1982. Т. 29. № 1. С. 198–200.
22. Wong H.L., Pinontoan R., Hayashi K., Tabata R., Yano T., Hasegawa K., Kojima C., Yoshioka H., Iba K., Kawasaki T., Shimamoto K. // *Plant Cell.* 2007. V. 19. № 12. С. 4022–4034.
23. Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K., Yokota N., Fujiwara M., Shimamoto K., Doke N., Yoshioka H. // *Plant Cell.* 2007. V. 19. № 3. P. 1065–1080.
24. Yano K., Yoshida S., Muller J., Singh S., Banba M., Vickers K., Markmann K., White C., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Murooka Y., Perry J., Wang T.L., Kawaguchi M., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M., Parniske M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 51. С. 20540–20545.
25. Courchesne W.E., Ozturk S. // *Mol. Microbiol.* 2003. V. 47. № 1. P. 223–234.
26. Huetter J.E., Stack E., Wilding T.J. // *Neuropharmacology.* 1998. V. 37. № 10–11. P. 1239–1247.
27. Cerella C., Diederich L., Ghibelli L. // *Int. J. Cell Biol.* 2010. V. 2010: 546163, 15 p.
28. Васильева Г.Г., Ищенко А.А., Глянько А.К. // *Журнал стресс-физиологии и биохимии.* 2011. Т. 7. № 4. С. 398–414.
29. Courtois C., Besson A., Dahan J., Bourque S., Dobrowska G., Pugin A., Wendehenne D. // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. № 2. P. 155–163.

Influence of Rhizobial (*Rhizobium leguminosarum*) Inoculation and Calcium Ions on the NADPH Oxidase Activity in Roots of Etiolated Pea (*Pisum sativum* L.) Seedlings

A. K. Glyan'ko and A. A. Ischenko

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

e-mail: akglyanko@sifibr.irk.ru

Received May 11, 2012

Abstract—Changes in the functional activity of the NADPH oxidase in the microsomal fraction of roots of etiolated pea seedlings, caused by rhizobial inoculation and calcium ions (Ca^{2+}), are shown. The enzyme activity in a medium with an exogenous source of Ca^{2+} (CaCl_2 , 100 μM) fluctuated, increasing 5 to 20 min and decreasing 10 and 30 min after addition. A calcium chelator (ethylene glycol tetraacetic acid (EDTA), 100 μM) potentiated the decrease in the enzyme activity in the presence of exogenous calcium. Rhizobial inoculation caused a 3.9-fold increase in the enzyme activity 5 min after inoculation compared to the control (without inoculation). The Ca^{2+} -channel activator (amiodarone, 300 μM) and the Ca^{2+} -channel blocker (lanthanum chloride, 400 μM) reduced the NADPH oxidase activity after rhizobial inoculation compared to the control level (without inoculation). It is concluded that Ca^{2+} and reactive oxygen species are involved in the regulation of the membrane NADPH oxidase activity in roots of pea seedlings.